ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΙΤΑΜΙΝΗ D ΚΑΙ ΕΥΠΑΘΕΙΑ ΣΤΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΩΝ ΒΡΕΦΩΝ

Μαρία Ζαχαριουδάκη

Ιατρός

Ηράκλειο, Ιανουάριος 2022

UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF MEDICINE

PhD DISSERTATION

VITAMIN D AND SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS IN INFANTS

Maria Zacharioudaki

Heraklion, 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Σαμώνης, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χρήστος Τσατσάνης, Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χρήστος Τσατσάνης, Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημητρίου Ελένη, Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στη εργαστηριακή έρευνα, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κοφτερίδης Διαμαντής, Καθηγητής Γενικής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παρασκάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περδικογιάννη Χρυσούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

© 2022
Μαρία Ζαχαριουδάκη
ALL RIGHTS RESERVED

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διδακτορική μου διατριβή. Πριν από την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου και ορισμένους από τους ανθρώπους που συνεργάστηκα και διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην εκπόνηση της.

Πρώτο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διδακτορικής μου εργασίας, Καθηγητή Παιδιατρικής Εμμανουήλ Γαλανάκη, για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη του για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής εργασίας αλλά και για τη βοήθεια και καθοδήγηση του σε όλη την ακαδημαϊκή και επαγγελματική μου πορεία έως τώρα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Παθολογίας Γεώργιο Σαμώνη με τον οποίο είχα την τιμή να έχω συνεργαστεί ακαδημαϊκώς και στο παρελθόν, καθώς και τον Καθηγητή Κλινικής Χημείας Χρήστο Τσατσάνη για την καθοδήγηση τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ελένη Δημητρίου για τη συνεργασία και καθοδήγηση της στην εκπόνηση του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Υγείας του Παιδιού του τομέα «Μητέρας-Παιδιού». Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Χρυσούλα Περδικογιάννη για τη βοήθεια και την καθοδήγηση της όπως επίσης και τον Καθηγητή Παθολογίας Διαμαντή Κοφτερίδη για την πολυετή συνεργασία και καθοδήγηση του. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Εμμανουήλ και Ελένη, το σύζυγο μου Κωνσταντίνο και την αδερφή μου Χαρά, για τη συνεχή υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

		Σελίδα
	Περίληψη	1-3
	Abstract	4-5
	Συντομογραφίες	6
1.	**Εισαγωγή/ Γενικό μέρος**	7-35
1.1	Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στον οστικό μεταβολισμό	13-14
1.2	Ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες του μονοπατιού της Βιταμίνης D	14-22
1.2.1	Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στην έμφυτη ανοσία	16-20
1.2.2	Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στην επίκτητη ανοσία	20-22
1.3	Ορισμός της ανεπάρκειας της βιταμίνης D	22-24
1.4	Βιταμίνη D και λοιμώξεις στα παιδιά	24-25
1.5	Χορήγηση βιταμίνης D και λοιμώξεις αναπνευστικού στα παιδιά	25-26
1.6	Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα παιδιά	26-28
1.7	Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (VDBP) και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα παιδιά	28-31
1.8	Το μονοπάτι της βιταμίνης D και η συσχέτιση με τη λοίμωξη COVID-19 στα παιδιά	31-35
1.9	Σκοπός	35

2.	**Μεθοδολογία**	36-53
2.1.	Πληθυσμός μελέτης	36-37
2.2.	Επιλογή μονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που μελετήθηκαν	37-38
2.3.	Γονοτύπηση και διερεύνηση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών	38-48
2.3.1	Γονοτύπηση πολυμορφισμών *TaqI* και *ApaI* του *VDR*	41-43
2.3.2	Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *FokI* του *VDR*	43-44
2.3.3.	Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *BsmI* του *VDR*	44-45
2.3.4.	Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *rs7041* του γονιδίου *Gc*	45-46
2.3.5.	Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *rs4588* του γονιδίου *Gc*	46-47
2.3.6.	Γονοτύπηση πολυμορφισμού του υποκινητή του γονιδίου του ενζύμου 1-α-υδροξυλάση *CYP27B1-1260- promoter rs10877012*	47-48
2.4.	Προσδιορισμός των επιπέδων της βιταμίνης D και VDBP στον ορό	48-49
2.4.1	Προσδιορισμός των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό	49-50
2.4.2.	Προσδιορισμός επιπέδων της VDBP στον ορό	50-51
2.5. 2.5.	Στατιστική ανάλυση Ηθικής της έρευνας	51-53 53
3.	**Αποτελέσματα**	53-66
3.1.	Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της βιταμίνης D VDR	54-56
3.2.	Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* της VDBP	56-57
3.3.	Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ενζύμου CYP27B1	58
3.4.	Τα επίπεδα της 25-OH-βιταμίνης D στον ορό	58-59

3.5.	Τα επίπεδα της VDBP στον ορό	60-61
3.6.	Επίπεδα 25-OH-βιταμίνης D και VDBP στον ορό	62
3.7.	Γονότυπος για *VDR*, *Gc* και *CYP27B1* και επίπεδα 25(OH)D στον ορό	62-65
3.8.	Γενετικές παραλλαγές *Gc* και επίπεδα VDBP στον ορό	65-66
4.	**Συζήτηση**	66-77
4.1.	Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D *VDR* και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη	66-69
4.2.	Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* της VDBP και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη	69-71
4.3	Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ενζύμου CYP27B1 και συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη	71
4.4	Επίπεδα βιταμίνης D στον ορό και συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη	71-72
4.5	Επίπεδα δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D (VDBP) στον ορό και συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη	72-73
4.6	Επίπεδα βιταμίνης D και VDBP στον ορό και γονότυπος για το γονίδιο *Gc* και το γονίδιο του υποδοχέα *VDR*	73-74
4.7	Σημασία και ερμηνεία των ευρημάτων της διδακτορικής διατριβής	74-77
4.8	Περιορισμοί	77-78
4.9.	Μελλοντικές ερευνητικές προοπτικές	78
5.	**Συμπεράσματα**	78-79
6.	**Χρηματοδοτήσεις**	80
7.	**Βιβλιογραφία**	81-96

Κατάλογος Πινάκων-Γραφημάτων

Πίνακας 1	Ορισμός επάρκειας-ανεπάρκειας της βιταμίνης D με βάση τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό στα παιδιά	23
Πίνακας 2	Οι εκκινητές-primers που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των θραυσμάτων που περιείχαν τους SNPs: *VDR* (*TaqI, BsmI, FokI, ApaI)*, VDBP *Gc* (*rs4588, rs7041*) και *CYP27B1* (*rs10877012*) και το μέγεθος των θραυσμάτων που προκύπτει από την RFLP	40
Πίνακας 3	Οι συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό με PCR των *SNP* που μελετήθηκαν VDR (*ApaI*, *TaqI*, *BsmI*, *FokI*), Gc (*rs7041*, *rs4588*) και *CYP27B1-1260 promoter*	41
Πίνακας 4	Οι συχνότητες των αλληλόμορφων για το γονίδιο *VDR* μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου για τους SNPs *TaqI*, *BsmI*, *ApaI* και *FokI*	56
Πίνακας 5	Πίνακας συχνοτήτων των αλληλόμορφων του γονιδίου *Gc* μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου	57
Εικόνα 1	Σχηματική αναπαράσταση της οδού σύνθεσης, ενεργοποίησης μεταβολισμού και βιολογικής δραστικότητας της βιταμίνης D	9
Εικόνα 2	Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοτροποποιητικής δράσης της βιταμίνης D και των μεταβολιτών της στα κύτταρα της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας	17

Εικόνα 3	Αντιπροσωπευτικές εικόνες gel αγαρόζης από PCR-RFLP ηλεκτροφορήσεις DNA από την μελέτη για τους πολυμορφισμούς του *VDR* 3α: BsmI και FokI, 3β: TaqI και 3γ: ApaI.	55
Γράφημα 1	Box plot γράφημα με τα αποτελέσματα των επιπέδων 25(OH)D στον ορό των ασθενών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου	58
Γράφημα 2	Box plot γράφημα με τα αποτελέσματα των επιπέδων 25(OH)D στον ορό των ασθενών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου	59
Γράφημα 3	Box plot που απεικονίζει τα επίπεδα της VDBP στον ορό στα βρέφη με ιογενή λοίμωξη και στα υγιή βρέφη της ομάδας ελέγχου	60
Γράφημα 4	Box plot που απεικονίζει τα επίπεδα της VDBP στον ορό στα βρέφη με βακτηριακή λοίμωξη και στα υγιή βρέφη της ομάδας ελέγχου	61
Γράφημα 5	Scanner plot γράφημα συσχέτισης των επιπέδων της 25(OH)D με τα επίπεδα της VDBP στον ορό των βρεφών	62
Γράφημα 6	Box plot σύγκρισης των επιπέδων της 25(OH)D μεταξύ των βρεφών με γονότουπους *TT, Tt, tt* για τον *TaqI* του γονιδίου *VDR*	64
Γράφημα 7	Box plot σύγκρισης των επιπέδων της 25(OH)D μεταξύ των βρεφών με γονότουπους δηλαδή μεταξύ των βρεφών που έφεραν τον πολυμορφισμό *TaqI (Tt, tt)* σε σύγκριση με αυτά που δεν τον είχαν (*TT*)	64
Γράφημα 8	Box plot. Σύγκριση επιπέδων 25(OH)D στον ορό μεταξύ των βρεφών που έφεραν τις παραλλαγές *Gc1F*, *Gc1S* και *Gc2* του γονιδίου *Gc*	65

Γράφημα 9	Box plot σύγκρισης των επιπέδων της VDBP μεταξύ των βρεφών με τις παραλλαγές *Gc1F*, *Gc1S* και *Gc2* του γονιδίου *Gc*	66

Περίληψη

Τίτλος εργασίας: Βιταμίνη D και ευπάθεια στις λοιμώξεις των βρεφών

Της: Μαρίας Ζαχαριουδάκη

Επιβλέποντες: Ε. Γαλανάκης, Γ. Σαμώνης, Χ. Τσατσάνης

Ημερομηνία: Ιανουάριος 2022

Εισαγωγή: Ο ρόλος της βιταμίνης D στην έμφυτη και επίκτητη ανοσία έχει αποδειχθεί πρόσφατα. Οι βιολογικές της δράσεις καθορίζονται μέσω του υποδοχέα της VDR. Η βιταμίνη D υφίσταται δύο διαδικασίες ενεργοποίησης, η πρώτη υδροξυλίωση πραγματοποιείται από το ένζυμο CYP2R1 και η δεύτερη από το ένζυμο CYP27B1. Οι μεταβολίτες κυκλοφορούν στο πλάσμα συνδεδεμένοι κυρίως με τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (VDBP). Το μονοπάτι της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με ευπάθεια σε λοιμώξεις. Ταυτόχρονα, οι λοιμώξεις αποτελούν κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στα βρέφη. Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την ηλικιακή αυτή ομάδα είναι περιορισμένα.

Σκοπός: Σε αυτή τη μελέτη διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση των γενετικών διαφορών στο μονοπάτι της βιταμίνης D, των επιπέδων της βιταμίνης D και της VDBP στον ορό και των λοιμώξεων στη βρεφική ηλικία.

Μεθοδολογία: Πρόκειται για μια προοπτική μελέτη ασθενών-μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε σε βρέφη ηλικίας 0-24 μηνών με λοίμωξη και σε αντιστοιχισμένα με βάση την ηλικία βρέφη στην ομάδα ελέγχου. Η γονοτύπηση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D

(*VDR*) (*BsmI, FokI, ApaI, TaqI*), της VDBP (γονίδιο *Gc, rs7041, rs4588*) και του ενζύμου CYP27B1 (rs10877012) πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο προσδιορισμός των επιπέδων της 25(OH)D και της VDBP στον ορό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Elisa. Η στατιστική ανάλυση έγινε για τα ποιοτικά δεδομένα με πίνακες συχνοτήτων και τη μη παραμετρική δοκιμασία Fischer exact (two-tailed), ενώ η ανάλυση των ποσοτικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τις μη παραμετρικές δοκιμασίες Mann-Whitney (two-tailed) και Kruskal Wallis. Η συσχέτιση των επιπέδων 25(OH)D και VDBP στον ορό των βρεφών έγινε με τη μέθοδο Spearman's Correlation Coefficient.

Αποτελέσματα: Συνολικά εντάχθηκαν στη μελέτη 132 βρέφη, από τα οποία 40 με βακτηριακή λοίμωξη και 52 με ιογενή λοίμωξη, και 40 υγιή βρέφη στην ομάδα ελέγχου. Ο πολυμορφισμός του υποδοχέα VDR *TaqI* ήταν σημαντικά συχνότερος στα βρέφη με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με τα βρέφη από την ομάδα ελέγχου (p= 0.03, OR 1.96, 95% ΔΕ 1.1-3.58). Επίσης, η παραλλαγή του γονιδίου της VDBP *Gc1F* ήταν σημαντικά συχνότερη στα βρέφη στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη (p=0.007, OR 2.7, 95% ΔΕ 1.3-5.6). Δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τη μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών του υποδοχέα VDR και της VDBP μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από την μελέτη του πολυμορφισμού του υποκινητή του γονιδίου CYP27B1 *(rs10877012*) μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν. Τα επίπεδα της 25(OH)D και της VDBP στον ορό δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ούτε μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά αναφορικά με τα επίπεδα της

25(OH)D και της VDBP στον ορό μεταξύ των βρεφών με διαφορετικούς γονότυπους για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *VDR*, *Gc*, και *CYP27B1* που μελετήθηκαν. Ακόμα, δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων 25(OH)D και της VDBP στον ορό στα βρέφη της μελέτης.

Συμπεράσματα: Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή δείξαμε ότι οι γενετικές διαφορές στο μονοπάτι της βιταμίνης D μπορεί να ρυθμίζουν την ευαισθησία και τη σοβαρότητα των ιογενών λοιμώξεων, ιδιαίτερα των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, στη βρεφική ηλικία. Ο πολυμορφισμός του υποδοχέα *TaqI* ήταν σημαντικά συχνότερος στα βρέφη με οξείες ιογενείς λοιμώξεις σε σύγκριση με τα βρέφη στην ομάδα ελέγχου και η παραλλαγή του γονιδίου της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D *Gc1F* ήταν πιο συχνή στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με οξείες ιογενείς λοιμώξεις. Δεν αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της 25(OH)D και της VDBP στον ορό μεταξύ των βρεφών της μελέτης. Τα ευρήματά μας διευκρινίζουν περαιτέρω την ύπαρξη γενετικής ευαισθησίας στις ιογενείς λοιμώξεις και η ανίχνευση των γενετικών πολυμορφισμών για τον υποδοχέα VDR και τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D μπορεί να βοηθήσουν στον προσδιορισμό των βρεφών υψηλού κινδύνου.

Λέξεις κλειδιά:

βιταμίνη D, υποδοχέας της βιταμίνης D , δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D, ένζυμο 1-α-υδροξυλάση, CYP27B1, ιογενείς λοιμώξεις, βακτηριακές λοιμώξεις, βρέφη,

Abstract

Title: Vitamin D and susceptibility to infections in infants

By: Maria Zacharioudaki

Supervisors: E. Galanakis, G. Samonis, C. Tsatsanis

Date: January 2022

Background: The role of Vitamin D in innate and adaptive immunity has been recently demonstrated. The biologic effects of vitamin D on target genes are exerted through its receptor (VDR). Vitamin D undergoes two activation processes; the first hydroxylation is conducted by the enzyme CYP2R1 and the second one by the enzyme CYP27B1. The metabolites circulate in plasma mainly bound to the vitamin D binding protein (VDBP). VDR and CYP27B1 are expressed on the majority of immune cells. Vitamin D pathway has recently been correlated to susceptibility to infections in different age groups. Infections constitute one of the major causes of morbidity and mortality in infancy. However, only a few data are published concerning the role of vitamin D in susceptibility to infections in this age group.

Aim: In this study we explored the potential association of genetic variances in vitamin D pathway, vitamin D and VDBP serum levels and infections in infancy.

Methods: This prospective case-control study included infants 0-24 months with infection and age-matched healthy controls. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of vitamin D receptor (*VDR*) gene (*BsmI, FokI, ApaI, TaqI*), vitamin D binding protein (VDBP) (*Gc* gene, *rs7041*, *rs4588*) and CYP27B1 (*rs10877012)* were genotyped by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Serum V

vitamin D and VDBP levels were determined using Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Statistical analysis was conducted with non-parametric tests (two-tailed Fisher exact test, Mann-Whiney test and Kruskal-Wallis tests) and Spearman's correlation coefficient.

Results: In total 132 infants were enrolled, of whom 40 with bacterial and 52 with viral infection, and 40 healthy controls. As compared to controls, *TaqI* was more frequent in infants with viral infection compared to controls (p= 0.03, OR 1.96, 95% CI 1.1 to 3.58). Moreover, *Gc1F* was more frequent in the control group compared to infants with viral infection (p=0.007, OR 2.7, 95%CI 1.3 to 5.6). No significant differences were found regarding the genetic profile for VDR and VDBP in infants with bacterial infection compared to the controls and also regarding CYP27B1 *(rs10877012*) between the studied groups. Serum 25(OH)Vitamin D and VDBP levels did not differ significantly between infants with viral infection compared to the control group neither between infants with bacterial infection compared to the control group. No significant difference was observed regarding serum 25(OH)Vitamin D and VDBP levels among infants with different genotypes for the studied SNPs of *VDR*, *Gc* and CYP27B1 genes. No significant correlation was revealed between serum 25(OH)Vitamin D and VDBP levels in the infants of the study.

Conclusion: In this study we demonstrated that genetic variances in vitamin D pathway may modulate susceptibility to and severity of viral infections, in particular of viral respiratory tract infections, in infancy. *TaqI* was significantly more frequent in infants with acute viral infections compared to controls and *Gc1F* was more frequent in the control group compared to infants with acute viral infections. No significant difference was revealed regarding vitamin D and VDBP serum levels in the studied groups. Our findings further elucidate genetic susceptibility to viral infections and detection of SNPs of VDR and genetic variances of VDBP might help determine high-risk infants.

Key words: Vitamin D; vitamin D receptor; viral infections; bacterial infections; vitamin D binding protein; infancy

Συντομογραφίες

VDR: υποδοχέας της βιταμίνης D

VDBP: δεσμευτική πρωτεϊνη της βιταμίνης D

CYP27B1: ένζυμο του κυτοχρώματος P450 1-α-υδροξυλάση

SNPs: μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί

RSV: αναπνευστικός συγκυτιακός ιός

Gc: γονίδιο που εκφράζει τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D

TLR: toll-like-receptor

25(OH)D: 25-υδροξυ-βιταμίνη D

1,25$(OH)_2$D: 1,24-διυδροξυ-βιταμίνη D

COVID-19: νόσος του κορονοϊού-19 (coronavirus disease 19)

SARS-CoV-2: σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο κοροναϊού-2

ACE2: ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2

MIS-C: Πολυσυστηματικό υπερφλεγμονώδες σύνδρομο στα παιδιά

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

PTH: Παραθορμόνη

GH: Αυξητική ορμόνη

Ca: Ασβέστιο

P: Φώσφορος

IL: Ιντερλευκίνη

CYP2R1: ένζυμο του κυτοχρώματος P450 25-υδροξυλάση

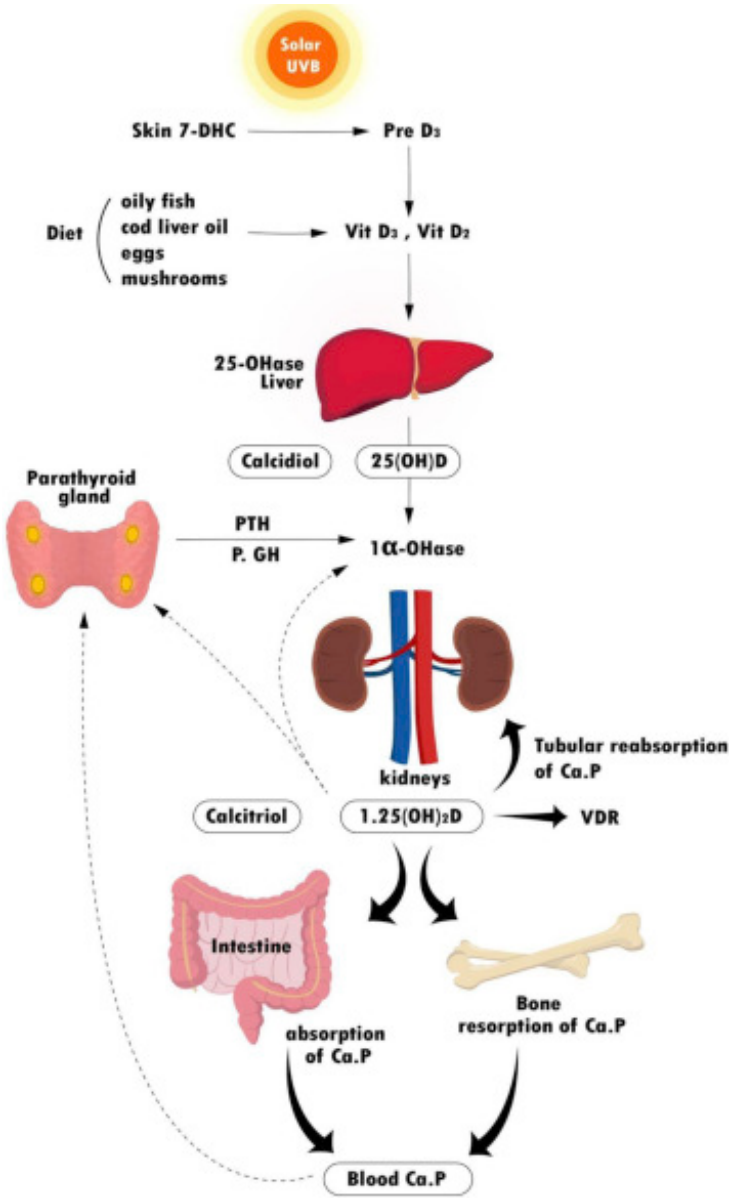
1. Εισαγωγή

Η βιταμίνη D είναι κυρίως γνωστή για το ρόλο της στη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου (Ca) και του φωσφόρου (P) και στη διατήρηση της υγείας των οστών προλαμβάνοντας τα περιστατικά ραχίτιδας [1]. Ωστόσο, τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν αναδείξει ότι η βιταμίνη D διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απόκριση στον άνθρωπο [2-5]. Η βιταμίνη D είναι ένας ισχυρός επιγενετικός ρυθμιστής, που επηρεάζει την έκφραση περισσότερων από 2500 γονιδίων και οι δράσεις της έχουν συσχετιστεί με πολλά από τα πιο σημαντικά νοσήματα που απασχολούν την ανθρωπότητα όπως με τις λοιμώξεις του αναπνευστικού συμπεριλαμβανομένου και της λοίμωξης COVID-19, τις νεοπλασματικές ασθένειες, το σακχαρώδη διαβήτη και τα αυτοάνοσα νοσήματα [1]. Η Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής συστήνει σε όλα τα βρέφη που είναι αποκλειστικώς θηλάζοντα τη χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης D από το στόμα 400 IU ανά ημέρα [1].

Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη της οποίας η κύρια πηγή προέλευσης στον άνθρωπο είναι η ενδογενής σύνθεση που ξεκινά από το δέρμα μετά από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία-B (UVB) [1]. Στις εξωγενείς διατροφικές πηγές προέλευσης της βιταμίνης D ανήκουν λίγα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη D όπως τα λιπαρά ψάρια (σαρδέλες, τόνος, ρέγκα, σκουμπρί, σολομός), το μουρουνέλαιο, οι κρόκοι αυγών, τα μανιτάρια και το συκώτι. Ωστόσο, η ενδογενής σύνθεση αποτελεί το 90% της προέλευσης της βιταμίνης D στον άνθρωπο. Το διάγραμμα της σύνθεσης και προέλευσης της βιταμίνης D παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Επομένως, οι πηγές της βιταμίνης D στον άνθρωπο είναι η ηλιακή ακτινοβολία, η διατροφή και τα διατροφικά συμπληρώματα. Υπάρχουν δυο κύριες μορφές της βιταμίνης D: η βιταμίνη D_2 και η βιταμίνη D_3. Η χοληκαλσιφερόλη ή βιταμίνη D_3 είναι ζωικής προέλευσης ενώ η εργοκαλσιφερόλη ή βιταμίνη D_2 είναι φυτικής προέλευσης [1]. Η βιταμίνη D_2 συντίθεται από την εργοστερόλη και ανευρίσκεται στη μαγιά, στα

αποξηραμένα στον ήλιο μανιτάρια και στα φυτά. Η βιταμίνη D_3 παράγεται ενδογενώς από την 7-δευδροχοληστερόλη (7-DHC) στο δέρμα και ανευρίσκεται επίσης στη φύση σε αυτή τη μορφή στο μουρουνέλαιο και στα λιπαρά ψάρια. Αναλυτικότερα, η 7-δευδροχοληστερόλη στα επιδερμιδικά κύτταρα του δέρματος μετατρέπεται μετά από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία UVB (μήκος κύματος 290–315 nm) στην προ-βιταμίνη D_3, η οποία αποτελεί ισομερές της βιταμίνης D_3. Οι βιταμίνες D_3 και D_2 είναι βιολογικά αδρανείς και για την μετατροπή τους σε βιολογικώς δραστικά μόρια απαιτούνται ενζυμικές μετατροπές και συγκεκριμένα δύο υδροξυλιώσεις [1]. Συνεπώς, η βιταμίνη D υφίσταται δύο διαδικασίες ενεργοποίησης πριν από την αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της VDR στα γονίδια στόχους. Αναλυτικότερα, η βιταμίνη D, με τη μορφή της βιταμίνης D_2 ή D_3, μετά την είσοδο της στην κυκλοφορία του αίματος μεταβολίζεται αρχικά στο ήπαρ από το ένζυμο 25-υδροξυλάση της βιταμίνης D CYP2R1 (Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1) και μετατρέπεται στην 25-υδροξυβιταμίνη D (25(0H)D) ή καλσιδιόλη, η οποία έχει χρόνο ημίσειας ζωής τις δυο με τρεις εβδομάδες [1,3,6]. Η 25(0H)D αποτελεί την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D, είναι όμως βιολογικά αδρανής [3,6]. Η 25(0H)D μετατρέπεται στη συνέχεια από το ένζυμο του κυτοχρώματος 1-α-υδροξυλάση CYP27B1 (Cytochrome P450, Subfamily XXVIIB) στη βιολογικά δραστική μορφή, την 1,25-διυδροξυβιταμίνη D ($1,25(OH)_2D$) ή καλσιτριόλη, με χρόνο ημίσειας ζωής τέσσερις έως έξι ώρες [1,3,6]. Η 1-άλφα-υδροξυλίωση πραγματοποιείται κυρίως στο εγγύς σωληνάριο των νεφρών και αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από την παραθορμόνη (PTH) και άλλους μεσολαβητές όπως η υποφωσφαταιμία και η αυξητική ορμόνη (GH) [1,3,6]. Η 1-άλφα-υδροξυλίωση πραγματοποιείται επίσης και σε εξωνεφρικούς ιστούς όπου υπάρχει σύνθεση CYP27B1 όπως στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού, στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα στις κυψελίδες του αναπνευστικού συστήματος, στους οστεοβλάστες, στους λεμφαδένες,

στον πλακούντα, στο παχύ έντερο, στους μαστούς και στα κερατινοκύτταρα, όπου παράγεται η 1,25(OH)$_2$D και ασκεί τοπικά τις αυτοκρινείς και παρακρινείς της δράσεις της [1,3-6].



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της οδού σύνθεσης και μεταβολισμού της βιταμίνης D. Συνεχείς γραμμές: άμεσες δράσεις της βιταμίνης D, Διακεκομμένες: αρνητική ανάδραση του ασβεστίου του ορού ή της 1,25(OH)$_2$D. Εικόνα απο Chang SW, et al. [1]

Η βιταμίνη D ασκεί τις βιολογικές της δράσεις στους ιστούς στόχους μέσω της σύνδεσης της με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR) στον πυρήνα των κυττάρων, ο οποίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που οδηγεί σε αύξηση ή μείωση της έκφρασης πολλών γονιδίων [2-6]. Οι κυριότερες δράσεις της βιταμίνης D είναι η προώθηση της διαφοροποίησης των εντεροκυττάρων και της εντερικής απορρόφησης ασβεστίου εξασφαλίζοντας έτσι την ομοιόσταση του ασβεστίου [6]. Κατά τη στιγμή της υπασβεστιαιμίας, τα επίπεδα του ιονισμένου ασβεστίου στο πλάσμα πέφτουν και αυτό ανιχνεύεται από τους υποδοχείς ασβεστίου του παραθυρεοειδούς αδένα. Στη συνέχεια η PTH εκκρίνεται από τον παραθυρεοειδή αδένα, ο οποίος διεγείρει την 1-άλφα-υδροξυλίωση στους νεφρούς για να δημιουργήσει περισσότερη 1,25$(OH)_2$D από την κυκλοφορία της 25(OH)D [6]. Η αύξηση της 1,25$(OH)_2$D αυξάνει τη μεταφορά ασβεστίου μέσα στο έντερο, τα οστά και τους νεφρούς και ρυθμίζει περαιτέρω τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών [6]. Καθώς το ασβέστιο του πλάσματος επανέρχεται στο φυσιολογικό, η περαιτέρω έκκριση της PTH μειώνεται. Αυτός ο φυσιολογικός βρόγχος της βιταμίνης D και της ομοιόστασης του ασβεστίου αποδεικνύει ότι η επαρκής κυκλοφορία 25(0H)D είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της επαρκούς σύνθεσης 1,25$(OH)_2$D και των επιπέδων ασβεστίου στο πλάσμα. Ωστόσο, η ανεπάρκεια της βιταμίνης D μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή κυκλοφορία 25(OH)D, η οποία μειώνει τη σύνθεση 1,25$(OH)_2$D και την απορρόφηση του ασβεστίου, αυξάνοντας τα επίπεδα PTH [1,6]. Επιπλέον, επειδή οι υποδοχείς VDR βρίσκονται όχι μόνο στο λεπτό έντερο, αλλά και στο κόλον, στους οστεοβλάστες, στα ενεργοποιημένα Τ και Β λεμφοκύτταρα, στα μονοπύρηνα κύτταρα, στα κύτταρα των νησιδίων βήτα και στα κύρια όργανα, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, το δέρμα, οι γονάδες, ο προστάτης και οι μαστοί, αναμένονται συνυπάρχουσες εξωσκελετικές επιδράσεις από την ανεπάρκεια της βιταμίνης D [1-6].

Η βιταμίνη D, εκτός της δράσης της στον οστικό μεταβολισμό, φαίνεται να έχει ισχυρή ανοσοτροποποιητική δράση όσον αφορά τόσο τη φυσική όσο και την επίκτητη ανοσία. Οι βιολογικές της δράσεις στην ανοσιακή απόκριση καθορίζονται μέσω του υποδοχέα της VDR ο οποίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας [2-3]. Ο υποδοχέας VDR και το ένζυμο ενεργοποίησης 1-α-υδροξυλάση CYP27B1 εκφράζονται στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [3-5]. Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D κυκλοφορούν στο πλάσμα συνδεδεμένοι κυρίως με τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (Vitamin D binding protein, VDBP) [3]. Ο ρόλος της βιταμίνης D στην έμφυτη και επίκτητη ανοσία και η επίδραση της στην ευπάθεια στις λοιμώξεις εξετάζεται όλο και περισσότερο στην βιβλιογραφία [2-5]. Σύμφωνα με τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ευαισθησία σε λοιμώξεις, ενώ οι λοιμώξεις αντιπροσωπεύουν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στη βρεφική ηλικία [1,3,7,8-12]. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε λοιμώξεις του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος σε παιδιά σχολικής ηλικίας, με τη σήψη σε παιδιά και ενήλικες καθώς και με τη σοβαρότητα και θνησιμότητα από τη λοίμωξη με το σοβαρό οξύ σύνδρομο κοροναϊού-2 (SARS-CoV-2) [3,9-13]. Η ανθρωπότητα αντιμετωπίζει τα τελευταία δυο χρόνια την πανδημία από τη νόσο κορονοϊού-19 (coronavirus disease 19, COVID-19), η οποία προκαλείται από τον κορονοϊό (severe acute respiratory syndrome-Covonavirus-2, SARS-CoV-2) και υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον στη διερεύνηση του ρόλου της βιταμίνης D και στη λοίμωξη COVID-19.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης D αναφέρεται όλο και περισσότερο στη βιβλιογραφία παγκοσμίως, ακόμα και σε πληθυσμούς που διαμένουν σε χώρες με αυξημένη ηλιοφάνεια [6,8,14]. Ταυτόχρονα, πρόσφατα αναφέρθηκαν και νέα περιστατικά ραχίτιδας σε παιδιά [15]. Οι παρατηρήσεις αυτές εγείρουν πολλά ερευνητικά ερωτηματικά. Αρχικά η αύξηση της επίπτωσης της

ανεπάρκειας της βιταμίνης D θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αλλαγή στον τρόπο ζωής στις σύγχρονες κοινωνίες καθώς έχει περιοριστεί η εξωτερική δραστηριότητα και η έκθεση στον ήλιο που αποτελεί την κύρια πηγή σύνθεσης της βιταμίνης D [19]. Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε επίσης να εξηγηθεί και από την ύπαρξη γενετικού υπόβαθρου που να καθορίζει τη συγκέντρωση της κυκλοφορούσας βιταμίνης D στον ορό στον άνθρωπο και επομένως τα επίπεδα της βιταμίνης D να είναι εν μέρει γενετικώς καθοριζόμενα και να μην εξαρτώνται μόνο από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Στη βιβλιογραφία περιγράφονται 4 κύριοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single mononucleotide polymorphsims, SNPs) του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D, το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 12q13-12q14, οι οποίοι είναι δυνητικά λειτουργικοί και επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου *VDR*: *FokI* (*rs2228570*) που αποτελεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου γουανίνη από την αδενίνη (G/A)στο εξόνιο 2, *TaqI* (*rs731236*) που αποτελεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου θυμίνη από την κυτοσίνη (T/C) στο εξόνιο 9, *BsmI* (*rs1544410*) που αποτελεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου αδενίνη από τη γουανίνη (A/G) στο ιντρόνιο 8 και *ApaI* (*rs7975232*) που αποτελεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου γουανίνη από τη θυμίνη (G/T) στο ιντρόνιο 8 [16-18]. Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D VDBP κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο του γονιδίου *Gc*, το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 4q12-q13 [19]. Οι δύο πιο συχνοί SNPs του γονιδίου *Gc* είναι ο *rs7041* που αποτελεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου θυμίνη από τη γουανίνη (T/G αντικατάσταση) στο εξόνιο 11 του *Gc* που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος ασπαραγινικού οξέος από το γλουταμινικό οξύ (Asp416Glu) στην πρωτεΐνη της VDBP και ο *rs4588* που αποτελεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου κυτοσίνη από την αδενίνη (C/A αντικατάσταση) στο εξόνιο 11 του *Gc* που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνη από τη λυσίνη (Thr420Lys) στην πρωτεΐνη της VDBP [19,20]. Ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από αυτούς

τους δύο *SNPs* έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *Gc* (*rs7041*T-*rs4588*C, *rs7041*G-*rs4588*C και *rs7041*T-*rs4588*A) οι οποίες κωδικοποιούν τις τρεις κύριες ηλεκτροφορητικές παραλλαγές της VDBP (VDBP allozymes, termed group- specific component 1 fast (Gc1F), Gc1 slow (Gc1S) and Gc2 αντιστοίχως) [15,19,20]. Τέτοιου είδους αντικαταστάσεις αμινοξέων με διαφορετικά ηλεκτρικά φορτία έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του καθαρού φορτίου της πρωτεΐνης και ως εκ τούτου οι παραλλαγές αυτές της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D διαφέρουν στην δεσμευτική τους ικανότητα ως προς τη βιταμίνη D και έχουν συσχετιστεί με διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D και των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό [15]. Το γονίδιο *CYP27B1* εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως στα μακροφάγα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα T και B λεμφοκύτταρα [5,21]. Ο πολυμορφισμός του υποκινητή του γονιδίου *CYP27B1-1260 (rs10877012)* (A/C) έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα του δραστικού μορίου 1,25$(OH)_2$D στον ορό και έχει συσχετιστεί με την λοίμωξη από ηπατίτιδα B και αυτοάνοσα νοσήματα σε ενήλικες [5,21]. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να αφορούν στη μελέτη της συσχέτισης του πολυμορφισμού *CYP27B1-1260 (rs10877012)* με τις λοιμώξεις στη βρεφική και γενικά δεν υπάρχουν δεδομένα από παιδιατρικό πληθυσμό.

1.1 Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στον οστικό μεταβολισμό

Η βιολογικά δραστική βιταμίνη D (1,25$(OH)_2$D) ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου και του φωσφόρου μέσω της δράσης της στο λεπτό έντερο, στους νεφρούς και στα οστά. Η βιταμίνη D επάγει παθητικά τη μετάλλωση των οστών καθώς επάγει την εντερική απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου και την επαναρρόφηση του ασβεστίου στα νεφρικά σωληνάρια, δράσεις οι οποίες ευνοούν τη διατήρηση επαρκούς αποθέματος ασβεστίου και φωσφόρου στο κολλαγόνο των οστών. Επίσης, η 1,25$(OH)_2$D ασκεί άμεσες επιδράσεις στα οστά, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η

επαγωγή της έκφρασης της οστεοκαλσίνης, της κύριας πρωτεΐνης του σκελετού μετά το κολλαγόνο, και η ενεργοποίηση του υποδοχέα ενεργοποίησης της οστικής απορρόφησης που μεσολαβείται μέσω του πυρηνικού παράγοντα κάππα-Β (kappa-B RANK dependent) [6]. Επιπροσθέτως, η 1,25$(OH)_2$D δρα και ως ορμόνη μαζί με την PTH και τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών 23 (FGF23) για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του φωσφόρου [6]. Μέσω του βρόγχου αρνητικής ανάδρασης, η 1,25$(OH)_2$D αναστέλλει άμεσα την παραγωγή PTH, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της οστικής απορρόφησης και αύξηση της νεφρικής απέκκρισης του ασβεστίου στα ούρα, και επάγει την παραγωγή FGF23 από τα οστεοκύτταρα, που οδηγεί σε αύξηση της απέκκρισης του φωσφόρου στα ούρα [6] (Εικόνα 1).

1.2 Ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες του μονοπατιού της Βιταμίνης D

Η βιταμίνη D, εκτός της δράσης της στον οστικό μεταβολισμό, φαίνεται να έχει ισχυρή ανοσοτροποποιητική δράση όσον αφορά τόσο τη φυσική όσο και την επίκτητη ανοσία [2-5]. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν τις πολλαπλές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες της βιταμίνης D καθώς υποστηρίζουν ότι ο υποδοχέας της VDR όπως και το ένζυμο ενεργοποίησης της CYP27B1 εκφράζονται στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως στα μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ενεργοποιημένα Β και Τ λεμφοκύτταρα [3,4]. Η βιταμίνη D προάγει τη διέγερση της έμφυτης ανοσίας, τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, ρυθμίζει άμεσα τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών, αναστέλλει την Th1 διαφοροποίηση ενώ προάγει την παραγωγή Th2 και Τ-ρυθμιστικών κυττάρων. Επίσης, η βιταμίνη D ενισχύει τη φυσική ανοσία καθώς επάγει την έκκριση ιντερφερονών, ενισχύει τη φαγοκυττάρωσης προκαλώντας αύξηση της προσκόλλησης του φαγοσώματος στο λυσόσωμα στα μακροφάγα και διεγείρει τη σύνθεση της ελεύθερης ρίζας μονοξειδίου του αζώτου (NO) [2-5]. Επιπροσθέτως, η βιταμίνη D μέσω του υποδοχέα της VDR επάγει την έκφραση των

αντιμικροβιακών πεπτιδίων καθελικιδίνη και ντιφενσίνη στους ιστούς και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εκτίθενται σε παθογόνα-αντιγόνα μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR (Toll like receptor) [3,4]. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό για την έμφυτη ανοσιακή απόκριση καθώς τα αντιμικροβιακά αυτά πεπτίδια έχουν βακτηριοκτόνο δράση, διασπώντας το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων, καθώς και αντιική δράση [3,4].

Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D (25(OH)D και 1,25$(OH)_2$D) μεταφέρονται στον ορό κυρίως δεσμευμένοι στην VDBP, και μέσω αυτής συνδέονται στον υποδοχέα VDR στα γονίδια-ιστούς στόχους [2-5,22]. Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D VDBP διαδραματίζει και η ίδια άμεσο ρόλο στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας καθώς συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και επάγει την χημειοταξία [22]. Επίσης, το ένζυμο 1-α- υδορξυλάση (CYP27B1) το οποίο είναι απαραίτητο για την δεύτερη υδροξυλίωση και την μετατροπή της βιταμίνης D στο μεταβολικά δραστικό μεταβολίτη 1,25$(OH)_2$D εκφράζεται κυρίως στα νεφρικά σωληνάρια αλλά και σε εξωνεφρικούς ιστούς όπως στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού και στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού. Τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και Τ και Β λεμφοκύτταρα εκφράζουν CYP27B1. Παρόλο που το ένζυμο αυτό είναι πανομοιότυπο με αυτό της νεφρικής προέλευσης, η ρύθμιση της έκφρασης και της δραστηριότητας του στα κύτταρα του ανοσοποιητικού είναι διαφορετική. Στα κύτταρα αυτά, η δραστικότητα του ενζύμου CYP27B1 ρυθμίζεται από ανοσολογικά σήματα και από την έκκριση κυτοκινών [2-4].

Επιπροσθέτως, η βιταμίνη D φαίνεται ότι ενισχύει την αντιική δραστηριότητα των επιθηλιακών βρογχικών κυττάρων [1,7-9]. Πράγματι, τόσο ο υποδοχέας της VDR όσο και το ένζυμο ενδογενούς ενεργοποίησης CYP27B1 εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού[1,9-11]. Έχει αποδειχθεί ότι οι RNA ιοί επάγουν την έκφραση του ενζύμου CYP27B1 και έτσι την ενδογενή ενεργοποίηση της 25(OH)D

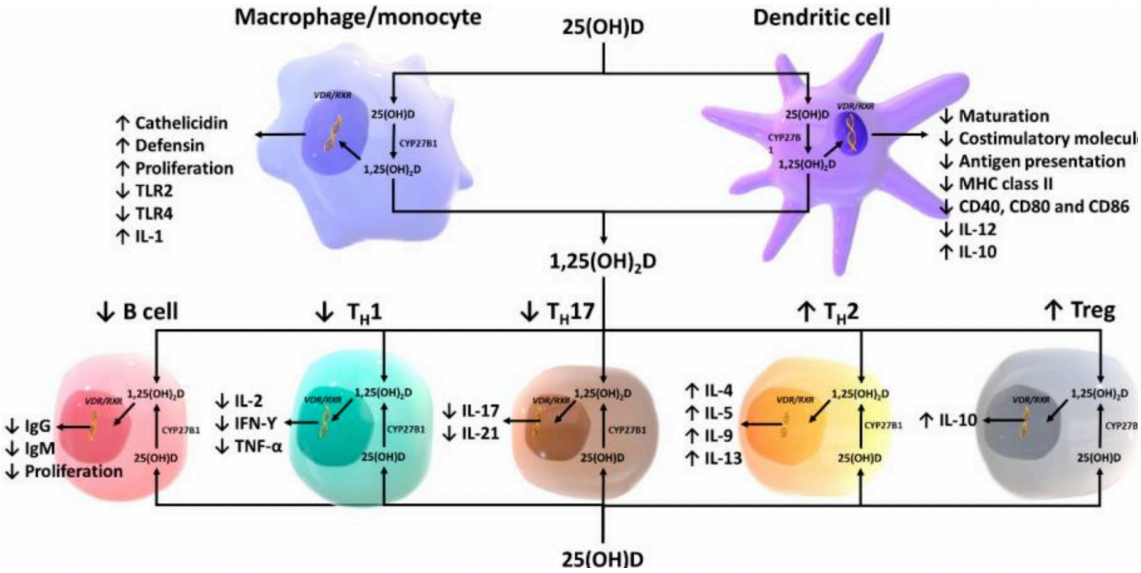
στον ενεργό μεταβολίτη 1,25$(OH)_2$D εντός των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος, με ισχυρά αντιικά αποτελέσματα μέσω της έκφρασης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων καθελισιδίνη και ντιφενσίνη εντός των κυττάρων αυτών αλλά και μέσω της απελευθέρωσης της 1,25$(OH)_2$D η οποία δρα τοπικά ενισχύοντας τη χημειοταξία και τη φαγοκυττάρωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού [1,9-11]. Επίσης, οι αντιικές ιδιότητες του μονοπατιού της βιταμίνης D στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού υποστηρίζονται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν ότι η βιταμίνη D έχει συσχετιστεί με την μείωση της έκφρασης των Toll-like-receptor μέσω των οποίων ο RSV συνδέεται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού[1,9-11]. Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στην έμφυτη και επίκτητη ανοσία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

1.2.1 Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στην έμφυτη ανοσία

Μακροφάγα και Μονοκύτταρα

Η συσχέτιση της βιταμίνης D με την ανοσιακή απάντηση ξεκινά από τα μέσα του 1800-αρχές 1900, στην εποχή πριν την ανακάλυψη των αντιβιοτικών, όπου είχε παρατηρηθεί ότι η έκθεση στον ήλιο και η χορήγηση μουρουνέλαιου που είναι πλούσιο σε βιταμίνη D_3, χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία των ασθενών με φυματίωση, χωρίς να γνωρίζουν τότε τον ακριβή μηχανισμό δράσης [23]. Μεταγενέστερες μελέτες ανέδειξαν την εξήγηση των θεραπευτικών επιδράσεων της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και της κατανάλωσης μουρουνέλαιου που αποδίδονταν στις ευεργετικές ανοσοτροποποιητικές δράσεις της βιταμίνης D. Στις λοιμώξεις τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και μονοκύτταρα, ως απόκριση στην ενεργοποίηση μέσω των υποδοχέων TLR και την έκθεση σε κυτταροκίνες όπως η ιντερφερόνη-Υ (IFN-Y), εκφράζουν αθρόα το ένζυμο CYP27B1 το οποίο μετατρέπει την 25(OH)D σε 1,25$(OH)_2$D μέσα σε αυτά [24] (Εικόνα 2). Έπειτα, η 1,25$(OH)_2$D επάγει τις αντιμικροβιακές δράσεις των μακροφάγων και μονοκυττάρων με αυτοκρινή τρόπο μέσω της σηματοδότησης VDR-

RXR, που στη συνέχεια διεγείρει την παραγωγή του ενδογενούς αντιμικροβιακού πεπτιδίου καθελικιδίνη LL-37 [6,25,26]. Η καθελικιδίνη έχει βακτηριοκτόνο και αντιμυκητισιακή δράση μέσω της αποσταθεροποίησης των κυτταρικών μεμβρανών ενώ παρουσιάζει και άμεσες αντιικές ιδιότητες έναντι πολλών ιών του αναπνευστικού συστήματος, όπως η ιός της γρίπης και ο ρινοϊός, καθώς δρα καταστρέφοντας το περίβλημα των ιών και μειώνοντας τη διαπερατότητα των κυττάρων στόχων του ξενιστή [27,28,29]. Η ενδογενής παραγωγή 1,25$(OH)_2$D εντός των μακροφάγων πραγματοποιείται όχι μόνο για την αύξηση της παραγωγής και έκκρισης καθελικιδίνης αλλά και για την εξαγωγή της 1,25$(OH)_2$D από τα μακροφάγα και την επίδραση της στα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα [30]. Ωστόσο, μια συνέπεια αυτής της παρακρινούς λειτουργίας είναι ότι τα μακροφάγα παράγουν περίσσεια ποσότητα 1,25$(OH)_2$D που εισέρχεται στην κυκλοφορία και έτσι ένας μη ρυθμισμένος τρόπος διεγείρει την εντερική απορρόφηση ασβεστίου και την κινητοποίηση του ασβεστίου των οστών με αποτέλεσμα την πρόκληση υπερασβεστιουρίας και υπερασβεστιαιμίας [6]. Αυτό είναι πιο πιθανό να συμβεί όταν τα επίπεδα της κυκλοφορούσας 25(OH)D στον ορό ξεπερνούν τα 30 ng/mL (75 nmol/L) [6].



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοτροποποιητικής δράσης των μεταβολιτών της βιταμίνης D στα κύτταρα της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας. Πηγή: Charoenngam et al. [6]

Η $1,25(OH)_2D$ ρυθμίζει τη διαφοροποίηση και τη λειτουργικότητα των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων μέσω της ενίσχυσης της μετατροπής τους σε πιο ανώριμα και ανεκτικά, μια αλλαγή που χαρακτηρίζεται από μείωση της έκφρασης του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) κατηγορίας II και των συν-διεγερτικών μορίων στην κυτταρική τους επιφάνεια [6,32,33] (Εικόνα 2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας καθώς και της παραγωγής ιντερλευκίνης-12 (IL-12), ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση στην παραγωγή ιντερλευκίνης-10 (IL-10), που θεωρείται μια κυτταροκίνη που ευνοεί την ανεκτικότητα [32,33]. Επίσης, η $1,25(OH)_2D$ αναφέρεται ότι καταστέλλει την έκφραση των υποδοχέων toll-like (toll-like receptors, TLRs) στα μονοκύτταρα και αναστέλλει την παραγωγή κάποιων προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-2, η IL-6 και η IL-17 [34,35] (Εικόνα 2). Επίσης, πειραματικά μοντέλα in vitro έχουν αποδείξει ότι η διαφοροποίηση και η λειτουργία των κυττάρων NK μπορεί να ρυθμιστεί από την χορήγηση $1,25(OH)_2D$. Ωστόσο, παραμένει ακόμα ασαφές αν τελικά η $1,25(OH)_2D$ επάγει ή αναστέλλει τη λειτουργικότητα αυτών των κυττάρων [36,37].

Ενδοθηλιακή λειτουργία και διαπερατότητα των αγγείων

Οι επιθηλιακοί φραγμοί καθώς και ο ενδοθηλιακός φραγμός αποτελούν μέρος της έμφυτης ανοσίας. Υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της ρυθμίζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και τη διαπερατότητα των αγγείων μέσω πολλαπλών γονιδιωματικών και εξωγονιδιωματικών οδών [6]. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε μοντέλα ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων μικροαγγειακών δικτύων δέρματος in vitro έχουν δείξει ότι η $25(OH)D_3$ και $1,25(OH)_2D_3$ δρα στη σταθεροποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου μη γονιδιωματικά [38]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η $1,25(OH)_2D$ είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής της συνθάσης του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), προκαλώντας ανοδική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου eNOS και επομένως αυξημένη ενδοθηλιακή

παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου [38]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα VDR από την 1,25$(OH)_2$D στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την δραστικότητα του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου μέσω ενδοκυττάριων δευτερογενών αγγελιοφόρων μονοπατιών στα οποία περιλαμβάνονται τα μονοπάτια αδενυλικής κυκλάσης/κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AC/cAMP) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης/διακυλογλυκερόλης (IP3/DAG), που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου. Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση του VDR ενεργοποιεί την παραγωγή eNOS μέσω του μονοπατιού της φωσφοινοσιτιδης 3-κινάσης/πρωτεϊνικής κινάσης b (PI3K/Akt) που ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση της σερίνης-1779 στο eNOS [39]. Επίσης, σε ένα in vitro πειραματικό μοντέλο σε αρουραίους φάνηκε ότι η 1,25$(OH)_2D_2$ προωθούσε τις συνδέσεις κυττάρου-κυττάρου στο αγγειακό ενδοθήλιο και ανέστειλε την οργάνωση των ινών στρες F-ακτίνης, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό ενδοθηλιακών ενδοκυτταρικών κενών και ενδοθηλιακής βλάβης. Εν κατακλείδι, από τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα φαίνεται ότι η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της ασκούν πολλαπλές επιδράσεις στο αγγειακό ενδοθήλιο που είναι προστατευτικές έναντι της αγγειακής δυσλειτουργίας και του τραυματισμού των ιστών ως αποτέλεσμα τοπικής και συστηματικής φλεγμονής.

Επιθήλιο του εντέρου και κύτταρα Paneth

Πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη D διαδραματίζει ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντέρου και της εντερικής ομοιόστασης μεταξύ του ξενιστή και της εντερικής μικροχλωρίδας. Το μονοπάτι της βιταμίνης D έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τη βιωσιμότητα των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και συμμετέχει στην επανόρθωση από τις βλάβες που υφίστανται από τους βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες [40]. Ακόμα, η βιταμίνη D ενισχύει το βλεννογονικό εντερικό φραγμό μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης ενδοκυττάριων πρωτεϊνών αναγνώρισης παθογόνων και πρωτεϊνών σύνδεσης της επιθηλιακής μεμβράνης [41]. Επιπροσθέτως,

η 1,25(OH)$_2$D επάγει την έκφραση και την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, στα κύτταρα Paneth, και στα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα [42,43]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της βακτηριακής μετατόπισης των εντερικών παθογόνων και στη διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης [44].

1.2.2 Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D στην επίκτητη ανοσία

Τ-λεμφοκύτταρα

Αρχικά είχε παρατηρηθεί ότι ο υποδοχέας VDR εκφράζεται στην ανθρώπινη σειρά μονοκυττάρων U937, σε κλώνους Τ-λεμφοκυττάρων και σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος [45,46]. Στη συνέχεια περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος εκφράζουν VDR ενώ τα ανενεργά Τ-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν. Μετά από διέγερση των ανενεργών Τ-λεμφοκύτταρων με φυτοαιμοσυγκολλητίνη, τα Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν και με την ενεργοποίηση, τα Τ-λεμφοκύτταρα εξέφρασαν τον υποδοχέα VDR [45,46]. Επίσης, τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν CYP27B1 που μετατρέπει την 25(OH)D στη δραστική μορφή 1,25(OH)$_2$D που θεωρείται ότι διεγείρει την ενδροκρινή ενεργοποίηση του VDR [47,48] (Εικόνα 2). Η 1,25(OH)$_2$D που παράγεται τοπικά από τα μονοκύτταρα ή τα μακροφάγα έχει ως αποτέλεσμα τη μετάβαση της ανοσολογικής κατάστασης από τη προφλεγμονώδη στην ανεκτική κατάσταση. Η 1,25(OH)$_2$D καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και ρυθμίζει τη παραγωγή κυτοκινών [49]. Επίσης, η 1,25(OH)$_2$D επάγει τη μετάβαση από T_H1 σε T_H17 και T_H2 ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της καταστολής της έκφρασης των κυτταροκινών T_H1 (IL-2, IFN-Y, TNF-α) και T_H17 (IL-17, IL-21) ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την έκφραση των T_H2 κυτταροκινών (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) [50,51] (Εικόνα 2). Επίσης, η 1,25(OH)$_2$D επάγει τη διαφοροποίηση των ρυθμιστικών Τ-λεμφοκυττάρων (Treg) και με άμεσο τρόπο και έμμεσα μέσω της αλληλεπίδρασης της

με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, έχοντας ως αποτέλεσμα την καταστολή της προφλεγμονώδους κατάστασης [52,53]. Αυτός θεωρείται ότι είναι ένας μηχανισμός που εξηγεί τις ευεργετικές ιδιότητες της βιταμίνης D έναντι των αυτοάνοσων νοσημάτων. Επιπροσθέτως, όμοια με τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, τα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν επίσης τόσο το ένζυμο CYP27B1 όσο και τον υποδοχέα VDR. Στα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα VDR ως απόκριση στις λοιμώξεις καθώς και διέγερση μιτογόνου, γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη μιας συντονισμένης ρύθμισης της οδού σηματοδότησης του υποδοχέα VDR και της απόκρισης μέσω των Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων [54,55]. Ακόμα, τα βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η μειωμένη αναλογία CD4/CD8, που αποτελεί δείκτη αυξημένης ανοσολογικής ενεργοποίησης, έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα 25(OH)D και η χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης D_3 5000–10,000 IUs έχει συσχετιστεί με αύξηση στην αναλογία CD4/CD8 [56,57]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετά επιστημονικά δεδομένα αναφορικά με την άμεση επίδραση της βιταμίνης D στα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Οι επιδράσεις της $1,25(OH)_2D$ στη διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και λειτουργικότητα των Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων πιθανά μεσολαβούνται τόσο μέσω της άμεσης ενεργοποίησης του υποδοχέα VDR και του μονοπατιού του όσο και έμμεσα μέσω της μεταβολής των κυτταροκινών που εκκρίνονται από τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [49,55] (Εικόνα 2).

Β-λεμφοκύτταρα

Τα μη ενεργά Β-λεμφοκύττρα δεν έχουν υποδοχείς VDR, και μόνο μετά την ενεργοποίηση τους για πολλαπλασιασμό από μιτογόνα επάγεται η έκφραση του υποδοχέα VDR σε αυτά [58] (Εικόνα 2). Επίσης στα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζεται το ένζυμο CYP27B1 επομένως είναι ικανά να παράγουν ενδογενώς $1,25OH)_2D$. Η $1,25 (OH)_2D$ φαίνεται ότι επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p27 στα κύτταρα αυτά, αλλά

όχι των p18 και p21, γεγονός που μπορεί να είναι σημαντικό στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της ακόλουθης διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων. Η βιταμίνη D αναστέλλει τη μετατροπή των Β-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και επάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων [59]. Επίσης, αναστέλλει την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων μέσω των κυτταροκινών δρώντας στα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, επάγει άμεσα την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα Β-λεμφοκύτταρα (IL-10, CCR10) και καταστέλλει τη διαφοροποίηση των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και Β-κύτταρα μνήμης. Λόγω αυτών των δράσεων στα Β-λεμφοκύτταρα, η βιταμίνη D θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των Β-λεμφοκυττάρων και στη μείωση της παραγωγής αυτοαντισωμάτων, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εκδήλωσης αυτοάνοσων διαταραχών μεσολαβούμενων από αυτοαντισώματα (όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος) [6,58,59].

1.3 Ορισμός της ανεπάρκειας της βιταμίνης D

Ο καλύτερος δείκτης των επιπέδων της βιταμίνης D στον άνθρωπο είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της 25(OH)D στον ορό [1]. Τα ιδανικά επίπεδα της 25(OH)D τόσο για τις σκελετικές όσο και τις εξωσκελετικές ευεργετικές επιδράσεις διαφέρουν μεταξύ των πληθυσμών, ενηλίκων και παιδιών, και δεν υπάρχει ακόμα ομοφωνία σχετικά με το ποια θεωρούνται επαρκή. Στους ενήλικες τα απαιτούμενα επίπεδα της βιταμίνης D προσδιορίζονται μέσω μελετών που βασίζονται στην ομοιόσταση του ασβεστίου, την μετάλλωση των οστών και τα επίπεδα της PTH. Στους ενήλικες τα επίπεδα της PTH στον ορό έχουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό. Ωστόσο, αυτή η συσχέτιση είναι ασθενής στα παιδιά [1]. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν τους ενήλικες και οι συστάσεις των εξειδικευμένων φορέων όπως η Ενδοκρινική Εταιρία (ENDO), η Διεθνής Κοινότητα

Οστεοπόρωσης, η Εθνική Κοινότητα Οστεοπόρωσης και η Αμερικανική Κοινότητα Γηριατρικής, καταλήγουν ότι απαιτούνται επίπεδα τουλάχιστον 30 ng/mL 25(OH) D στον ορό για κλινικά αποτελέσματα και την πρόληψη ασθενειών στους ενήλικες [60-64]. Στα παιδιά τα ιδανικά επίπεδα της βιταμίνης D βασίζονται σε κλινικές ενδείξεις ραχίτιδας ή καταστροφής των οστών, όπως η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στον ορό. Δεν υπάρχει ακόμα ομοφωνία σχετικά με τα επαρκή-ιδανικά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό για τους παιδιατρικούς ασθενείς λόγω των ελλιπών επιστημονικών δεδομένα. Οι συστάσεις που έχουν δημοσιευτεί αναφορικά με τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό στα παιδιά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

25(OH)D (ng/mL)	**American Academy of Pediatrics (2008) (C ng/ml)**	**Pediatric Endocrine Society (2011) (C ng/ml)**	**Global Consensus (2016) (C ng/ml)**
Σοβαρή έλλειψη	<5		
Έλλειψη	5-15	<20	<12
Ανεπάρκεια	16-20	<30	12-20
Επάρκεια	21-100		>20
Excess	101-150		
Τοξικά επίπεδα	>150		>100

Πίνακας 1. Ορισμός επάρκειας-ανεπάρκειας της βιταμίνης D με βάση τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό στα παιδιά

Αναλυτικότερα, η Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής (AAP) το 2008 κατέταξε τα επίπεδα 25(OH)D στον ορό 25(OH)D > 20 ng/mL ως επαρκή, ενώ η Παιδιατρική Ενδοκρινολογική Εταιρεία χρησιμοποίησε ένα ανώτερο όριο το 2011 καθώς

ανακοίνωσε ότι επίπεδα 25(OH)D στον < 30 ng/mL θεωρούνται ανεπαρκή [65,66]. Τέλος, το 2016 η Παγκόσμια Ομοφωνία επίσης κατέληξε ότι τα επίπεδα 25-OH-βιταμίνης D> 20 ng/mL στον ορό θεωρούνται επαρκή [67].

1.4 Βιταμίνη D και λοιμώξεις στα παιδιά

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού σε παιδιά σχολικής ηλικίας [3,9-11]. Εντούτοις, πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί in vitro καταδεικνύουν ότι η βιταμίνη D έχει άμεση επίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος καθώς αυξάνει την αντιική τους δράση [68]. Πράγματι, τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού διαθέτουν τον υποδοχέα VDR και εκφράζουν το ένζυμο ενεργοποίησης της βιταμίνης D CYP27B1 [68,69]. Ως εκ τούτου, η ενδογενής ενεργοποίηση της 25(OH)D πραγματοποιείται μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος [69]. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι οι RNA ιοί επάγουν την ενδογενή έκφραση του ενζύμου CYP27B1 στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού με ισχυρά αντιικά αποτελέσματα [70]. Επίσης, ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D συνδέεται στον υποδοχέα της VDR στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού και επάγει την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων, της καθελικιδίνης και ντιφενσινών, που έχουν αντιική και βακτηριοκτόνο δράση και ενισχύει τη έμφυτη ανοσιακή απόκριση μέσω της οδού των ιντερφερονών και της επαγωγής της έκκρισης κυτοκινών, ως απόκριση σε αντιγόνα (ιούς ή μικροβιακούς παράγοντες) [20,27,28, 68-71]. Η αντιική δράση της καθελικιδίνης έναντι του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV) και του ιού της γρίπης A (Influenza A) έχει υποστηριχθεί από πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα και έχει αποδοθεί στην καταστροφή του περιβλήματος του ιού και στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτταροκινών και των υποδοχέων TlR-3 (toll-like receptor 3) [71]. Επιπροσθέτως, έχουν υποστηριχθεί οι αντιικές ιδιότητες της ντιφενσίνης έναντι της λοίμωξης από RSV

μέσω της αναστολής της εισόδου του ιού RSV μέσα στα κύτταρα [71]. Ακόμα, η μείωση των υποδοχέων TLR μέσω των οποίων ο RSV συνδέεται στην επιφάνεια των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων αναφέρεται ότι μεσολαβείται από το ενδογενές μονοπάτι της βιταμίνης D [68]. Επίσης, τα μειωμένα επίπεδα της βιταμίνης D σε αίμα από ομφάλιο λώρου έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για RSV βρογχιολίτιδα κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής σε ανοσοικανά υγιή βρέφη [72]. Οι προαναφερθείσες μελέτες υποστηρίζουν τη συσχέτιση του μονοπατιού της βιταμίνης D με την ευπάθεια σε λοιμώξεις και ιδιαίτερα ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε λοιμώξεις του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος σε παιδιά σχολικής ηλικίας, με τη σήψη σε παιδιά και ενήλικες καθώς και με τη σοβαρότητα και θνησιμότητα από τη λοίμωξη με το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο κοροναϊού-2 (SARS-CoV-2) [3,9-13].

1.5 Χορήγηση βιταμίνης D και λοιμώξεις αναπνευστικού στα παιδιά

Τα οφέλη της χορήγησης συμπληρωμάτων βιταμίνης D στη μείωση του κινδύνου λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος υποστηρίχθηκαν από τα ευρήματα που αναφέρθηκαν σε μια μετα-ανάλυση που διεξήχθη από τον Martineau και τους συνεργάτες του, οι οποίοι έδειξαν από μια ανάλυση σε μια υποομάδα ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D μείωσε τον κίνδυνο λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος σε ένα μεικτό πληθυσμό 513 παιδιών (1,1-15,9 ετών, προσαρμοσμένο OR: 0,60, 95% -ΔΕ 0,46 έως 0,77) [73]. Επίσης ο Martineau και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η καθημερινή ή εβδομαδιαία χορήγηση συμπληρωμάτος βιταμίνης D, αλλά όχι η εφάπαξ bolus δόση, μείωσε τα ποσοστά των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και το ευεργετικό αποτέλεσμα ήταν πιο εμφανές σε ασθενείς που είχαν χαμηλότερα επίπεδα 25(OH)D στον ορό, πριν

την έναρξη της χορήγησης (<25nmol /l), λαμβάνοντας υπόψη ότι σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα βασικής 25(OH)D (> 25nmol/l) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά [73,74]. Επιπλέον, σε μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη (RCT) που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά σχολικής ηλικίας, αποδείχθηκε ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D μείωσε τα ποσοστά της εποχικής γρίπης A, ειδικά σε παιδιά που δεν είχαν λάβει προηγουμένως συμπληρώματα [75]. Επιπλέον, σε μια άλλη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη σε παιδιά στα οποία χορηγήθηκε καθημερινά μη ενισχυμένο κανονικό γάλα ή γάλα εμπλουτισμένο με βιταμίνη D, αποκαλύφθηκε ότι τα παιδιά που έλαβαν εμπλουτισμένο γάλα παρουσίασαν μείωση του κινδύνου (50%) των οξέων αναπνευστικών λοιμώξεων που αναφέρθηκαν από τους γονείς [76]. Σε μια άλλη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη αξιολογήθηκε εάν η χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης D ήταν αποτελεσματική στη μείωση του αριθμού των περιπτώσεων επεισοδίων υποτροπιάζουσας οξείας μέσης ωτίτιδας (ΟΜΩ) σε 116 παιδιά με λοίμωξη από ωτίτιδα [77]. Τα παιδιά έλαβαν ημερήσιες δόσεις 1000 IU βιταμίνης D ημερησίως ή εικονικό φάρμακο για 4 μήνες, η οποία οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των παιδιών που εμφάνισαν ένα επεισόδιο ΟΜΩ (26/58 έναντι 38/58, p <0,03). Αντίθετα, ο Mailhot και οι συνεργάτες του συνέκριναν τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό των παιδιών με οξείες λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με τους μάρτυρες και δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά [78].

1.6 Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα παιδιά

Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D πραγματοποιούνται μέσω του υποδοχέα της VDR στα κύτταρα στόχους επομένως ο VDR εμπλέκεται στο πρώτο στάδιο της μετάδοσης του σήματος στο μονοπάτι της βιταμίνης D. Ως εκ τούτου, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα με στόχο τη μελέτη της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ

μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου του VDR και της ευπάθειας σε λοιμώξεις με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο του υποδοχέα VDR πιθανά έχει ως αποτέλεσμα ένα δυσλειτουργικό υποδοχέα VDR, επηρεάζοντας τη δράση του και ως εκ τούτου τις δράσεις που μεσολαβούνται από τη βιταμίνη D [17]. Στην βιβλιογραφία περιγράφονται τέσσερις κύριοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) του γονιδίου του υποδοχέα VDR, οι *FokI, BsmI, ApaI,* και *TaqI*, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού και λοιμώξεις ουροποιητικού στα παιδιά [16]. Ο πολυμορφισμός *FokI* έχει ως αποτέλεσμα μία μικρότερου μήκους κατά 3 αμινοξέα πρωτεΐνη VDR. Οι πολυμορφισμοί *BsmI* και *ApaI* δεν επιδρούν στην αλληλουχία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη του VDR καθώς αφορούν σε περιοχή ιντρονίων. Επίσης, ο πολυμορφισμός *TaqI* παρόλο που αφορά σε εξόνιο, έχει ως αποτέλεσμα μια συνώνυμη αλλαγή στην αλληλουχία του DNA, ως εκ τούτου δεν επηρεάζει την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης VDR. Ωστόσο, οι τρεις αυτοί πολυμορφισμοί *TaqI*, *BsmI* και *ApaI* αναφέρεται ότι επιδρούν στην έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα VDR, καθώς επηρεάζουν τη σταθερότητα του μορίου του mRNA, επιδρούν στις τοποθεσίες ματίσματος για τη μεταγραφή του mRNA καθώς και σε ρυθμιστικές περιοχές που εδράζουν σε περιοχές ιντρονίων [16-18,79]. Επιπροσθέτως, ο Triantos και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η παρουσία αυτών των πολυμορφισμών στο γονίδιο του υποδοχέα VDR μπορεί να εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ της βιταμίνης D και του υποδοχέα VDR, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα μη αποτελεσματικό σύμπλοκο βιταμίνης D-VDR [17]. Επίσης, οι πολυμορφισμοί αυτοί, *TaqI*, *BsmI* και *ApaI,* έχουν συσχετιστεί με μειωμένη μεταγραφή μεσολαβούμενη από τον VDR και μειωμένη δραστηριότητα των οδών σηματοδότησης που σχετίζονται με τη βιταμίνη D [17].

Η έμφυτη ανοσία και η μεσολαβούμενη από Τ-λεμφοκύτταρα ανοσιακή απόκριση είναι κρίσιμη στην απόκριση του ξενιστή στις ιογενείς λοιμώξεις. Ο υποδοχέας VDR

εκφράζεται στα μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα [3-5]. Η βιταμίνη D μέσω του υποδοχέα της VDR επάγει την ενεργοποίηση των μακροφάγων, την παραγωγή ιντερλευκίνης 1 και καθελικιδίνης, ενισχύει τη φαγοκυττάρωση και τη χημειοταξία [5]. Πολλές μελέτες έχουν παρουσιάσει θετική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης πολυμορφισμών στο γονίδιο του VDR και της ευπάθειας σε λοιμώξεις σε διάφορες ηλικιακές ομάδες. Ο πολυμορφισμός *TaqI* έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια στις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού στην πρώιμη παιδική ηλικία [16]. Σε μια πολυκεντρική μελέτη ασθενών μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά σχολικής ηλικίας, οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα VDR, συγκεκριμένα οι πολυμορφισμοί *FokI* και *TaqI*, συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο ιογενούς βρογχιολίτιδας στην πρώιμη παιδική ηλικία [16]. Επίσης, σε μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση υποστηρίχθηκε ότι οι πολυμορφισμοί (SNPs) του γονιδίου VDR συσχετίζονται με την εκδήλωση σοβαρής RSV βρογχιολίτιδας [80]. Ακόμα, ο πολυμορφισμός *FokI* έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε πνευμονία της κοινότητος στα παιδιά καθώς και σε ιογενή βρογχιολίτιδα στα βρέφη [81,82]. Σε μια συστηματική ανασκόπηση οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του VDR, και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός *FokI*, συσχετίστηκαν με λοιμώξεις αναπνευστικού από ιούς με περίβλημα και ιδιαίτερα από τον ιό RSV [83]. Αντιθέτως, σε μια μελέτη ασθενών μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε στη Σαουδική Αραβία δεν αναφέρθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά αναφορικά με τη συχνότητα των πολυμορφισμών *TaqI* και *ApaI* σε παιδιά με οξεία λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού σε σύγκριση με τους μάρτυρες [84].

1.7 Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (VDBP) και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα παιδιά

Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D VDBP κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο του γονιδίου *Gc* που εδράζει στο χρωμόσωμα 4q12-q13 [19]. Οι δύο πιο συχνοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* είναι ο *rs7041*, που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος ασπαραγινικού οξέος από το γλουταμινικό οξύ (Asp416Glu) ,και ο *rs4588* που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνη σε λυσίνη (Thr420Lys) [19,20]. Ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από αυτούς τους δύο *SNPs* έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις παραλλαγές του γονιδίου *Gc* (*Gc1F*, *Gc1S* και *Gc2*) οι οποίες κωδικοποιούν τις τρεις ομώνυμες κύριες ηλεκροφορητικές παραλλαγές της VDBP [15,18,19]. Οι παραλλαγές αυτές της VDBP διαφέρουν ως προς τη δεσμευτική ικανότητα προς τους μεταβολίτες της βιταμίνης D το οποίο έχε ως αποτέλεσμα οι παραλλαγές αυτές να συσχετίζονται με διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα των μεταβολιτών της βιταμίνης D και διαφορές στα κυκλοφορόντα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό [22]. Η παραλλαγή Gc1F της VDBP έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα για την 25(OH)D σε σύγκριση με τις άλλες δυο παραλλαγές τη Gc2 και τη Gc1S, και αυτό πιθανά μπορεί να καταλήγει σε πιο αποτελεσματική διανομή της βιταμίνης D στους ιστούς στόχους [38-40]. Επιπροσθέτως, η παραλλαγή *Gc2* έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα κυκλοφορόντα επίπεδα της βιταμίνης D και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D σε σύγκριση με την παραλλαγή *Gc1F* [20,86,87].

Ο ρόλος της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D VDBP στην ανοσιακή απόκριση είναι πολύπλοκος καθώς δρα όχι μόνο σαν κύριος μεταφορέας της βιταμίνης D, η οποία έχει πολλαπλές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες που έχουν ήδη αναλυτικά αναφερθεί παραπάνω, αλλά έχει επίσης και άμεση δράση στην ανοσιακή απόκριση καθώς συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και στη χημειοταξία [22]. Η VDBP ενισχύει την προσέλκυση λευκοκυττάρων από το ενεργοποιημένο πεπτίδιο του συμπληρώματος C5a [15,22]. Επιπλέον, η απογλυκοζυλίωση της VDBP, η οποία

επιτελείται από τα ενεργοποιημένα Τ και Β λεμφοκύτταρα, μετατρέπει τη VDBP σε ένα ισχυρό παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων, τον Gc-MAF [19,88-90]. Ο Gc-MAF αυξάνει την ικανότητα των μακροφάγων για φαγοκυττάρωση μέσω της παραγωγής υπεροξειδίων [90]. Εντούτοις, τα αποτελέσματα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί in vitro έδειξαν ότι η υψηλότερη δραστικότητα του παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων Gc-MAF παρατηρήθηκε με τη γενετική παραλλαγή *Gc1F* του γονιδίου της VDBP, σε σύγκριση με τις παραλλαγές *Gc1S* και *Gc2* [90]. Υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που υποστηρίζουν το ρόλο της VDBP στην ανοσιακή απόκριση και τη συσχέτιση με την ευπάθεια στις λοιμώξεις σε παιδιατρικούς ασθενείς. Συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί της VDBP, και συγκεκριμένα η φορεία της παραλλαγής *Gc1S*, έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε RSV βρογχιολίτιδα και νοσηλεία λόγω αυτής στη βρεφική ηλικία [22].

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της κυκλοφορούσας βιταμίνης D (25(OH)D) είναι εν μέρει γενετικώς καθοριζόμενα [22]. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με τα επίπεδα τόσο της κυκλοφορούσας δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D όσο και με τα κυκλοφορόντα επίπεδα της 25(OH)D [22,86]. Αυτή η δράση φαίνεται να μεσολαβείται κυρίως μέσω της διακύμανσης στις συγκεντρώσεις της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D [22]. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D, και συγκεκριμένα η γενετική παραλλαγή *Gc1S,* έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D στον ορό που έχει ως αποτέλεσμα μικρότερα ποσοστά ελεύθερης διαθέσιμης βιταμίνης D [22]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D στον ορό και της χαμηλότερης επίπτωσης των λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος και του ανώτερου αναπνευστικού (επεισόδια ωτίτιδας) σε παιδιά σχολικής ηλικίας [91]. Ακόμα, η ύπαρξη γενετικών

πολυμορφισμών στο γονίδιο της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφουρούσας βιταμίνης D και χειρότερη ανταπόκριση στη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D [92,93].

1.8 Το μονοπάτι της βιταμίνης D και η συσχέτιση με τη λοίμωξη COVID-19 στα παιδιά

Τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν τα αντιικά αποτελέσματα που μεσολαβούνται μέσω του μονοπατιού της βιταμίνης D, και ιδιαίτερα αναφορικά με τις ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Επομένως, η συσχέτιση του μονοπατιού της βιταμίνης D με τη λοίμωξη COVID-19 στα παιδιά έχει υποτεθεί και έχει ήδη ξεκινήσει να διερευνάται. Ενώ η λοίμωξη COVID-19 είναι ιδιαιτέρως σοβαρή κυρίως στους ηλικιωμένους, όλες οι ηλικιακές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων και των παιδιών είναι ευπαθείς [94]. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι τα παιδιά μολύνονται λιγότερο συχνά από τους ενήλικες από τον ιό SARS-CoV-2 και είναι πιο συχνά είτε ασυμπτωματικά είτε με ηπιότερα συμπτώματα από ότι οι ενήλικες [94].Έχει αναφερθεί ότι η επίπτωση της σοβαρής νόσου COVID-19 στα παιδιά είναι περίπου 10.6% στη βρεφική ηλικία, 7.3% σε παιδιά ηλικίας 1-5 ετών και 4% σε παιδιά ηλικίας 6–15 ετών [95]. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D φαίνεται ότι αυξάνει το κίνδυνο λοιμώξεων αναπνευστικού συμπεριλαμβανομένων αυτών που οφείλονται στον ιό RSV, στον ιό της γρίπης αλλά και στη φυματίωση, ενώ ταυτόχρονα θεωρείται ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εκδήλωση συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας [96]. Μέχρι σήμερα δεν έχουν δημοσιευθεί κλινικές μελέτες που να ελέγχουν την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D στην πρόληψη ή θεραπεία της λοίμωξης COVID-19 στα παιδιά.

Υπάρχουν μοριακές ενδείξεις για την υποστήριξη της αντιιικής δραστηριότητας της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D επάγει την έκφραση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου

καθελικιδίνης που αναφέρεται ότι έχει αντιική δράση κατά των ιών in vitro και της γρίπης A in vivo [97]. Επιπλέον, ο VDR και το CYP27B1 εκφράζονται σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα και η βιταμίνη D ενισχύει την αντιική δράση των βρογχικών επιθηλιακών κύτταρα in vitro και μειώνει την αντιγραφή του ρινοϊού [3-5, 68]. Ενώ αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η βιταμίνη D ενισχύει την απόκριση του ξενιστή κατά των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το μονοπάτι της βιταμίνης D δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, το οποίο περιλαμβάνει το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) [98,99]. Ο SARS - CoV - 2 εισέρχεται στα κύτταρα του ξενιστή μετά από τη δέσμευση στους υποδοχείς ACE2 στο αναπνευστικό σύστημα των ασθενών που έχουν μολυνθεί [100]. Οι πρωταρχικοί στόχοι των κοροναϊών είναι τα πνευμονοκύτταρα τύπου-ΙΙ και υπάρχει υψηλή έκφραση υποδοχέων ACE2 σε αυτά τα κύτταρα [101]. Το ίδιο το ένζυμο ACE2 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του καταρράκτη ρενίνης-αγγειοτενσίνης και σε ένα ζωικό μοντέλο, ένα ανάλογο της 1,25$(OH)_2$D ενίσχυσε την έκφραση ACE2 in vitro [78,102]. Αυτό μπορεί να μην είναι ευεργετικό για τους ασθενείς στα πλαίσια της λοίμωξης από SARS-COV-2 καθώς θεωρείται ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου της αγγεοτενσίνης για υπέρταση, οι οποίοι ενισχύουν την έκφραση ACE2, ενδέχεται να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη σοβαρής λοίμωξης COVID-19 [78,103]. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα κυψελιδικά πνευμονοκύτταρα τύπου-ΙΙ ενισχύονται από τους μεταβολίτες της βιταμίνης D και μειώνουν το επίπεδο των επιφανειοδραστικών αποτελεσμάτων στην αυξημένη επιφανειακή τάση σε ασθενείς με COVID-19 [104,105]. Επίσης, η διπεπτιδυλική πεπτιδάση CD26, η οποία είναι μια πολυλειτουργική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου ΙΙ με ευρεία κατανομή στην κυτταρική μεμβράνη, αποτελεί ένα πιθανό μόριο προσκόλλησης του SARS-COV-

2 για εισβολή στα κύτταρα του ξενιστή και έχει φανεί ότι η αποκατάσταση της ανεπάρκειας της βιταμίνης D μπορεί να καταστέλλει την έκφραση του μορίου CD26 [101,106]. Η βιταμίνη D μπορεί επίσης να μειώσει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και της ιντερφερόνης γάμμα (IFNγ), οι οποίοι και οι δύο αποτελούν ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες για χειρότερη κλινική έκβαση σε σοβαρή νόσο COVID-19 [101,106]. Επομένως, αυτά τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης D μπορεί να έχει δυνητικό ρόλο ως παθογόνος παράγοντας στην COVID- 19.

Ο Yilmaz και οι συνεργάτες του εκπόνησαν την πρώτη μελέτη ασθενών μαρτύρων σε παιδιατρικούς ασθενής που εκτίμησε τη συσχέτιση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό με τα κλινικά ευρήματα της λοίμωξης COVID-19 [101]. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους παιδιατρικούς ασθενείς με COVID-19 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [101]. Επίσης, μια αναδρομική μελέτη κοορτής που πραγματοποιήθηκε σε103 παιδιατρικούς ασθενείς με COVID-19 έδειξε ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης D συσχετίστηκε με την σοβαρότητα της λοίμωξης COVID-19 και με τους δείκτες φλεγμονής, ιδιαίτερα στην ομάδα των εφήβων [107]. Επιπροσθέτως, τα δεδομένα από μια προοπτική μελέτη κοορτής σε παιδιατρικούς ασθενής με COVID-19 έδειξαν ότι η λοίμωξη από SARS-COV-2 με υψηλότερα ιικά φορτία συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό [108].

Επίσης, έχει μελετηθεί και η συσχέτιση του γενετικού προφίλ αναφορικά με τη VDBP, και συγκεκριμένα η συχνότητα του αλληλόμορφου *VDBP1 (Gc1F* και *Gc1S*) σε 55 χώρες με τα δεδομένα της επίπτωσης και της θνητότητας από την COVID-19 και οι ερευνητές κατέληξαν ότι η συχνότητα του αλληλόμορφου *VDBP1* συσχετιζόταν αντίστροφα με χαμηλότερα ποσοστά επίπτωσης και θνητότητας από COVID-19 [109,110]. Αυτά τα ευρήματα θα μπορούσαν να εξηγηθούν εν μέρει από τα πιθανά

υψηλότερα προστατευτικά επίπεδα της βιταμίνης D καθώς τα υψηλότερα επίπεδα βιταμίνης D βρέθηκαν στους ασθενείς με το αλληλόμορφο αυτό [109,110]. Οι συγγραφείς εξήγησαν τα παραπάνω δεδομένα και πρότειναν ότι το γενετικό προφίλ της VDBP μπορεί να εμπλέκεται και στη λοίμωξη COVID-19 στα παιδιά [111]. Επιπλέον, ο Spadera και οι συνεργάτες πρότειναν ότι η VDBP που μετατρέπεται στον παράγονται ενεργοποίησης των μακροφάγων GcMaf, μπορεί να ρυθμίζει την απόκριση του ξενιστή έναντι του COVID-19 και τη σοβαρότητα της λοίμωξης και πρότειναν να ελέγχεται σε όλους τους ασθενείς με COVID -19 για την παροχή πρώιμων θεραπευτικών παρεμβάσεων [112].

Από την έναρξη της πανδημίας COVID-19, μια σειρά αναφορών σε όλο τον κόσμο περιέγραψε ομάδες παιδιών και εφήβων που παρουσιάζουν ένα απειλητικό για τη ζωή, υπερφλεγμονώδες σύνδρομο, που ονομάζεται παιδιατρικό φλεγμονώδες πολυσυστηματικό σύνδρομο που σχετίζεται προσωρινά με τον SARS-CoV-2 (PIMS-TS) ή πολυσυστηματικό φλεγμονώδες σύνδρομο στα παιδιά (MIS-C) [113]. Η ανάπτυξη προγνωστικών βιοδεικτών και η εφαρμογή νέων τρόπων θεραπείας θα είχαν σημαντικό αντίκτυπο στην κλινική πρακτική όσον αφορά την έκβαση του MIS-C. Η βιταμίνη D θα μπορούσε να είναι πιθανός υποψήφιος. Μελέτες παρατήρησης οδήγησαν σε προτεινόμενη σύνδεση μεταξύ μειωμένων επιπέδων της κυκλοφορούσας μορφής βιταμίνης D, 25(OH)D, και σοβαρής ή κρίσιμης λοίμωξης του SARS-CoV-2 σε ενήλικες [113,114]. Έχει αναφερθεί ότι σε σοβαρή ασθένεια, η μεγαλύτερη φλεγμονώδης διαδικασία οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάγκη για βιταμίνη D με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της· [113]. Έτσι, σε σοβαρή ασθένεια, όπως είναι και το MIS-C, αυξάνεται η κατανάλωση της βιταμίνης D στα κύτταρα που εμπλέκονται στην ανοσοτροποποίηση, με αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό. Επομένως, τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό σε σοβαρές λοιμώξεις και σε MIS-C μπορεί να είναι αποτέλεσμα της σοβαρότητας της νόσου και όχι να αποτελούν

προδιαθεσικό παράγοντα [66]. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με τη νόσο Kawasaki σε παιδιά [113-115]. Έως σήμερα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη βιταμίνη D και το MIS-C σε παιδιά.

1.9 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου των επιπέδων της βιταμίνης D και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D στον ορό και των γονοτυπικών διαφορών στο μονοπάτι της βιταμίνης D, και συγκεκριμένα των πολυμορφισμών SNPs του υποδοχέα VDR, της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D που αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη φορέα στο αίμα, και του ενζύμου ενεργοποίησης 1-α-υδροξυλάση CYP27B1, στην ανοσιακή απόκριση του ξενιστή στις λοιμώξεις στη βρεφική ηλικία. Επίσης, σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση ύπαρξης πιθανής συσχέτισης μεταξύ του γονότυπου για τους υπό μελέτη SNPs με τα επίπεδα της 25(OH)D και VDBP στον ορό των βρεφών. Μέχρι σήμερα τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο του μονοπατιού της βιταμίνης D στην ευπάθεια σε λοιμώξεις σε αυτή την ηλικιακή ομάδα είναι περιορισμένα. Ταυτόχρονα, η μελέτη σε αυτή την ηλικιακή ομάδα είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς οι λοιμώξεις αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας, θνησιμότητας και νοσηλείας στη βρεφική ηλικία. Η συσχέτιση γονότυπου με φαινότυπο μπορεί να αναδείξει συγκεκριμένους πληθυσμούς βρεφών υψηλού κινδύνου που μπορεί να ωφεληθούν προληπτικές παρεμβάσεις, όπως η χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης D. Οι γονοτυπικές διαφορές ανάμεσα στα βρέφη μπορεί να εξηγούν τη διαφορετική ανοσολογική απόκριση στις λοιμώξεις στη βρεφική ηλικία, όπως και πιθανά τη διαφορετική ανταπόκριση στη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D και στην προσπάθεια επίτευξης φυσιολογικών επιπέδων στον ορό.

2. Μεθοδολογία

Πρόκειται για προοπτική μελέτη ασθενών μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και στο Εργαστήριο Υγείας Παιδιού του τομέα Μητέρας- Παιδιού της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με αντικείμενο τη μελέτη του μονοπατιού της βιταμίνης D και της συσχέτισης με την ευπάθεια σε λοιμώξεις στα βρέφη. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον Ιούλιο 2015 έως τον Ιούνιο 2021.

2.1 Πληθυσμός μελέτης

Ο πληθυσμός της μελέτης αυτής αποτελούνταν στην ομάδα των ασθενών από κατά τα άλλα υγιή βρέφη ηλικίας 0-24 μηνών τα οποία νοσηλεύτηκαν είτε λόγω βακτηριακής είτε λόγω ιογενούς λοίμωξης (cases). Στην ομάδα ελέγχου εντάχθηκαν υγιή βρέφη ηλικίας 0-24 μηνών τα οποία νοσηλεύτηκαν για άλλους λόγους εκτός από λοίμωξη, όπως για παράδειγμα ατυχήματα ή διερεύνηση στα πλαίσια κατάστασης που δεν σχετίζεται με λοίμωξη ούτε προδιαθέτει σε λοιμώξεις όπως η διερεύνηση στα πλαίσια αιμαγγειωμάτων για την έναρξη αγωγής (controls). Αναλυτικότερα, τα βρέφη με βακτηριακή λοίμωξη στην ομάδα των ασθενών είχαν είτε μικροβιολογική επιβεβαίωση με θετική καλλιέργεια είτε η διάγνωση ήταν βασισμένη σε επιδημιολογικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα (πυρετός, εστία λοίμωξης, απεικονιστικά και εργαστηριακά ευρήματα ενδεικτικά βακτηριακής λοίμωξης). Τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη είχαν συμβατά κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα (πυρετός, εστία λοίμωξης, απεικονιστικά και εργαστηριακά ευρήματα ενδεικτικά ιογενούς λοίμωξης). Στην ομάδα ελέγχου εντάχθηκαν υγιή βρέφη τα οποία νοσηλεύτηκαν για άλλους λόγους εκτός από λοίμωξη, όπως για παράδειγμα ατυχήματα ή διερεύνηση στα πλαίσια κατάστασης που δεν σχετίζεται με λοίμωξη ούτε προδιαθέτει σε λοιμώξεις, όπως για παράδειγμα η διερεύνηση στα πλαίσια αιμαγγειωμάτων για την έναρξη αγωγής. Κριτήρια

αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν η ηλικία >24 μήνες ζωής, η προωρότητα με ηλικία κύησης<36 εβδομάδες και η διάγνωση συννοσηροτήτων που μπορεί να προδιαθέτουν σε ευπάθεια σε λοιμώξεις (για παράδειγμα η ύπαρξη συγγενούς καρδιοπάθειας, πολλαπλών συγγενών ανωμαλιών, συγγενείς ή επίκτητες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλούν ανοσοκαταστολή, συγγενείς ή επίκτητες διαταραχές που προκαλούν χρόνιες πνευμονοπάθειες ή νοσήματα του ανώτερου αεραγωγού). Η ομάδα ελέγχου ελέγχθηκε και αναδρομικά μετά την ένταξη και όσα βρέφη νοσηλεύτηκαν λόγω λοίμωξης κατά τη διάρκεια των δυο πρώτων ετών ζωής αποκλείστηκαν από τη μελέτη αναδρομικά. Επομένως, τα βρέφη της ομάδας ελέγχου της μελέτης ήταν υγιή βρέφη χωρίς ιστορικό νοσηλείας λόγω λοίμωξης κατά τη διάρκεια των δυο πρώτων ετών της ζωής. Όλοι οι ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη, ασθενείς και μάρτυρες, ανήκαν στην Καυκάσια φυλή.

Τα επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα των ασθενών που εντάχθηκαν στη μελέτη καταγράφηκαν σε φόρμα excel. Το μέγεθος του δείγματος προσδιορίστηκε με βάση τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα με το πρόγραμμα υπολογισμού πληθυσμού για προοπτικές μελέτες G* Power 3.1.6 and Power and Sample Size Program, για power της μελέτης 0,8.

2.2 Επιλογή των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που μελετήθηκαν

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων (SNPs) του υποδοχέα *VDR*, του γονιδίου της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D *Gc* και του ενζύμου ενεργοποίησης 1-α-υδροξυλάση *CYP27B1* που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν αυτοί που είχαν ήδη διερευνηθεί και συσχετιστεί με διαφορετική εκδήλωση φαινοτύπων στη βιβλιογραφία. Οι πολυμορφισμοί SNPs που μελετήθηκαν ήταν για τον γονίδιο του υποδοχέα *VDR* οι *FokI* (*G/A*), *BsmI* (*A/G*), *ApaI* (*G/T*) *και TaqI* (*T/C*). Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο του γονιδίου *Gc* που

εδράζει στο χρωμόσωμα 4q12-q13 [19]. Οι δύο πιο συχνοί SNPs του γονιδίου *Gc* είναι ο *rs7041* (*T/G*) στο εξόνιο 11 του *Gc* που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος ασπαραγινικού οξέος από το γλουταμινικό οξύ (Asp416Glu) στην VDBP και ο *rs4588* (*C/A*) εξόνιο 11 του *Gc* που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνη από τη λυσίνη (Thr420Lys) στην VDBP [19,20]. Ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από αυτούς τους δύο *SNPs* έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *Gc* (Gc1F: *rs7041*T-*rs4588*C, Gc1S: *rs7041*G-*rs4588*C και Gc2: *rs7041*T-*rs4588*A) οι οποίες κωδικοποιούν τις τρεις κύριες ηλεκτροφορητικές παραλλαγές της VDBP [15,19,20]. Οι SNPs *rs7041* και *rs4588* έχουν συσχετιστεί με διαφορετική δεσμευτική ικανότητα της VDBP για τη βιταμίνη D, διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D και συνεπώς με διαφορετική εκδήλωση κλινικών φαινοτύπων. Ως εκ τούτου, επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Τέλος για το γονίδιο του ενζύμου 1-α υδροξυλάση επιλέχθηκε να μελετηθεί ο πολυμορφισμός του υποκινητή του γονιδίου *CYP27B1-1260 promoter polymorphism (rs10877012)* (A/C) που εδράζει στο χρωμόσωμα 12q13.1-13.3 [21]. Ο πολυμορφισμός *CYP27B1-1260 promoter* έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα του δραστικού μορίου $1,25(OH)_2D$ στον ορό και έχει συσχετιστεί με την λοίμωξη από ηπατίτιδα Β και αυτοάνοσα νοσήματα σε ενήλικες [5].

2.3 Γονοτύπηση και διερεύνηση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs)

Για τη γονοτύπηση και τη διερεύνηση των υπό μελέτη SNPs αρχικά πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων ολικού περιφερικού αίματος σε σωληνάρια που περιείχαν EDTA κατά τη διενέργεια του διαγνωστικού ελέγχου στα πλαίσια της νοσηλείας των βρεφών χωρίς να πραγματοποιηθεί επιπλέον αιμοληψία για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής. Μετά τη συλλογή τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν στους καταψύκτες του Εργαστηρίου Υγείας-Παιδιού του τομέα Μητέρας Παιδιού, σε θερμοκρασία -20° C έως

την ανάλυση τους. Στη συνέχεια, από τα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα περιφερικά λευκοκύτταρα χρησιμοποιώντας ένα kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες και το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Έπειτα, μετά την απομόνωση του DNA έγινε ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε DNA σε κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας το μηχάνημα NanoDrop ND-1000 έκδοση 3.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) και ακολούθως τα δείγματα φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -20° C έως τη γονοτύπηση. Στη συνέχεια, για τη γονοτύπηση των πολυμορφισμών αρχικά πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων (primers) για τον κάθε υπό μελέτη πολυμορφισμό SNP. Οι αλληλουχίες των ειδικών εκκινητών των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε υπό μελέτη SNP παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε υπό μελέτη πολυμορφισμό SNP παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3. Μετά τη διενέργεια του πολλαπλασιασμού του DNA με PCR και ειδικούς εκκινητές πραγματοποιήθηκε πέψη με περιοριστικά ένζυμα ειδικά για τον κάθε υπό μελέτη πολυμορφισμό. Τα προϊόντα της πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα διαχωρίστηκαν με τη διενέργεια ηλεκτροφόρησης σε 2.5% gel αγαρόζης, στο οποίο είχε γίνει χρώση με SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) και απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 312-nm. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP και με κεφαλαίο γράμμα για την απουσία του. Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη διενέργεια PCR και RFLP για τον προσδιορισμό του γονότυπου για κάθε *SNP* που μελετήθηκε παρατίθενται παρακάτω.

SNP	Primer	Αλληλουχία (5΄-> 3΄)	Μέγεθος θραύσματος
ApaI	Forward Reverse	CAGAGCATGGACAGGGAGCAA GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC	740bp uncleaved, 530bp, 210bp
BsmI	Forward Reverse	CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG	825bp uncleaved, 650bp, 175 bp
FokI	Forward Reverse	AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC	265 bp uncleaved, 196bp, 69bp
TaqI	Forward Reverse	CAGAGCATGGACAGGGAGCAA GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC	740bp uncleaved, 495bp, 245 bp or 290 bp, 205 bp
Gc HaeIII	Forward Reverse	AAATAATGAGCAAATGAAAGAAGAC CAATAACAGCAAAGAAATGAGTAGA	483 bp uncleaved, 297 bp, 186 bp
Gc StyI	Forward Reverse	AAATAATGAGCAAATGAAAGAAGAC CAATAACAGCAAAGAAATGAGTAGA	483 bp uncleaved, 305 bp, 178 bp
CYP27B1 -1260 promoter	Forward Reverse	GTGTTCCCTAAGTGTTGTCTC GCTGACTCGGTCTCCTCTG	666 bp uncleaved, 490 bp, 176 bp

Πίνακας 2. Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των θραυσμάτων που περιείχαν τους SNPs: *VDR* (*TaqI, BsmI, FokI, ApaI)*, VDBP *Gc* (*rs4588, rs7041*) και *CYP27B1* (*rs10877012*) και το μέγεθος των θραυσμάτων που προκύπτει από την RFLP

SNP	Συνθήκες PCR
VDR ***ApaI, TaqI***	Αρχική θέρμανση στους 94ºC για 3 min 35 κύκλους από: 94ºC για 30 sec, 59ºC για 30 sec, 72ºC για 30 sec Τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 94ºC για 10 min
VDR ***BsmI***	Αρχική θέρμανση στους 94ºC για 3 min 35 κύκλους από: 94ºC για 30 sec, 57ºC για 30 sec, 72ºC για 30 sec Τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72ºC για 10 min
VDR ***FokI***	Αρχική θέρμανση στους 94ºC για 3 min 36 κύκλους από: 94ºC για 30 sec, 58ºC για 30 sec, 72ºC για 30 sec Τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72ºC για 10 min
Gc (VDBP) ***rs7041, rs4588***	Αρχική θέρμανση στους 95ºC για 15 min 35 κύκλους από: 94ºC για 45 sec, 51ºC για 45 sec, 72ºC για 45 sec Τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72ºC για 7 min
CYP27B1-1260 promoter rs10877012	Αρχική θέρμανση στους 94ºC για 5 min 30 κύκλους από: 94ºC για 45 sec, 58ºC για 45 sec, 72ºC για 45 sec Τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72ºC για 7 min

Πίνακας 3. Οι συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό με PCR των *SNP* που μελετήθηκαν VDR (*ApaI*, *TaqI*, *BsmI*, *FokI*), Gc (*rs7041*, *rs4588*) και *CYP27B1-1260 promoter*.

2.3.1 Γονοτύπηση πολυμορφισμών *TaqI* και *ApaI* του *VDR*

Για τη γονοτύπηση των πολυμορφισμών *TaqI* και *ApaI* του γονιδίου *VDR* αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα δείγματα του ολικού περιφερικού

αίματος χρησιμοποιώντας ένα kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany) και έπειτα πολλαπλασιασμός του DNA σε κάθε δείγμα με PCR. Το μείγμα της αντίδρασης για τη διενέργεια του πολλαπλασιασμού με PCR για τους πολυμορφισμούς *TaqI* και *ApaI* περιελάβανε 20 μl από το έτοιμο μείγμα master mix (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen) που περιλαμβάνει τα απαραίτητα νουκλεοτίδια και το ένζυμο DNA πολυμεράση για την πραγματοποίηση της PCR, 0.8 μl εκκινητή (primer forward), 0.8 μl αντίστροφο εκκινητή (primer reverse) και από το κάθε δείγμα ποσότητα σε μl που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση DNA 150 ng/μl και νερό H2O έως 40μl συνολικό όγκο, αναλόγως τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε DNA (οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2). Πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων από τον πολλαπλασιασμό της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *ApaI* και *TaqI* (Takara, United States) αντιστοίχως. Για την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο για τον πολυμορφισμό *TaqI* για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl TaqIBuffer, 1 μl περιοριστικού ενζύμου *TaqI,* 2 μl 0.1% BSA και 10 μl νερό. Ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 65° C για 16 h. Για τον πολυμορφισμό *ApaI* για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl Buffer, 1 μl περιοριστικού ενζύμου *ApaI* και 12 μl νερό. Ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 37° C για 1 h. Τα προϊόντα της πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα διαχωρίστηκαν με τη διενέργεια ηλεκτροφόρησης σε 2.5% gel αγαρόζης, στο οποίο είχε γίνει χρώση με SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) και απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 312-nm. Το μέγεθος των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα περιγράφεται στον Πίνακα 2. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση

μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα *t* και *a* για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP *TaqI* και *ApaI* αντίστοιχα, και με κεφαλαίο γράμμα *T* και *A* για την απουσία του, αντιστοίχως.

2.3.2 Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *FokI* του *VDR*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα δείγματα του ολικού περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας ένα kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany). Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού *FokI* του γονιδίου *VDR* πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός DNA για το κάθε δείγμα με PCR και έπειτα πέψη με ειδική περιοριστική ενδονουκλεάση και ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Το μείγμα της αντίδρασης για τη διενέργεια πολλαπλασιασμού με PCR για τον πολυμορφισμό *FokI* περιελάβανε 10 μl από το έτοιμο μείγμα master mix (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen), 0.6 μl εκκινητή (primer forward), 0.6 μl αντίστροφο εκκινητή (primer reverse) (οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2), και από το κάθε δείγμα ποσότητα σε μl που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση DNA 150 ng/μl και νερό H2O έως 20μl (συνολικό όγκο), ανάλογα με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με PCR με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων από την PCR με το περιοριστικό ένζυμο *FokI* (Takara, United States): χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl Buffer, 1 μl περιοριστικού ενζύμου *FokI,* 2 μl 0.1% BSA και 10 μl νερό και ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 37° C για 16h. Τα προϊόντα της πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα διαχωρίστηκαν με τη διενέργεια ηλεκτροφόρησης σε 2.5% gel αγαρόζης, στο οποίο είχε γίνει χρώση με SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) και

απεικονίστηκαν με χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 312-nm. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Το μέγεθος των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα περιγράφεται στον Πίνακα 2. Στη συνέχεια, ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα *f* για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP *FokI* και με κεφαλαίο γράμμα *F* για την απουσία του, αντιστοίχως.

2.3.3 Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *BsmI* του *VDR*

Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού *BsmI* του γονιδίου *VDR* αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα δείγματα του ολικού περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας ένα kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany) και στη συνέχεια πολλαπλασιασμός του DNA για το κάθε δείγμα με PCR. Το μείγμα της αντίδρασης για τη διενέργεια πολλαπλασιασμού με PCR για τον πολυμορφισμό *BsmI* περιελάβανε 10 μl από το έτοιμο μείγμα master mix (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen), 0.6 μl εκκινητή (primer forward), 0.6 μl αντίστροφο εκκινητή (primer reverse) (οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2), από το κάθε δείγμα ποσότητα σε μl που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση DNA 150 ng/μl και νερό H2O έως 20μl συνολικό όγκο, αναλόγως τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με PCR με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων από τον πολλαπλασιασμό της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *BsmI* (Takara, United States): χρησιμοποιήθηκαν 5 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl Buffer, 1 μl περιοριστικού ενζύμου *FokI*, και 18 μl νερό. Ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 37° C για 16 h. Τα προϊόντα της πέψης από τα περιοριστικά ένζυμα διαχωρίστηκαν με τη διενέργεια ηλεκτροφόρησης

σε 2.5% gel αγαρόζης, στο οποίο είχε γίνει χρώση με SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) και απεικονίστηκαν με χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 312-nm. Το μέγεθος των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα περιγράφεται στον Πίνακα 2. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα *b* για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP *BsmI* και με κεφαλαίο γράμμα *B* για την απουσία του, αντιστοίχως.

2.3.4 Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *rs7041* του γονιδίου *Gc*

Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού *rs7041* του γονιδίου *Gc* αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα δείγματα του ολικού περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας ένα kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany) και ακολούθως πολλαπλασιασμός DNA για το κάθε δείγμα με PCR. Το μείγμα της αντίδρασης για τη διενέργεια πολλαπλασιασμού με PCR για τον πολυμορφισμό *rs7041 (HaeIII)* περιελάβανε 20 μl από το έτοιμο μείγμα master mix (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen), 0.8 μl εκκινητή (primer forward), 0.8 μl αντίστροφο εκκινητή (primer reverse) (οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2), και από το κάθε δείγμα ποσότητα σε μl που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση DNA 150 ng/μl και νερό H2O έως συνολικά 35μl συνολικό όγκο, αναλόγως τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με PCR με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων από τον πολλαπλασιασμό της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII* (Thermo Fisher Scientific | Waltham, United States): χρησιμοποιήθηκαν 10 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl Buffer R, 2 μl περιοριστικού ενζύμου HaeIII/ BSURI, και 18

μl νερό. Ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 37° C για 16 h. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα *h* για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP *Gc rs7041* (*T/G*) και με κεφαλαίο γράμμα *H* για την απουσία του, αντιστοίχως. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από τη γονοτύπηση των *rs7041* και *rs4588* σε κάθε βρέφος και έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *Gc Gc1S*: *rs7041*T-*rs4588*C, *Gc1S*: *rs7041*G-*rs4588*C και Gc2: *rs7041*T-*rs4588*A.

2.3.5 Γονοτύπηση του πολυμορφισμού *rs4588* του γονιδίου *Gc*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα δείγματα του ολικού περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας ένα kit απομόνωσης DNA (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany). Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού *rs4588* του γονιδίου *Gc* πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός DNA για το κάθε δείγμα με PCR και έπειτα πέψη με ειδική περιοριστική ενδονουκλεάση και ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Το μείγμα της αντίδρασης για τη διενέργεια πολλαπλασιασμού με PCR για τον πολυμορφισμό *StyI* περιελάβανε 20 μl από το έτοιμο μείγμα master mix (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen), 0.8 μl εκκινητή (primer forward), 0.8 μl αντίστροφο εκκινητή (primer reverse) (οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2), και από το κάθε δείγμα ποσότητα σε μl που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση DNA 150 ng/μl και νερό H2O έως 35μl συνολικό όγκο, αναλόγως τη συγκέντρωση του δείγματος μας σε DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων από τον πολλαπλασιασμό της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *StyI (Eco1301)* (Thermo Fisher Scientific | Waltham, United

States): χρησιμοποιήθηκαν 10 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl Buffer O, 2 μl περιοριστικού ενζύμου *StyI (Eco1301),* και 18 μl νερό. Ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 37° C για 16 h. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα *s* για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP *Gc rs4588* (*C/A*) και με κεφαλαίο γράμμα *S* για την απουσία του, αντιστοίχως. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από τη γονοτύπηση των *rs7041* και *rs4588* σε κάθε βρέφος και έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *Gc Gc1S*: *rs7041*T-*rs4588*C, *Gc1S*: *rs7041*G-*rs4588*C και Gc2: *rs7041*T-*rs4588*A.

2.3.6 Γονοτύπηση του πολυμορφισμού του υποκινητή του γονιδίου του ενζύμου 1-α-υδροξυλάση *CYP27B1-1260- promoter rs10877012*

Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού του υποκινητή του γονιδίου του ενζύμου 1-α-υδροξυλάση *CYP27B1-1260-promoter (rs10877012) (A/C)* πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός DNA για το κάθε δείγμα με PCR και έπειτα πέψη με ειδική περιοριστική ενδονουκλεάση και ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Το μείγμα της αντίδρασης για τη διενέργεια του πολλαπλασιασμού με PCR για τον πολυμορφισμό *CYP27B1-1260- promoter rs10877012* περιελάβανε 10 μl από το έτοιμο μείγμα master mix (*Taq* PCR Master Mix Kit, Qiagen), 0.6 μl εκκινητή (primer forward), 0.6 μl αντίστροφο εκκινητή (primer reverse) (οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2), και από το κάθε δείγμα ποσότητα σε μl που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση DNA 150 ng/μl και νερό H_2O έως 20μl συνολικό όγκο, αναλόγως τη συγκέντρωση του δείγματος σε DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Έπειτα

πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων από τον πολλαπλασιασμό της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *Pfel* (Thermo Fisher Scientific | Waltham, United States): χρησιμοποιήθηκαν 10 μl από το προϊόν της PCR του κάθε δείγματος, 2μl Buffer O, 2 μl περιοριστικού ενζύμου *Pfel (Tfil),* και 18 μl νερό. Ακολούθησε πέψη σε θερμοκρασία 37° C για 16 h. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την ανάλυση μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP). Ο γονότυπος για τον κάθε ασθενή σχεδιάστηκε με μικρό γράμμα *c* για την παρουσία της περιοχής περιορισμού δηλαδή του πολυμορφισμού SNP *CYP27B1-1260-promoter* (*A/C*) και με κεφαλαίο γράμμα *C* για την απουσία του, αντιστοίχως.

2.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της βιταμίνης D και VDBP στον ορό

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της βιταμίνης D στα βρέφη επιλέχθηκε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της 25(OH)D στον ορό που αποτελεί τον καλύτερο δείκτη των επιπέδων της βιταμίνης D στον άνθρωπο καθώς είναι ο κύριος μεταβολίτης που κυκλοφορεί στο αίμα [1]. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της 25(OH)D και VDBP στον ορό των ασθενών και της ομάδας ελέγχου έγινε με την ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Τα δείγματα ορού είχαν συλλεχθεί από τους ασθενείς και τους μάρτυρες κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -80° C στο «Εργαστήριο Υγείας Παιδιού» του Τομέα Μητέρας Παιδιού έως την πραγματοποίηση της Elisa. Η διαδικασία γενικά βασίζεται στην αρχική ένωση του υπό μελέτη βιομορίου με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (σε πολλές περιπτώσεις προσδεμένο εκ των προτέρων στα βοθρία της παρεχόμενης μικροπλάκας 96 βοθρίων) και στην ακόλουθη ένωση του δημιουργηθέντος συμπλέγματος με πολυκλωνικό αντίσωμα, το οποίο σε άλλο άκρο είναι συνδεδεμένο-σημασμένο με ένζυμο. Στο σύμπλοκο αυτό προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου και ακολουθεί ενζυμική αντίδραση, από την οποία προκύπτει

χρώμα. Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται μετά από καθορισμένο χρόνο επώασης και μετράται η ένταση του χρώματος, που είναι ανάλογη της ποσότητας της υπό εξέταση ουσίας, που έχει αντιδράσει με το αντίσωμα. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιείται στο συνιστώμενο από τον κατασκευαστή μήκος κύματος και οι συγκεντρώσεις υπολογίζονται με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται από την οπτική απορρόφηση γνωστών συγκεντρώσεων της προς μέτρηση ουσίας (standards) που έχουν προστεθεί στη διαδικασία.

2.4.1 Προσδιορισμός επιπέδων της 25(OH)D στον ορό

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της βιταμίνης D προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της 25(OH)D, που αποτελεί την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D. Χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο για χρήση 25-OH-Vitamin D ELISA kit από την εταιρεία Enzo Life Sciences (NY, USA). Αναλυτικότερα και ειδικότερα στο συγκεκριμένο kit, το ρυθμιστικό διάλυμα διάστασης (Dissociation Buffer) προστέθηκε στα πηγαδάκια τα οποία είναι επικαλυμμένα με Donkey anti-Sheep IgG. Έπειτα, 10μl γνωστής συγκέντρωσης 25(OH)D σε διαφορετικές αραιώσεις (standards) και τα δείγματα εις διπλούν προστέθηκαν στα αντίστοιχα βοθρία και πραγματοποιήθηκε διάσταση της 25(OH)D από τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D VDBP. Μετά από επώαση 5 λεπτών υπό ανάμειξη, προστέθηκε 50μl διάλυματος 25(OH)VitD3 συζευγμένης με αλκαλική φωσφατάση, ακολουθούμενο από 50μl sheep-anti-25(OH)D μονοκλωνικού αντισώματος. Ακολούθησε 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της οποίας το αντίσωμα συνδέθηκε με την περιεχόμενη στο δείγμα 25(OH)D με ανταγωνιστικό τρόπο και το ίδιο δεσμεύτηκε από το Donkey αντι-sheep IgG αντίσωμα. Στη συνέχεια, η πλάκα πλύθηκε ώστε να απομακρυνθούν κατάλοιπα των αντιδραστηρίων και μη συζευγμένο υλικό και παρέμεινε μόνο το σύμπλοκο δεσμευμένης 25(OH)D από τα δείγματα ή το συζυγές με την αλκαλική φωσφατάση.

Στη συνέχεια 200μl υποστρώματος pNpp (p-nitrophenyl phosphate) προστέθηκε ξεκινώντας μια καταλυόμενη αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης που δημιούργησε κίτρινο χρώμα στο περιεχόμενο κάθε βοθρίου. Η αντίδραση τερματίστηκε μετά από επώαση 30 min με προσθήκη 50μl διάλυματος διακοπής (stop solution). Η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου προσδιορίστηκε σε φωτόμετρο μικροπλάκας στα 405 nm. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων έγινε με δημιουργία πρότυπης καμπύλης (4 parameter logistic (4PL) curve fit) από τα standards. Η απορρόφηση είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα της περιεχόμενης στο δείγμα 25(OH)D.

2.4.2 Προσδιορισμός επιπέδων της VDBP στον ορό

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D στα δείγματα ορού πραγματοποιήθηκε με το kit Quantikine ELISA Human Vitamin D BP Immunoassay kit (R&D Systems,Inc). Έγινε αραίωση 5000x κάθε δείγματος με τον παρεχόμενο Calibrator Diluent RD5P σε σωληνάρια eppendorfs. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μl από τα standards (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/ml) και τα αραιωμένα δείγματα αντιστοίχως σε κάθε βοθρίο της μικροπλάκας το οποίο ήταν προεπικαλλυμένο με VDBP ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για δυο ώρες υπό ανάδευση, ώστε να δεσμευτεί η οποιαδήποτε ποσότητα VDBP περιέχεται στα δείγματα από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (washing buffer) για 4 φορές και απορρίφθηκαν τυχόν μη δεσμευμένες ουσίες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl μονοκλωνικού για την VDBP αντίσωματος συνδεδεμένο με ένζυμο (horseradish peroxidaseHuman Vitamin D BP Conjugate) και πραγματοποιήθηκε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση. Μετά από έκπλυση, ως αναφέρεται ανωτέρω, προστέθηκαν 200 μl υποστρώματος (Substrate Solution) σε κάθε βοθρίο και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

απουσία φωτός. Με την προσθήκη αυτή του Substrate Solution αναπτύχθηκε χρώμα ανάλογα με την ποσότητα της VDBP που υπάρχει στο δείγμα και δεσμεύεται στο αρχικό στάδιο. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη ειδικού διαλύματος (stop solution) και στη συνέχεια η οπτική πυκνότητα κάθε βοθρίου μετρήθηκε σε φωτόμετρο για μικροπλάκες στα 450 nm. Από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων για κάθε δείγμα αφαιρέθηκε η μέση οπτική πυκνότητα του βοθρίου για τη μη ειδική σύνδεση (Blank). Δημιουργήθηκε καμπύλη (four parameter logistic (4-PL) curve-fit) με τη μέση απορρόφηση για κάθε standard στον άξονα Y έναντι της συγκέντρωσης στον άξονα X. Η συγκέντρωση υπολογίστηκε για κάθε δείγμα από την καμπύλη και πολλαπλασιάστηκε με τον παράγοντα αραίωσης. Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν οι συγκεντρώσεις της VDBP στο κάθε δείγμα.

2.5 Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα των ασθενών της μελέτης καταγράφηκαν σε Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Η συχνότητα των αλληλόμορφων για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς SNPs του γονιδίου του υποδοχέα VDR (*FokI, BsmI, ApaI* και *TaqI*) και του υποκινητή-1260 του ενζύμου ενεργοποίησης 1-α-υδροξυλάση *CYP27B1* (*rs10877012)* συγκρίθηκαν μεταξύ της ομάδας των «ασθενών-cases» (βρέφη με βακτηριακή ή ιογενή λοίμωξη) και της ομάδας «ελέγχου-controls» χρησιμοποιώντας πίνακες συχνοτήτων και μη παραμετρική δοκιμασία ανάλυσης κατηγορικών μεταβλητών το two-tailed Fischer exact test και προσδιορίστηκαν η τιμή σημαντικότητας p-value, ο λόγος αναλογιών odds ratio (OR) και τα κατώτερα και ανώτερα όρια των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% confidence interval). Η στατιστική ανάλυση αναφορικά με τους πολυμορφισμούς της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D VDBP πραγματοποιήθηκε μετά από την κατασκευή των γονοτύπων της VDBP που προκύπτουν από το συνδυασμό των γονοτύπων για τους δύο

πολυμορφισμούς *rs4588* και *rs7041* του γονιδίου *Gc* (*Gc1F*: *rs7041*T-*rs4588*C, *Gc1S*: *rs7041*G-*rs4588*C και *Gc2*: *rs7041*T-*rs4588*). Η συχνότητα των τριών γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *Gc Gc1F*, *Gc1S* και *Gc2* συγκρίθηκε μεταξύ των ασθενών με βακτηριακή ή ιογενή λοίμωξη και της ομάδας ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε σε πίνακες συχνοτήτων, σε υπολογισμό odds ratio (OR) και των κατώτερων και ανώτερων ορίων των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% confidence interval) και πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μη παραμετρικό τεστ κατηγορικών μεταβλητών, το two-tailed Fisher's exact test. Η ανάλυση των ποσοτικών δεδομένων, δηλαδή των επιπέδων- συγκεντρώσεων της 25(OH)D και της VDBP στον ορό μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου πραγματοποιήθηκε με μη παραμετρική δοκιμασία, το two-tailed Mann-Whitney test. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συσχέτισης των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό με τα επίπεδα της VDBP στον ορό στα βρέφη της μελέτης με τη μέθοδο correlation coefficient του Spearman. Ακόμα, έγινε στατιστική ανάλυση για την ύπαρξη ή μη ανεπάρκειας της βιταμίνης D, όπου η ανεπάρκεια της βιταμίνης D θεωρήθηκε για επίπεδα 25(OH)D στον ορό<20 mg/dl με βάση τον ορισμό από την Αμερικάνικη Ακαδημία Παιδιατρικής, χρησιμοποιώντας μη παραμετρική δοκιμασία κατηγορικών μεταβλητών, το two-tailed Fisher's exact test, μεταξύ βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με τα βρέφη στην ομάδα ελέγχου και μεταξύ βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, για τη συσχέτιση του γονότυπου με το φαινότυπο πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων βρεφών με τους τρεις δυνατούς γονότυπους για τον πολυμορφισμο *TaqI* (*TT, Tt, tt*) αναφορικά με τα επίπεδα 25(OH)D στον ορό με τη μη παραμετρική δοκιμασία ποσοτικών μεταβλητών, το Kruskal Wallis test. Ομοίως, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων της 25(OH)D μεταξύ των βρεφών με τους τρεις δυνατούς γονότυπους για τους πολυμορφισμούς *BsmI* (*BB, Bb*, *bb*), *ApaI* (*AA, Aa, aa*), *FokI* (*FF, Ff, ff*), *CYP27B1-1260 promoter* (*CC, Cc, cc*) με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal

Wallis. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων της 25(OH)D και της VDBP στον ορό μεταξύ των βρεφών που έφεραν τις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *Gc Gc1F, Gc1S* και *Gc2* με τη μη παραμετρική δοκιμασία ποσοτικών μεταβλητών, το Kruskal Wallis test.

Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε για $p < 0.05$. Πραγματοποιήθηκε Bonferroni διόρθωση στα αποτελέσματα και δεν βρέθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η στατιστική ανάλυση και ο σχεδιασμός των γραφημάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας Office Excel 2021 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) και MedCalc (έκδοση 14.8.1, MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium).

2.6 Ηθική της έρευνας

Η εκπόνηση της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (αριθμός πρωτοκόλλου απόφασης 4698/17-06-2015). Πριν από την ένταξη στη μελέτη ζητήθηκαν έγγραφες συγκαταθέσεις μετά από ενημέρωση από το γονέα/κηδεμόνα του κάθε βρέφους. Δεν πραγματοποιήθηκε καμία επιπλέον αιμοληψία στα βρέφη για τους σκοπούς της μελέτης, Τα δείγματα περιφερικού αίματος και ορού συλλέχθηκαν ως το υπόλειμμα από τον τακτικό διαγνωστικό εργαστηριακό έλεγχο που διενεργούνταν στα πλαίσια της νοσηλείας των βρεφών. Όλες οι μέθοδοι αυτής της διατριβής πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες και κανονισμούς.

3. Αποτελέσματα

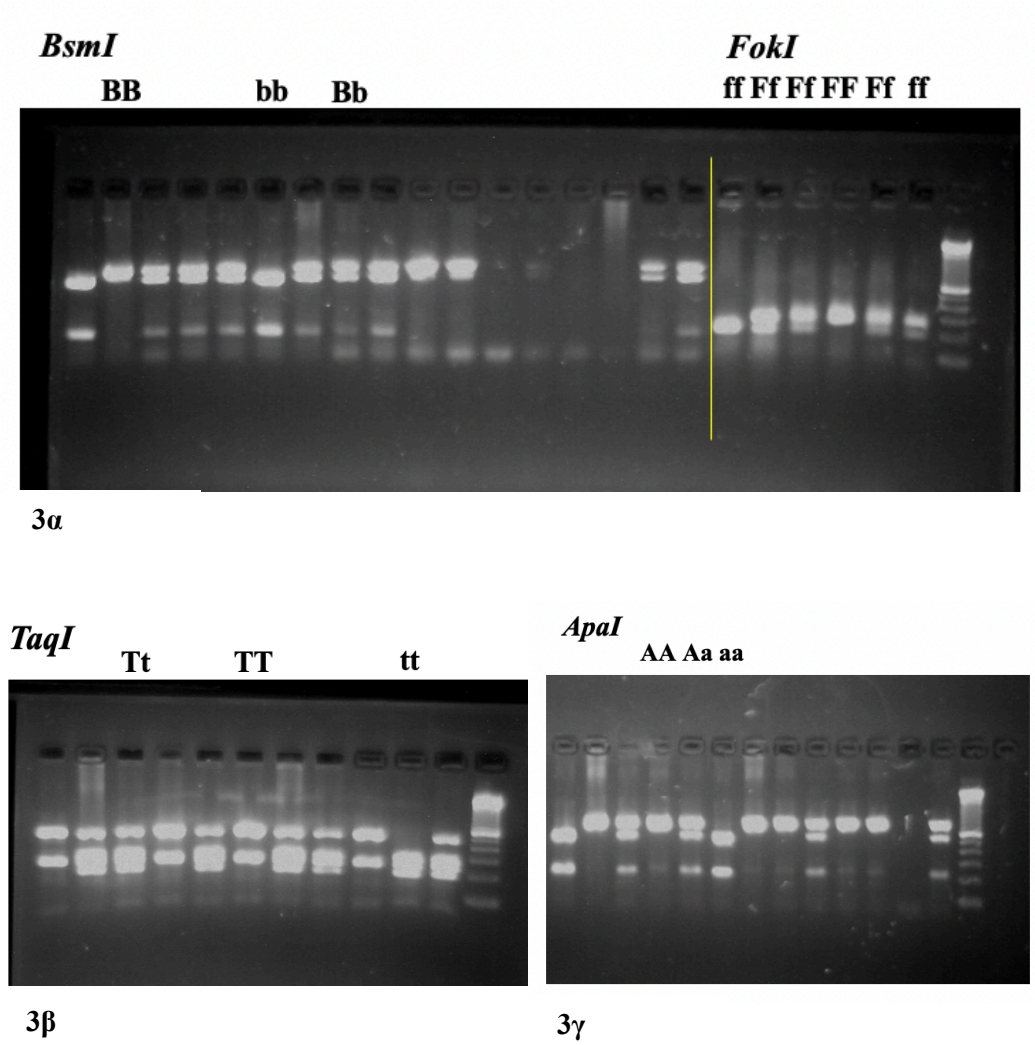
Συνολικά εντάχθηκαν στη μελέτη εκατό τριάντα δυο (132) βρέφη, σαράντα 40 βρέφη (19 άρρενες) με βακτηριακή και πενήντα δύο βρέφη (30 άρρενες) με ιογενή λοίμωξη, και σαράντα 40 υγιή βρέφη (22 άρρενες) στην ομάδα ελέγχου. Όλοι οι ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη, ασθενείς και μάρτυρες, ήταν Έλληνες. Η ομάδα των ιογενών

λοιμώξεων αποτελούνταν από σαράντα (40) βρέφη με οξεία ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού (οξεία βρογχιολίτιδα τριάντα τέσσερα (34) βρέφη, από τα οποία δεκαεννέα (19) λόγω RSV, και έξι (6) με εμπύρετη ιογενή λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού), έξι (6) βρέφη με ιογενή γαστρεντερίτιδα και έξι (6) με εμπύρετη ιογενή λοίμωξη. Η ομάδα των ασθενών με βακτηριακή λοίμωξη αποτελούνταν από βρέφη που νοσηλεύτηκαν λόγω λοίμωξης ουροποιητικού (είκοσι τρία 23 βρέφη), βακτηριακής πνευμονίας (επτά 7 βρέφη), μηνιγγίτιδας-βακτηριαιμίας (ένα βρέφος 1), οξείας μέσης ωτίτιδας (έξι 6 βρέφη, από τα οποία δυο 2 και με μαστοειδίτιδα), οξείας λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού (δυο 2 βρέφη) και συνδρόμου σταφυλοκοκκικής επιδερμιδικής νεκρόλυσης (ένα βρέφος 1). Οι ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων δε διέφεραν σημαντικά ως προς την ηλικία ούτε ως προς το φύλο.

3.1 Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR)

Μελετήθηκε η συχνότητα των αλληλομόρφων *ApaI a*, *BsmI b*, *FokI f* και *TaqI t* στα 132 βρέφη που εντάχθηκαν στη μελέτη. αντιπροσωπευτικές εικόνες από ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης που προέκυψε από την PCR και RFLP για τη μελέτη των πολυμορφισμών του υποδοχέα *VDR ApaI*, *BsmI*, *FokI* και *TaqI* παρουσιάζονται στην Εικόνα 3. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη και τη σύγκριση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων αυτών μεταξύ των ασθενών με ιογενή λοίμωξη και της ομάδας ελέγχου όπως και μεταξύ των ασθενών με βακτηριακή λοίμωξη και της ομάδας ελέγχου παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4. Ο πολυμορφισμός *TaqI*, και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο *t*, ήταν συχνότερο στα βρέφη με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με τα βρέφη στην ομάδα ελέγχου (p= 0,03, OR 1,96 95% ΔΕ 1,1 – 3,58). Επίσης, το αλληλόμορφο *t* ήταν σημαντικά συχνότερο στα βρέφη με οξεία ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (p = 0,025, OR 2,16, 95% ΔΕ 1,15-4,10). Ωστόσο, δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα του

πολυμορφισμού *TaqI* μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (p=0,99, OR 1,05 95%ΔΕ 0,55-2,02). Επίσης, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τη συχνότητα των αλληλομόρφων με τους πολυμορφισμούς *BsmI, FokI* και *ApaI* ούτε μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ούτε μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 4).



Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτικές εικόνες gel αγαρόζης από PCR-RFLP ηλεκτροφορήσεις DNA από την μελέτη για τους πολυμορφισμούς του *VDR* 3α: BsmI και FokI, 3β: TaqI και 3γ: ApaI.

SNP Αλλήλια	**Controls** **N=40**	**Ιογενείς** **N=52**	**OR (95%ΔΕ)** ***p* value** **Ιογενείς vs Control**	**Βακτ/κές** **N=40**	**OR (95%ΔΕ)** ***p* value** **Control vs Βακτ/κές**
***TaqI* T** ***TaqI* t**	53 (66,3%) 27 (33,7%)	52 (50%) 52 (50%)	1,96 (1,1-3,58) *p*=0,03	52 (65%) 28 (35%)	1,05 (0,55-2,02) *p*=0,99
***FokI* F** ***FokI* f**	53 (66,3%) 27 (33,7%)	64 (61,5%) 40 (38,5%)	1,23 (0,67-2,25) *p*=0,53	51 (63,8%) 29 (36,2%)	1,12 (0,58-2,14) *p*=0,86
***BsmI* B** ***BsmI* b**	36 (45%) 44 (55%)	43 (41,3%) 61 (58,7%)	1,16 (0,64-2,09) *p*=0,65	34 (42,5%) 46 (57,5%)	1,1 (0,59- 2,07) *p*=0,87
***ApaI* A** ***ApaI* a**	41 (51,3%) 39 (48,7%)	59 (56,7%) 45 (43,3%)	0,8 (0.44-1,43) *p*=0,55	43 (53,8%) 37 (46,2%)	0,9 (0,49-1,69) *p*=0,87

Πίνακας 4. Οι συχνότητες των αλληλόμορφων για το γονίδιο *VDR* μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου για τους SNPs *TaqI*, *BsmI*, *ApaI* και *FokI.*

3.2 Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* της VDBP

Οι δυο πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* που κωδικοποιεί τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D, *rs7041* και *rs4588,* προσδιορίστηκαν στα 132 βρέφη. Ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από τη μελέτη αυτών των δυο πολυμορφισμών του γονιδίου *Gc* έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις κύριες παραλλαγές του γονιδίου *Gc* (*Gc1F, Gc1S, Gc2*) που κωδικοποιούν τις τρεις κύριες ηλεκτροφορητικές παραλλαγές της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D VDBP: Gc1F, Gc1S και Gc2 αντίστοιχα. Οι συχνότητες των αλληλόμορφων των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *Gc* μεταξύ

των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με τα βρέφη της ομάδας ελέγχου παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Η γενετική παραλλαγή *Gc1F* (*rs7041*T-*rs4588*C) ήταν σημαντικά συχνότερη στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη (*p*= 0,007, OR 2,7, 95%ΔΕ 1,3-5,6). Επίσης, η παραλλαγή *Gc1F* ήταν συχνότερη στα βρέφη στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με οξεία ιογενή λοίμωξη του αναπνευστικού (υποομάδα των βρεφών με ιογενή λοίμωξη) (*p*= 0,10, OR 3,04, 95% ΔΕ 1,34-6,93). Η συχνότητα του *Gc1F* δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύγκριση μεταξύ ομάδας ελέγχου και βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη (*p*=0,07, OR 2,5 95%ΔΕ 1,01-6,14). Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τη συχνότητα των παραλλαγών *Gc2* και *Gc1S* μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ούτε μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 5).

Gc	**Controls N=40**	**Ιογενείς N=52**	**OR (95%ΔΕ)** ***p* value** **Control vs Ιογενείς**	**Βακτ/κές N=40**	**OR (95%ΔΕ)** ***p* value** **Control vs Βακτ/κές**
Gc1F	25	15	2,7 (1,3-5,6) *p*=0,007	16	2,5 (1,01-6,14) *p*=0,07
Gc1S	34	58	0,58 (0,3-1,05) p=0,1	38	0,82 (0,44-1,52) *p*=0,63
Gc2	21	31	0,83 (0,43-1,6) p=0,62	26	0,73 (0,37-1,46) *p*=0,49

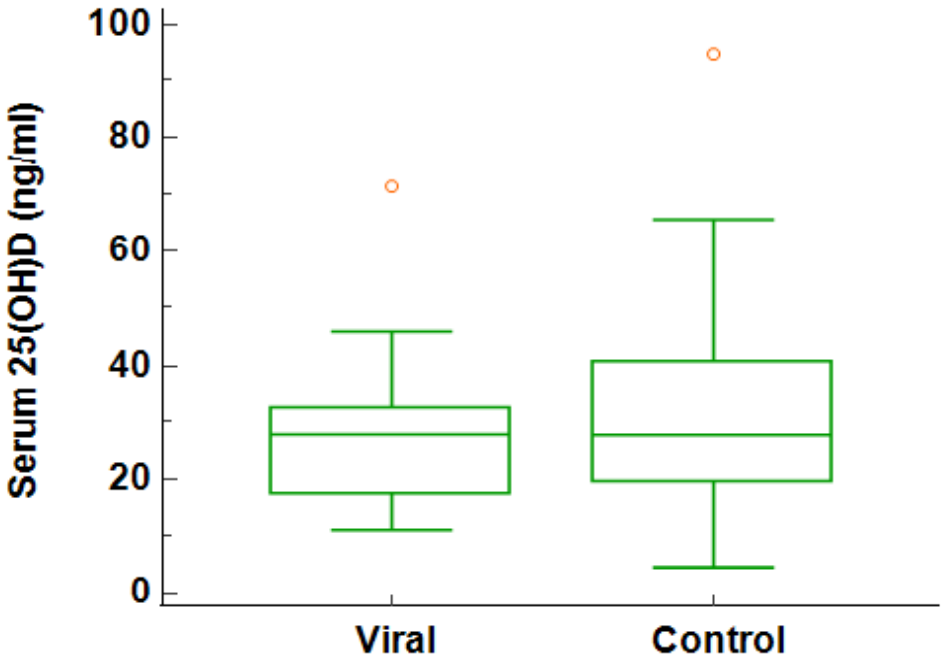
Πίνακας 5. Πίνακας συχνοτήτων των αλληλόμορφων-παραλλαγών του γονιδίου *Gc* μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

3.3 Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ενζύμου CYP27B1

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη μελέτη της συχνότητας των αλληλομόρφων με τον πολυμορφισμό του υποκινητή του γονιδίου του ενζύμου 1-α-υδροξυλάση *CYP27B1-1260- promoter rs10877012* ανάμεσα στα βρέφη της ομάδας ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη ή βακτηριακή λοίμωξη.

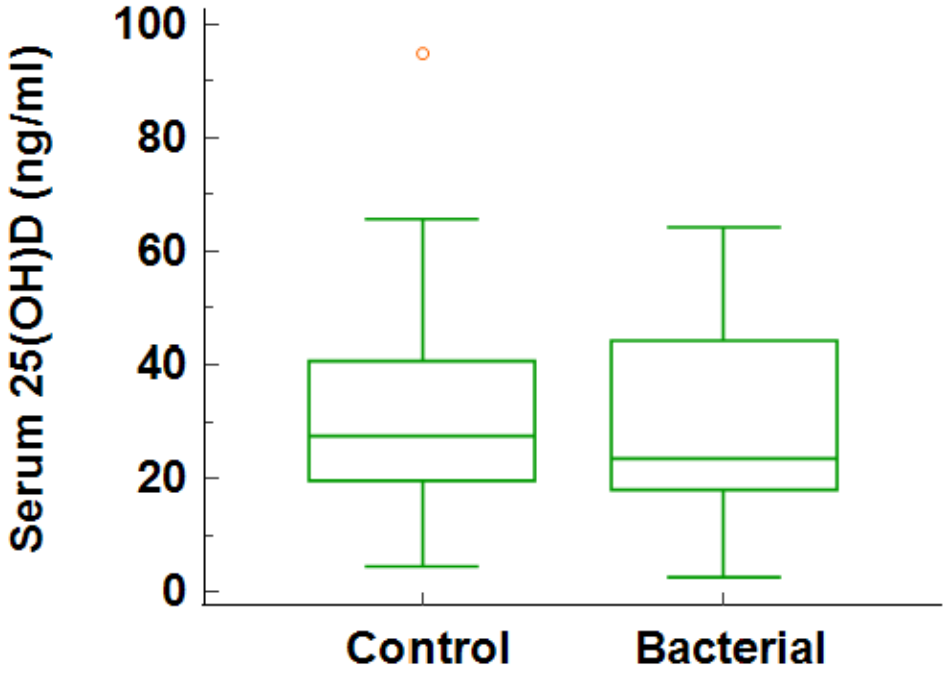
3.4 Επίπεδα 25(OH)D στον ορό

Τα επίπεδα της 25(OH)D προσδιορίστηκαν στον ορό των ασθενών με λοίμωξη (ιογενή ή βακτηριακή) και στην ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου: διάμεσος (median) 27,6 ng/ml με εύρος (10,9-71,3) 95%ΔΕ 19,7-32,26 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου με διάμεσο 27,53 ng/ml και εύρος (4,5-94,8) 95%ΔΕ 21,03-39,7 (Mann-Whitney test: two-tailed probability p=0,45, U=297, Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Box plot γράφημα με τα αποτελέσματα των επιπέδων 25(OH)D στον ορό των ασθενών με ιογενή λοίμωξη και στην ομάδα ελέγχου. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων (Mann-Whitney test: p two-tailed= 0,45).

Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη, διάμεσος 23,5 ng/ml με εύρος (2,5-64,1) 95% ΔΕ (19,17-39,33) σε σύγκριση με τα βρέφη στην ομάδα ελέγχου διάμεσος 27,53 ng/ml και εύρος (4,5-94,8) 95%ΔΕ 21,03-39,7 (Mann-Whitney test: two-tailed probability p=0,54, U=293, Γράφημα 2).

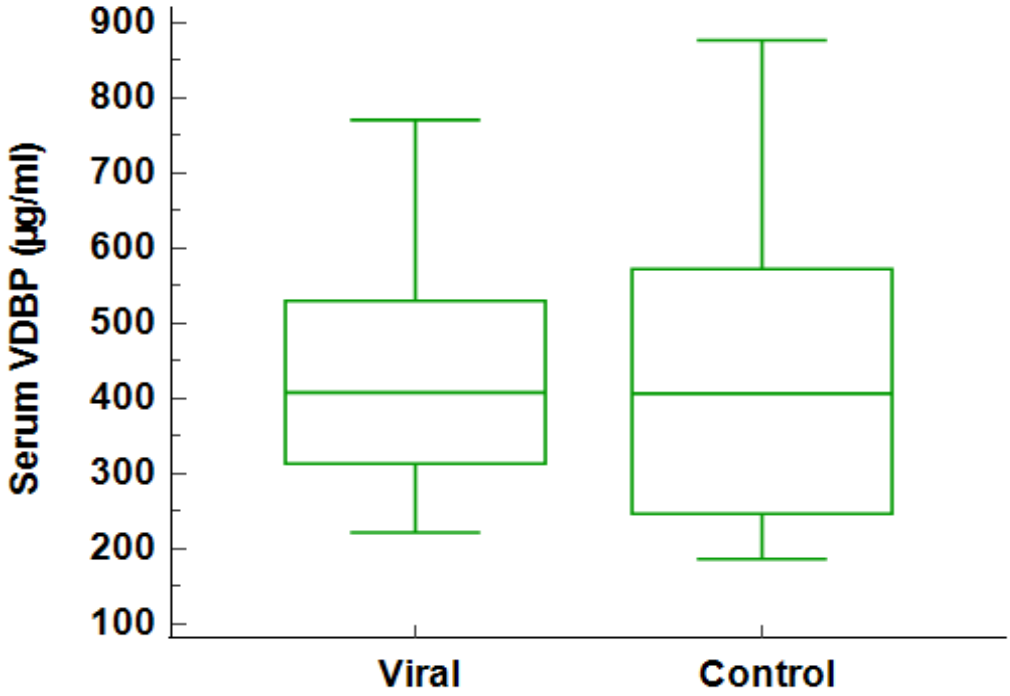


Γράφημα 2:. Box plot γράφημα που απεικονίζει τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό στα βρέφη με βακτηριακή λοίμωξη και στα βρέφη της ομάδας ελέγχου. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη σύγκριση των επιπέδων της 25(OH)D μεταξύ των δυο ομάδων (Mann-Whitney test: p two-tailed= 0,54).

Επίσης, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα της ανεπάρκειας της 25(OH)D στον ορό (25(OH)D< 20 ng/ml) μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (two-tailed Fischer exact test p=1, OR 1,20 (0,36-4,01) ούτε μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (two-tailed Fischer exact test p=0,55, OR 1,52 (0,46-5,02).

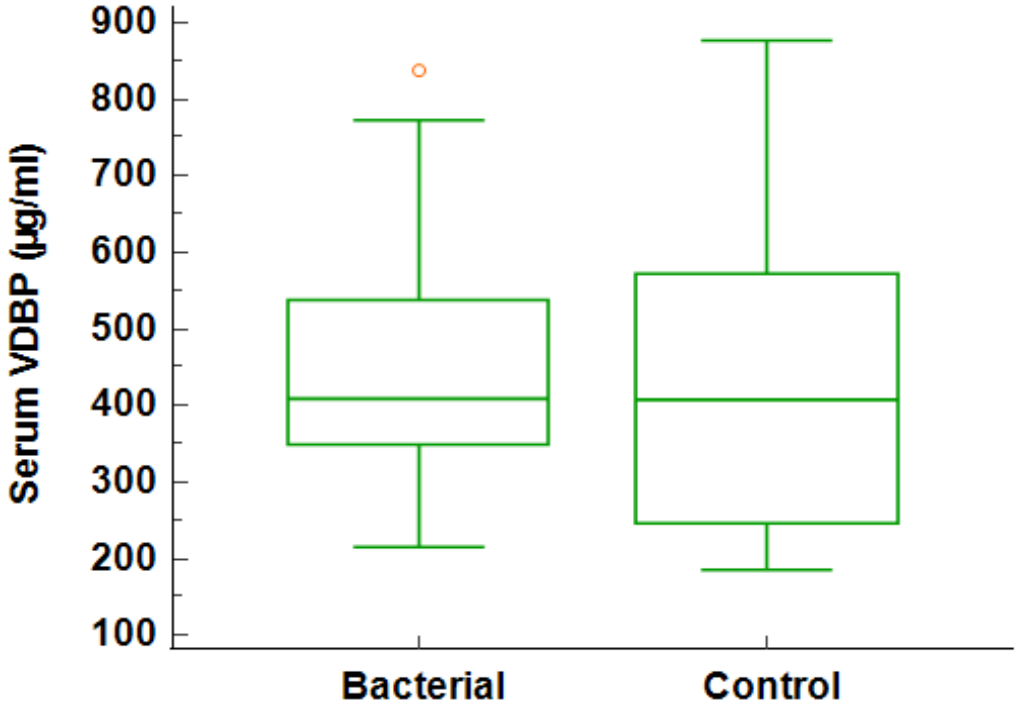
3.5 Επίπεδα Δεσμευτικής Πρωτεΐνης της Βιταμίνης D (VDBP) στον ορό

Τα επίπεδα της VDBP προσδιορίστηκαν στον ορό των ασθενών με λοίμωξη (ιογενή ή βακτηριακή) και στην ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της VDBP στον ορό μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη διάμεσος (median) 408,32 μg/ml με εύρος (222,11-771,21), 95%ΔΕ της διάμεσου (222,11-771,21), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου με διάμεσο 407,09 μg/ml και εύρος (186,87-877,16) 95%ΔΕ διαμέσου (286,84-522,08) (Mann-Whitney test: two-tailed probability p=0,69, U=409,5) (Γράφημα 3).



Γράφημα 3: Box plot που απεικονίζει τα επίπεδα της VDBP στον ορό στα βρέφη με ιογενή λοίμωξη και στα βρέφη της ομάδας ελέγχου. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη σύγκριση των επιπέδων της VDBP μεταξύ των δυο ομάδων (Mann-Whitney test: p two-tailed= 0,45).

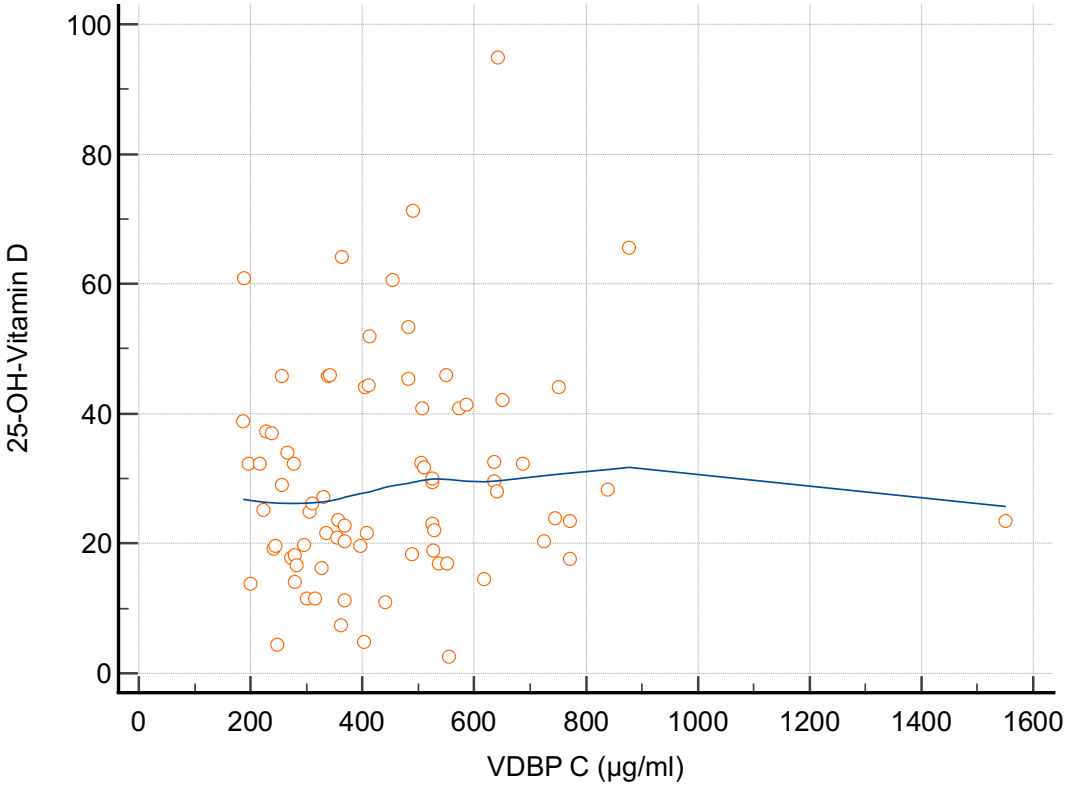
Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της VDBP στον ορό μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη διάμεσος (median) 408,38 μg/ml με εύρος (216,21-839,55) 95%ΔΕ της διάμεσου (286,84-522,09) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου με διάμεσο 407,09 μg/ml και εύρος (186,87-877,16), 95%ΔΕ διαμέσου 286,84-522,08 (Mann-Whitney test: two-tailed probability p=0,49, U=320,00) (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: Box plot που απεικονίζει τα επίπεδα της VDBP στον ορό στα βρέφη με βακτηριακή λοίμωξη και στα υγιή βρέφη της ομάδας ελέγχου. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη σύγκριση των επιπέδων της VDBP μεταξύ των δυο ομάδων (Mann-Whitney test: p two-tailed= 0,54).

3.6 Επίπεδα 25(OH)D και VDBP στον ορό

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συσχέτισης των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό με τα επίπεδα της VDBP στον ορό και δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (στατιστικός έλεγχος correlation coefficient Spearman's: rho=0,125, p=0,29, 95%ΔΕ rho -0,102- 0,34) (Γράφημα 5).

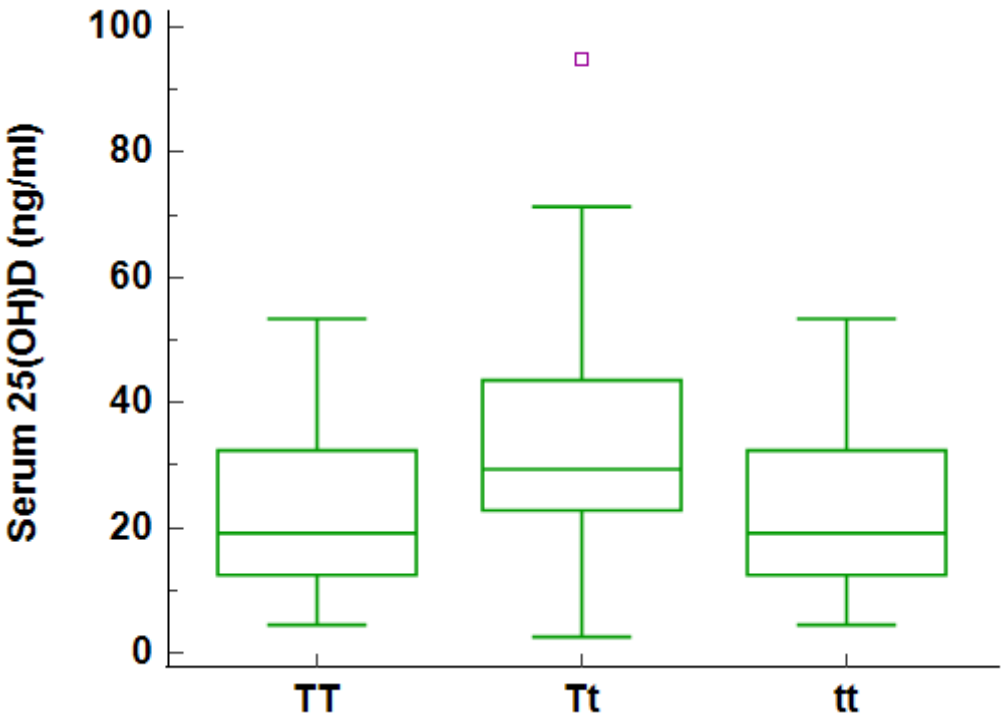


Γράφημα 5: Scanner plot γράφημα συσχέτισης των επιπέδων της 25(OH)D (άξονας x) με τα επίπεδα της VDBP (άξονας y) στον ορό των βρεφών. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση: Coefficient correlation Spearman's: rho=0,125, p=0,29.

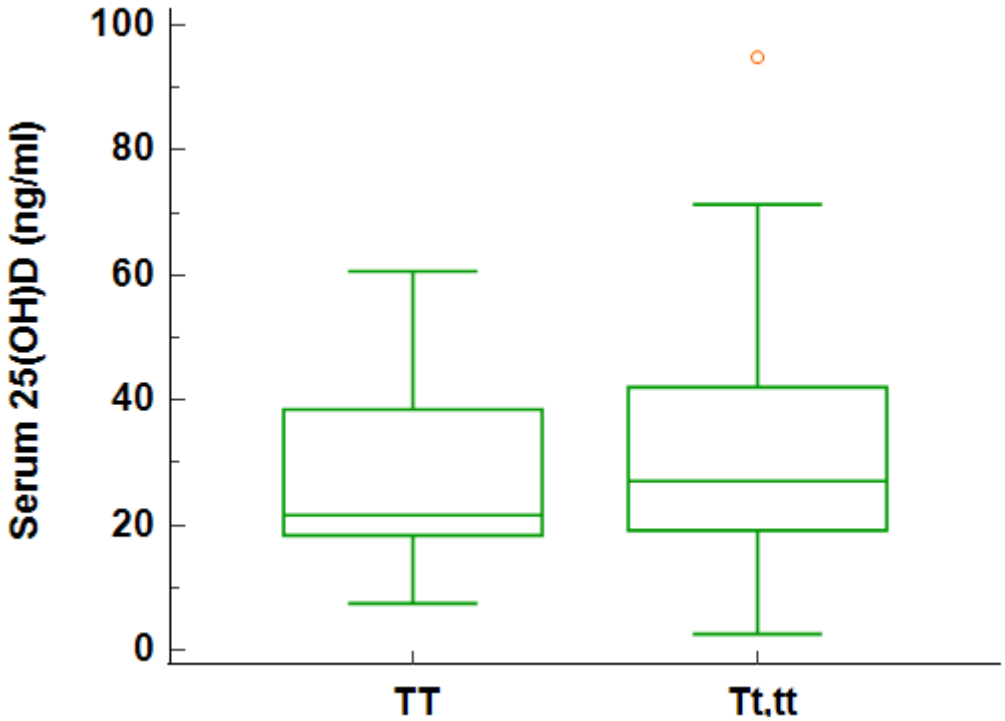
3.7 Γονότυπος για *VDR*, *Gc* και *CYP27B1* και επίπεδα 25(OH)D στον ορό

Η ύπαρξη του πολυμορφισμού *TaqI*, και συγκεκριμένα του αλληλομόρφου *t*, δεν συσχετίστηκε με σημαντική διαφορά στα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό στα βρέφη που έφεραν το αλληλόμορφο t διάμεσος συγκέντρωσης 25(OH)D στον ορό 26,11 ng/ml

με εύρος (2,55-94,82) σε σύγκριση με αυτά που δεν έφεραν το αλληλόμορφο *t* median συγκέντρωσης 25(OH)D στον ορό 24,39 ng/ml με εύρος (7,43-60,62) (μη παραμετρική δοκιμασία Mann-whitney: U=573,50, p two-tailed=0,335). Επίσης, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό μεταξύ των βρεφών που είχαν το γονότυπο *tt* σε σύγκριση με τα βρέφη με γονότυπους *TT* και *Tt* (Mann-whitney test, p two-tailed=0,302), ούτε μεταξύ των βρεφών με το γονότυπο *TT* σε σύγκριση με τα βρέφη με γονότυπο *Tt* και *tt*) (Mann-whitney test, p two-tailed=0,31, Γράφημα 7). Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των βρεφών με τους 3 δυνατούς γονότυπους για τον πολυμορφισμό *TaqI* (*TT*, *Tt*, *tt*) αναφορικά με τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό (βρέφη με γονότυπο *TT* διάμεσος συγκέντρωσης 25(OH)D στον ορό 21,57ng/ml με εύρος 7,44-60,63, βρέφη με γονότυπο *Tt* διάμεσος συγκέντρωσης 25(OH)D στον ορό 29,38 ng/ml με εύρος 2,56-94,83 και βρέφη με γονότυπο *tt* διάμεσος συγκέντρωσης 25(OH)D στον ορό 19,14 ng/ml με εύρος 4,48-53,41) και δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Kruskal Wallis test: p=0,15, corrected for ties 3,76, degrees of freedom 2, Γράφημα 6). Ακόμα, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα της ύπαρξης ανεπάρκειας 25(OH)D μεταξύ των βρεφών που έφεραν τον πολυμορφισμό *TaqI*, συγκεκριμένα το αλληλόμορφο *t* (γονότυποι *Tt* και *tt*,) και των βρεφών που δεν έφεραν το αλληλόμορφο αυτό (γονότυπος *TT*) (two-tailed Fischer exact test p=0,47) όπως και δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τα επίπεδα της 25(OH) D στον ορό (Mann-whitney test two tailed p=0,27, Γράφημα 7). Ομοίως, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό στα βρέφη που έφεραν τους τρεις δυνατούς γονότυπους και για τους πολυμορφισμούς *BsmI* (*BB*, *Bb*, *bb*), *ApaI* (*AA*, *Aa*, *aa*), *FokI* (*FF*, *Ff*, *ff*), *CYP27B-1260 promoter* (*CC*, *Cc*, *cc*) και δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Kruskal Wallis test p=0,59, p=0,89, p=0,27, p=0,54, αντιστοίχως).

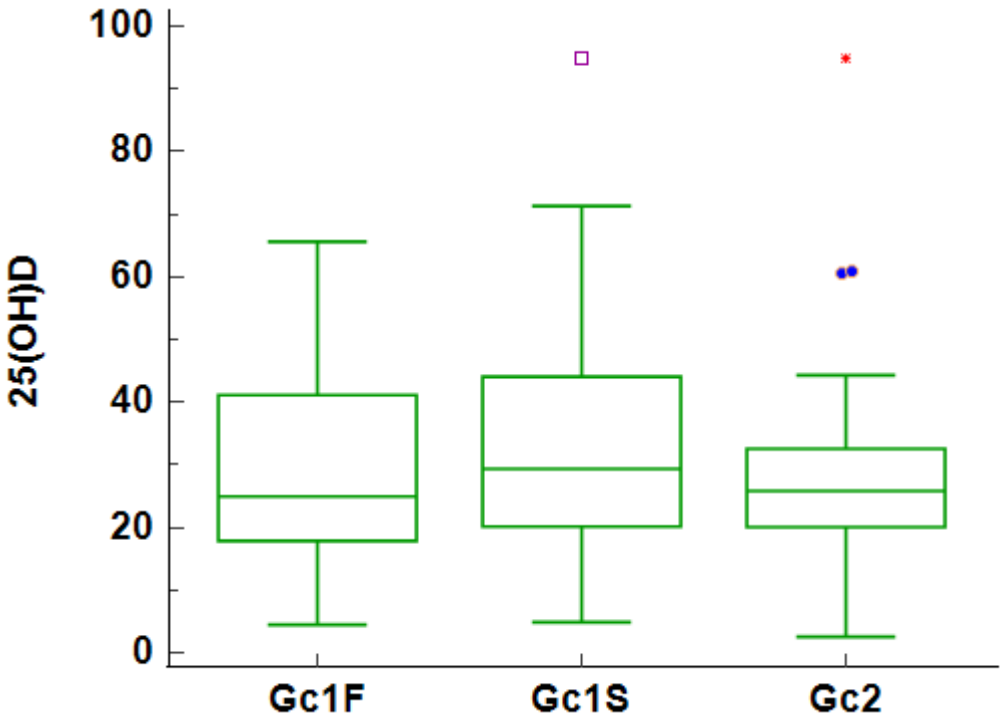


Γράφημα 6: Box plot σύγκρισης των επιπέδων της 25(OH)D μεταξύ των βρεφών με γονότουπους *TT, Tt, tt* για τον TaqI του γονιδίου *VDR*. Δε βρέθηκε σημαντική διαφορά. (Kruskal Wallis test, p=0,15).



Γράφημα 7: Box plot σύγκρισης των επιπέδων της 25(OH)D μεταξύ των βρεφών που έφεραν τον πολυμορφισμό *TaqI (Tt, tt)* σε σύγκριση με αυτά που δεν τον είχαν (*TT*). Δε βρέθηκε σημαντική διαφορά. (Mann Whitney test, p two tailed: 0,27)

Επιπροσθέτως, έγινε σύγκριση των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό των βρεφών που έφεραν τις παραλλαγές *Gc1F* (διάμεσος 25(OH)D επίπεδα στον ορό: 24,95 ng/ml με εύρος 4,48-65,63 ng/ml), *Gc1S* (διάμεσος 25(OH)D επίπεδα στον ορό 29,38 ng/ml με εύρος 4,88-94,83 ng/ml) και *Gc2* (διάμεσος 25(OH)D επίπεδα στον ορό 25,83 ng/ml με εύρος 2,56-94,83 ng/ml) και δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Kruskal Wallis test, corrected for ties 1,49, degrees of freedom 2, p=0,47) (Γράφημα 8).

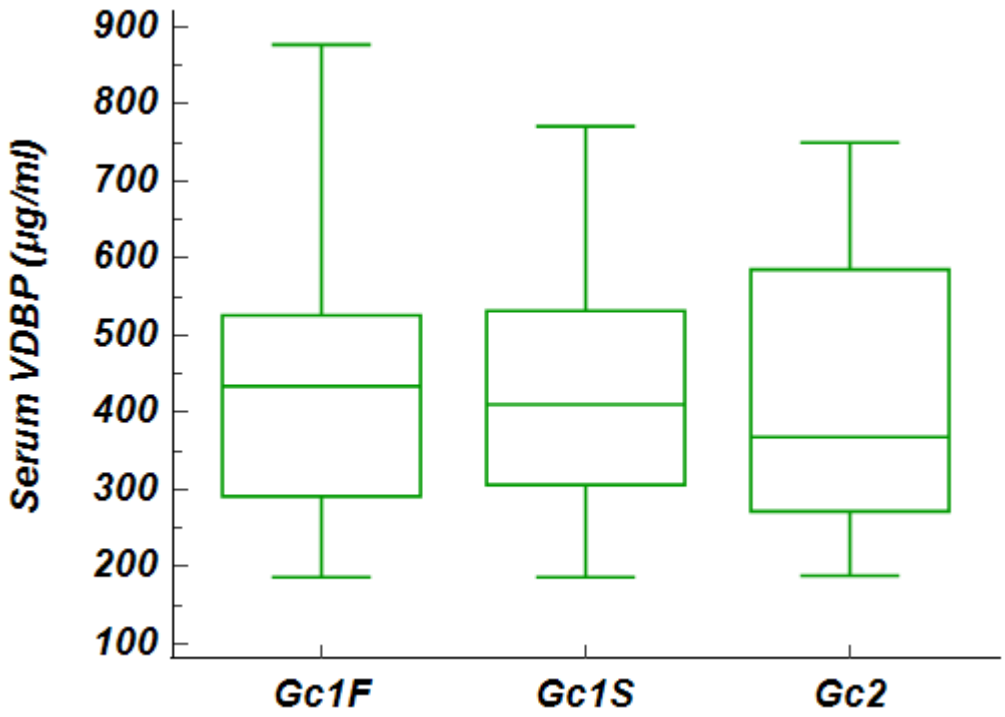


Γράφημα 8: Box plot. Σύγκριση επιπέδων 25(OH)D στον ορό μεταξύ των βρεφών που έφεραν τις παραλλαγές *Gc1F*, *Gc1S* και *Gc2* του γονιδίου *Gc*. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Kruskal Wallis test, p=0,47).

3.8 Γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *Gc* και επίπεδα VDBP στον ορό

Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της κυκλοφορούσας VDBP στον ορό των βρεφών που έφεραν τις παραλλαγές *Gc1F* διάμεσος (median) 434,32 μg/ml με εύρος (186,88-877,9), *Gc1S* διάμεσος (median) 410,52 μg/ml με εύρος (186,88-771,51) και *Gc2* διάμεσος (median) 368,61 μg/ml με εύρος (188,54-750,51)

(Kruskal-wallis test corrected for ties: 0,56, degrees of freedom 2, p=0,75) (Γράφημα 9).



Γράφημα 9: Box plot σύγκρισης των επιπέδων της VDBP μεταξύ των βρεφών με τις παραλλαγές *Gc1S, Gc1F* και *Gc2* του γονιδίου *Gc*. Δε βρέθηκε σημαντική διαφορά. Kruskal Wallis test: p=0,75.

4. Συζήτηση

4.1 Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D VDR και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη

Στη παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος των γενετικών παραλλαγών στο μονοπάτι της βιταμίνης D, και συγκεκριμένα σε τρία κύρια μόρια του μονοπατιού, στον υποδοχέα VDR, στη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (VDBP) και στο ένζυμο ενεργοποίησης 1-α-υδορξυλάση CYP27B1, στην ευπάθεια στις λοιμώξεις στη βρεφική ηλικία. Στη μελέτη αυτή δείξαμε ότι οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του

υποδοχέα *VDR,* και συγκεκριμένα ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός *TaqI*, συσχετίζονται με τις ιογενείς λοιμώξεις, και ιδιαίτερα με τις ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, στα βρέφη. Όλα τα βρέφη που εντάχθηκαν στη μελέτη νοσηλεύονταν λόγω της ιογενούς λοίμωξης, ως εκ τούτου το μονοπάτι της βιταμίνης D, και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός *TaqI*, μπορεί να σχετίζεται και με τη σοβαρότητα των ιογενών λοιμώξεων στη βρεφική ηλικία. Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που έχουν προσπαθήσει να διερευνήσουν τη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του υποδοχέα VDR και την ευπάθεια σε λοιμώξεις, σε διάφορες ηλικιακές ομάδες και με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα VDR έχουν συσχετιστεί στη βιβλιογραφία με την εκδήλωση σοβαρής βρογχιολίτιδας οφειλόμενη στον ιό RSV [116]. Επίσης, το μονοπάτι της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με τη σοβαρότητα της λοίμωξης SARS-CoV-2 [117]. Επιπροσθέτως, ο πολυμορφισμός *TaqI* έχει προηγουμένως συσχετιστεί με την ευπάθεια στις λοιμώξεις αναπνευστικού στην πρώιμη παιδική ηλικία και με την φυματίωση στους ενήλικες [16,81]. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα VDR έχουν συσχετιστεί με την πνευμονία της κοινότητας στα παιδιά καθώς και με την ρινική φορεία *S.aureus* σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I [84,118]. Ακόμα, ο πολυμορφισμός *FokI* έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε πνευμονία της κοινότητος στα παιδιά καθώς και σε ιογενή βρογχιολίτιδα στα βρέφη [81,82]. Σε μια συστηματική ανασκόπηση οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του *VDR*, και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός *FokI*, συσχετίστηκαν με λοιμώξεις αναπνευστικού από ιούς με περίβλημα και ιδιαίτερα από τον ιό RSV [83]. Ωστόσο, σε μια μελέτη ασθενών μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με την συχνότητα των πολυμορφισμών του υποδοχέα VDR *TaqI* και *ApaI* μεταξύ των παιδιών με οξεία λοίμωξη αναπνευστικού και της ομάδας ελέγχου [119]. Οι πολυμορφισμοί *ApaI* και *BsmI* του υποδοχέα VDR έχουν συσχετιστεί με τις λοιμώξεις ουροποιητικού στα

παιδιά [80]. Ωστόσο, από την παρούσα διδακτορική διατριβή δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των πολυμορφισμών του υποδοχέα VDR μεταξύ των βρεφών με λοίμωξη ουροποιητικού και της ομάδας ελέγχου.

Στη μελέτη αυτή, ο πολυμορφισμός *TaqI* ήταν συχνότερος στα βρέφη που νοσηλεύτηκαν με οξεία λοίμωξη αναπνευστικού σε σύγκριση με τα βρέφη από την ομάδα ελέγχου. Ο Roth και οι συνεργάτες του έχουν ομοίως δημοσιεύσει την ύπαρξη θετικής συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών του υποδοχέα VDR *FokI* και *TaqI* και της εκδήλωσης ιογενούς βρογχιολίτιδας στην πρώιμη παιδική ηλικία [16]. Η ύπαρξη του πολυμορφισμού *TaqI* φαίνεται ότι μπορεί να επιδρά στην έκφραση του γονιδίου *VDR*, στη δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα VDR και στη δεσμευτική ικανότητα για τη βιταμίνη D, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα μη λειτουργικό σύμπλοκο υποδοχέα VDR-βιταμίνης D μειώνοντας έτσι τη δραστικότητα των μονοπατιών που σχετίζονται με τη βιταμίνη D στους ιστούς και κύτταρα στόχους [17,120]. Ο υποδοχέας VDR εκφράζεται στην πλειονότητα των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας (μακροφάγα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα) και η βιταμίνη D έχει φανεί ότι ενισχύει την ανοσιακή απόκριση. Η βιταμίνη D μέσω του υποδοχέα της VDR επάγει την ενεργοποίηση των μακροφάγων, τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, την παραγωγή ιντερλευκίνης 1, ενισχύει τη χημειοταξία, ρυθμίζει άμεσα τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών, ενισχύει τη φαγοκυττάρωση καθώς προκαλεί αύξηση της προσκόλλησης του φαγοσώματος στο λυσόσωμα στα μακροφάγα και διεγείρει τη σύνθεση της ελεύθερης ρίζας μονοξειδίου του αζώτου (NO) [1,2,84]. Επιπροσθέτως, η βιταμίνη D μέσω του υποδοχέα της VDR επάγει την έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων καθελικιδίνη και ντιφενσίνη στους ιστούς που εκτίθενται σε παθογόνα-αντιγόνα μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR (Toll like receptor), ομοίως και σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού. Επομένως, ο πολυμορφισμός *TaqI* μπορεί να

μειώνει τις παραπάνω ευεργετικές ανοσοτροποποιητικές δράσεις της βιταμίνης D που μεσολαβούνται μέσω του υποδοχέα της VDR [3-5,17,120]. Επίσης, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίζονται και από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro* και έχουν αποδείξει ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος διαθέτουν υποδοχέα VDR, εκφράζουν ένζυμο ενεργοποίησης 1-α-υδροξυλάση CYP27B1 και η βιταμίνη D ενισχύει την αντιική δράση στα κύτταρα αυτά, ιδιαίτερα εναντίων των RNA ιών [13,16,18]. Τα δεδομένα αυτά από τη βιβλιογραφία επεξηγούν και σε μοριακό επίπεδο τα ευρήματα της παρούσας μελέτης που υποδεικνύουν ότι πολυμορφισμός *TaqI* φαίνεται ότι μπορεί να συμμετέχει στην ευπάθεια στις ιογενείς λοιμώξεις, και ιδιαίτερα στις ιογενείς λοιμώξεις αναπνευστικού στα βρέφη.

4.2 Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *Gc* της VDBP και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη

Ο συνδυαστικός γονότυπος που προκύπτει από τους δύο *SNPs rs7041* και *rs4588* που εδράζουν στο εξόνιο 11 του γονιδίου *Gc* έχει ως αποτέλεσμα τις τρεις γενετικές παραλλαγές του γονιδίου, τη *Gc1F* (*rs7041*T-*rs4588*C) η οποία είναι η παραλλαγή που δεν φέρει κανένα από τους δυο πολυμορφισμούς, τη Gc1S (*rs7041*G-*rs4588*C) και τη *Gc2* (*rs7041*T-*rs4588*A), οι οποίες κωδικοποιούν τις τρεις κύριες ηλεκροφορητικές παραλλαγές της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D (VDBP allozymes) Gc1F, Gc1S και Gc2 αντιστοίχως [15,19,20]. Στη μελέτη αυτή, η παραλλαγή του γονιδίου *Gc1F(rs7041*T-*rs4588*C) της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D, ήταν σημαντικά συχνότερη στα βρέφη στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη όπως και σε σύγκριση με τα βρέφη με οξεία ιογενή λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος. Η παραλλαγή Gc1F της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D αναφέρεται ότι παρουσιάζει υψηλότερη δεσμευτική ικανότητα για τη βιταμίνη D που

πιθανά μπορεί να οδηγεί σε πιο αποτελεσματική διανομή της βιταμίνης D στους ιστούς στόχους [85-87]. Επιπροσθέτως, η παραλλαγή του γονιδίου *Gc Gc1F (rs7041*T-*rs4588*C) έχει συσχετιστεί με υψηλότερα κυκλοφορόντα επίπεδα της βιταμίνης D και καλύτερη απόκριση στη χορήγηση συμπληρωμάτων της βιταμίνης D σε σύγκριση με τις παραλλαγές *Gc1S* (*rs7041*G-*rs4588*C) και *Gc2* (*rs7041*T-*rs4588)* [20,39,40,45,46]. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D, και συγκεκριμένα ο απλότυπος *Gc1S,* έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D που έχει ως αποτέλεσμα μικρότερα ποσοστά ελεύθερης διαθέσιμης βιταμίνης D [22]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D στον ορό και της χαμηλότερης επίπτωσης των λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος και του ανώτερου αναπνευστικού (επεισόδια ωτίτιδας) σε παιδιά σχολικής ηλικίας [91]. Επομένως, τα δεδομένα από τις παραπάνω μελέτες υποστηρίζουν και επεξηγούν τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς δείξαμε ότι η παραλλαγή *Gc1F* ήταν συχνότερη στα βρέφη στην ομάδα control σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη και σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού.

Η ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε RSV βρογχιολίτιδα σε βρέφη και με την ηπατίτιδα C στους ενήλικες [22,121]. Επίσης, σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε πρόσφατα όπου διερευνήθηκε η συσχέτιση του γονότυπου για το γονίδιο Gc με την επίπτωση και τη θνησιμότητα της λοίμωξης COVID-19, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των αλληλομόρφων *Gc1S* και *Gc1F* και της χαμηλότερης επίπτωσης και θνησιμότητας λόγω της νόσου COVID-19 [109,110]. Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D μετατρέπεται από τα ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα σε ένα ισχυρό παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων, τον παράγοντα Gc-MAF [19,89,90]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υψηλότερη

βιολογική δραστικότητα του παράγοντα Gc-MAF έχει παρατηρηθεί με τον απλότυπο *Gc1F* του γονιδίου της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D [90]. Τα παραπάνω επιστημονικά δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν και τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς η παραλλαγή *Gc1F* ήταν συχνότερη στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με ιογενή λοίμωξη και μπορεί να επεξηγούν τον προστατευτικό ρόλο που πιθανά διαδραματίζει ο απλότυπος αυτός στην ανοσιακή απόκριση του ξενιστή έναντι των ιογενών λοιμώξεων στη βρεφική ηλικία.

4.3 Ο πολυμορφισμός του υποκινητή του γονιδίου του ενζύμου CYP27B1-1260 (rs10877012) και η συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη

Το γονίδιο *CYP27B1* εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως στα μακροφάγα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα Τ και Β λεμφοκύτταρα [5,121-123]. Ο πολυμορφισμός του υποκινητή του γονιδίου *CYP27B1-1260 (rs10877012)* έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα του δραστικού μορίου 1,25$(OH)_2$D στον ορό και έχει συσχετιστεί με την λοίμωξη από ηπατίτιδα Β και αυτοάνοσα νοσήματα σε ενήλικες [5,121-123]. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τη συχνότητα των αλληλομόρφων που φέρουν τον πολυμορφισμό *CYP27B1-1260* μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν.

4.4 Επίπεδα βιταμίνης D στον ορό και συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια σε λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος σε παιδιά σχολικής ηλικίας, με τη σήψη σε παιδιά και ενήλικες καθώς και με τη σοβαρότητα και θνησιμότητα από τη λοίμωξη με το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο κοροναϊού-2 (SARS-CoV-2) [3,9-12]. Επίσης, σε μια μελέτη ασθενών

μαρτύρων που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά φάνηκε ότι οι παιδιατρικοί ασθενείς με λοίμωξη COVID-19 είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [101]. Ακόμα, σε μια μελέτη κοορτής σε παιδιατρικούς ασθενείς με λοίμωξη COVID-19 η ανεπάρκεια της βιταμίνης D συσχετίστηκε με την σοβαρότητα της λοίμωξης COVID-19 στα παιδιά [107]. Επιπροσθέτως, σε μια προοπτική μελέτη κοορτής που πραγματοποιήθηκε σε παιδιατρικούς ασθενείς με COVID-19 βρέθηκε ότι τα υψηλότερα ιικά φορτία συσχετίζονταν με χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό [108]. Ωστόσο στην παρούσα διδακτορική διατριβή δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη σύγκριση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό μεταξύ των ασθενών με ιογενή λοίμωξη και των βρεφών στην ομάδα ελέγχου ούτε από τη σύγκριση των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη με την ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται από τα ευρήματα του Mailhot και των συνεργατών του, οι οποίοι συνέκριναν τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό των παιδιών με οξείες λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με τους μάρτυρες και ομοίως δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά [78].

4.5 Επίπεδα δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D (VDBP) στον ορό και συσχέτιση με λοιμώξεις στα βρέφη

Η δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D VDBP αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη-φορέα της βιταμίνης D, με την οποία η βιταμίνη D κυκλοφορεί και διανέμεται στους ιστούς-κύτταρα στόχους όπου ασκεί τις ανοσοτροποποιητικές τις δράσεις όπως έχουν αναλυθεί παραπάνω. Ακόμα, εκτός από τον έμμεσο αυτό ρόλο, η VDBP διαδραματίζει και άμεσο ρόλο στην ανοσιακή απόκριση καθώς μετατρέπεται από τα ενεργοποιημένα Τ και Β λεμφοκύτταρα σε ένα ισχυρό παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων, τον παράγοντα Gc-MAF ενώ ταυτόχρονα συμμετέχει και στη χημειοταξία καθώς ενισχύει

την προσέλκυση λευκοκυττάρων από το ενεργοποιημένο πεπτίδιο του συμπληρώματος C5a [15,22,17,89,90]. Σε μια προοπτική μελέτη κοορτής που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά σχολικής ηλικίας παρατηρήθηκε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D στον ορό και της χαμηλότερης επίπτωσης των λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος και του ανώτερου αναπνευστικού (επεισόδια ωτίτιδας) σε παιδιά σχολικής ηλικίας [91]. Επίσης, τα δεδομένα από μια προοπτική μελέτη κοορτής που πραγματοποιήθηκε σε παιδιατρικούς ασθενείς που νοσηλεύτηκαν σε μονάδα εντατικής θεραπείας παίδων, ανέδειξαν ότι στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς τα επίπεδα της VDBP στον ορό ήταν χαμηλότερα και κατέληξαν ότι στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς θα πρέπει να εκτιμώνται ταυτόχρονα τα επίπεδα της βιταμίνης D και της VDBP. Ωστόσο, από την παρούσα διδακτορική διατριβή δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της VDBP στον ορό στα βρέφη με ιογενή ή βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου των υγιών βρεφών.

4.6 Επίπεδα βιταμίνης D και VDBP στον ορό και γονότυπος για το γονίδιο *Gc* και το γονίδιο του υποδοχέα *VDR*

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της κυκλοφορούσας βιταμίνης D (25(OH)D) είναι εν μέρει γενετικώς καθοριζόμενα [22]. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *Gc* της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με τα επίπεδα τόσο της κυκλοφορούσας δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D όσο και με τα κυκλοφορόντα επίπεδα της 25(OH)D [22,86]. Αυτή η δράση φαίνεται να μεσολαβείται κυρίως μέσω της διακύμανσης στις συγκεντρώσεις της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D [22]. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D, και συγκεκριμένα ο απλότυπος *Gc1S,* έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D που έχει ως αποτέλεσμα

μικρότερα ποσοστά ελεύθερης διαθέσιμης βιταμίνης D [22]. Ακόμα, η ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούσας βιταμίνης D και χειρότερη ανταπόκριση στη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D [92,93]. Επιπροσθέτως, η παραλλαγή *Gc2* έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα κυκλοφορόντα επίπεδα της βιταμίνης D και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D σε σύγκριση με την παραλλαγή *Gc1F* [20,86,87]. Ωστόσο, από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τα επίπεδα της 25(OH)D και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D μεταξύ των βρεφών που έφεραν τις παραλλαγές *Gc1F*, *Gc1S* και *Gc2*.

Από την παρούσα μελέτη δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών στο γονίδιο του υποδοχέα VDR που μελετήθηκαν (*FokI*, *TaqI*, *ApaI*, *BsmI*) και των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό των βρεφών. Ωστόσο, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με τη συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα VDR και τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

4.7 Σημασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της διδακτορικής διατριβής

Η έμφυτη ανοσία είναι σημαντική για την ανοσιακή απόκριση έναντι των ιογενών λοιμώξεων ενώ η ανοσιακή απόκριση έναντι των βακτηριακών λοιμώξεων στηρίζεται κυρίως στην επίκτητη χυμική ανοσιακή απόκριση. Ο υποδοχέας VDR και το ένζυμο ενεργοποίησης CYP27B1 εκφράζονται στην πλειοψηφία των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας και η βιταμίνη D ενισχύει την έμφυτη ανοσιακή απόκριση μέσω των μονοπατιών ιντερφερόνης, της επαγωγής της ενεργοποίησης των μακροφάγων, της ενίσχυσης της φαγοκυττάρωσης και της χημειοταξίας [3-5]. Επίσης, η βιταμίνη D επάγει την έκφραση της καθελικιδίνης που επίσης έχει ισχυρή αντιική δράση [3-5]. Η

δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D διαδραματίζει και άμεσο ρόλο στην ενίσχυση της έμφυτης ανοσίας καθώς εκτός του ότι είναι η κύρια πρωτεΐνη-φορέας της βιταμίνης D στα κύτταρα στόχους, συμμετέχει άμεσα στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και στη χημειοταξία [19,22]. Επιπροσθέτως έχει αναφερθεί ότι τόσο ο υποδοχέας VDR όσο και το ένζυμο ενεργοποίησης 1-α-υδροξυλάση CYP27B1 εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού ενισχύοντας την αντιική τους δράση μέσω της δράσης της βιταμίνης D σε αυτά [22,68,69,71]. Ως εκ τούτου, το μονοπάτι της βιταμίνης D διαδραματίζει τις ανοσορρυθμιστικές του επιδράσεις κυρίως ενισχύοντας την έμφυτη ανοσοαπόκριση και προωθώντας την άμυνα του ξενιστή έναντι ιογενών λοιμώξεων. Αυτό εξηγεί τα ευρήματα της μελέτης μας, καθώς οι γενετικές διαφορές σχετικά με τα γονίδια του υποδοχέα VDR και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D VDBP συσχετίστηκαν με τις ιογενείς λοιμώξεις στη βρεφική ηλικία. Η ομάδα των βρεφών με ιογενή λοίμωξη αποτελούνταν στην πλειονότητα από ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Ως εκ τούτου, τα ευρήματά μας μπορεί να αποδοθούν στο ρόλο του μονοπατιού της βιταμίνης D τόσο στις ιογενείς λοιμώξεις γενικά όσο και, ειδικότερα, στις ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος [3-5,22,68,69,71]. Από όσα γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη ασθενών-μαρτύρων που διεξήχθη σε βρέφη και διερευνήθηκαν ταυτόχρονα οι γενετικές διαφορές στα τρία πιο σημαντικά στοιχεία της οδού της βιταμίνης D: υποδοχέας βιταμίνης D, δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D που είναι ο κύριος φορέας στο πλάσμα και το ένζυμο ενδογενούς ενεργοποίησης CYP27B1, και η συσχέτιση αυτών τους με την ευπάθεια σε λοιμώξεις. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο της οδού της βιταμίνης D στην ευπάθεια σε λοιμώξεις σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα είναι περιορισμένα. Ως εκ τούτου, τα ευρήματα της μελέτης μας σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα είναι καινοτόμα και έχουν μεγάλη σημασία, καθώς στη βρεφική ηλικία οι λοιμώξεις αντιπροσωπεύουν μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας [1].

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποσαφηνίζουν περαιτέρω την ύπαρξη γενετικής ευπάθειας στις λοιμώξεις, και συγκεκριμένα στις ιογενείς λοιμώξεις, καθώς ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με τη συχνότητα των πολυμορφισμών στο μονοπάτι της βιταμίνης D (VDR, VDBP) στα βρέφη με ιογενείς λοιμώξεις συγκριτικά με τα υγιή βρέφη της ομάδας ελέγχου, ενώ ταυτόχρονα δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με το φαινότυπο, δηλαδή τα κυκλοφορούντα επίπεδα της 25(OH)D και της VDBP στον ορό στα βρέφη αυτά. Επομένως, τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα διερεύνησης ύπαρξης γενετικού υπόβαθρου στην ευπάθεια στις λοιμώξεις στα βρέφη που μπορεί να οδηγήσουν στο σχεδιασμό προληπτικών μέτρων ή εξατομικευμένης ιατρικής προσέγγισης προκειμένου να προωθηθεί η υγεία των βρεφών. Η μελέτη γονοτυπικών διαφορών στο μονοπάτι της βιταμίνης D και συγκεκριμένα του VDR και της VDBP μπορεί να αναδείξει εξατομικευμένα προληπτικά και θεραπευτικά μέσα σε βρέφη υψηλού κινδύνου για ιογενείς λοιμώξεις και να μειώσει τη νοσηρότητα και θνησιμότητα λόγω των ιογενών λοιμώξεων στη βρεφική ηλικία ειδικά την εποχή της πανδημίας SARS-CoV-2. Τα μέτρα αυτά θα μπορούσαν να αφορούν σε εξατομικευμένη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D στα πλαίσια προληπτικής παρέμβασης ή χορήγηση βιταμίνης D σε δόσεις εφόδου στα πλαίσια θεραπευτικής παρεμβάσεις σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Στα πλαίσια αυτά θα πρέπει να σχεδιαστούν και να πραγματοποιηθούν τυχαιοποιημένες μελέτες ασθενών μαρτύρων (placebo-control) σε μεγάλο πληθυσμό βρεφών, για κάθε ειδική τεκμηριωμένη ιογενή λοίμωξη όπως για παράδειγμα η RSV βρογχιολίτιδα, η λοίμωξη από SARS-CoV-2 (COVID-19), η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης, ώστε να αξιολογηθούν στην κλινική πράξη οι ευεργετικές επιδράσεις της χορήγησης βιταμίνης D και να προσδιοριστούν οι ειδικές ομάδες βρεφών και λοιμώξεων στις οποίες θα ενδείκνυται η χορήγηση της.

4.8. Περιορισμοί της μελέτης

Ο κύριος περιορισμός της μελέτης ήταν το μικρό μέγεθος του δείγματος. Ωστόσο, για να ξεπεραστεί ένας τέτοιος περιορισμός, υπήρχε ηλικιακή αντιστοίχιση των βρεφών που εντάχθηκαν στην ομάδα ελέγχου (μάρτυρες) με τα βρέφη από την ομάδα των ασθενών (βακτηριακές/ ιογενείς λοιμώξεις). Τα αποτελέσματά της παρούσας διδακτορικής διατριβής πρέπει να επιβεβαιωθούν και σε μεγαλύτερο πληθυσμό μελέτης. Επιπλέον, στη μελέτη μας οι μολύνσεις δεν αναλύθηκαν όλες με αιτιολογικό παθογόνο και η ομάδα βακτηριακών λοιμώξεων ήταν ετερογενής.

4.9. Μελλοντικές προοπτικές

Υπάρχουν μοριακές και κλινικές ενδείξεις ότι η οδός της βιταμίνης D σχετίζεται με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος στα παιδιά και τη σοβαρότητα αυτών. Η παρούσα διδακτορική διατριβή επίσης υποστηρίζει το ρόλο του μονοπατιού της βιταμίνης D στην ευπάθεια στις ιογενείς λοιμώξεις, και ιδιαίτερα στις λοιμώξεις αναπνευστικού στα βρέφη και υπογραμμίζει τη σημασία της γενετικής ευαισθησίας στην ανοσιακή απόκριση του ξενιστή στις λοιμώξεις. Υπάρχουν λίγα στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του μονοπατιού της βιταμίνης D στη λοίμωξη COVID-19 σε παιδιατρικούς ασθενείς. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να διεξαχθούν μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες ασθενών-μαρτύρων προκειμένου να αξιολογηθεί ο πιθανός ρόλος της βιταμίνης D κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με COVID-19 σε παιδιά, στη σοβαρότητα της λοίμωξης αυτής και σε παιδιατρικούς ασθενείς με MIS-C. Η μελέτη των γονοτυπικών διαφορών στο μονοπάτι της βιταμίνης D και στους παραπάνω ασθενείς μπορεί να αναδείξει εξατομικευμένα προληπτικά ή θεραπευτικά μέσα αντιμετώπισης σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Επίσης, μπορεί να διαλευκανθεί η διαφορετική απόκριση στην ίδια ηλικιακή ομάδα στην COVID-19 λοίμωξη από τυχόν

ύπαρξη γονοτυπικών διαφορών μεταξύ των ασθενών και επομένως γενετικών διαφορών στην ανοσιακή απόκριση.

5. Συμπεράσματα

Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή δείξαμε ότι οι γενετικές διαφορές στο μονοπάτι της βιταμίνης D μπορεί να ρυθμίζουν την ευαισθησία και τη σοβαρότητα των ιογενών λοιμώξεων, ιδιαίτερα των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, στη βρεφική ηλικία. Ο πολυμορφισμός του υποδοχέα *TaqI* ήταν σημαντικά συχνότερος στα βρέφη με οξείες ιογενείς λοιμώξεις σε σύγκριση με τα βρέφη στην ομάδα ελέγχου και η παραλλαγή του γονιδίου της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D *Gc1F* ήταν πιο συχνή στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τα βρέφη με οξείες ιογενείς λοιμώξεις. Επομένως, ο πολυμορφισμός *TaqI* του *VDR* φαίνεται ότι συμμετέχει στην ευπάθεια στις ιογενείς λοιμώξεις στα βρέφη ενώ η γενετική παραλλαγή *Gc1F* του γονιδίου της *VDBP* φαίνεται να ενισχύει την ανοσιακή απόκριση του ξενιστή ενάντια στις ιογενείς λοιμώξεις στα βρέφη. Τα επίπεδα της 25(OH)D και της VDBP στον ορό δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των βρεφών με ιογενή λοίμωξη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ούτε μεταξύ των βρεφών με βακτηριακή λοίμωξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά διευκρινίζουν περαιτέρω την ύπαρξη γενετικής ευαισθησίας στις ιογενείς λοιμώξεις στη βρεφική ηλικία. Η ανίχνευση των γενετικών πολυμορφισμών στο μονοπάτι της βιταμίνης D, συγκεκριμένα του υποδοχέα VDR και της δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιταμίνης D VDBP, μπορεί να αναδείξει εξατομικευμένα προληπτικά και θεραπευτικά μέσα σε βρέφη υψηλού κινδύνου για ιογενείς λοιμώξεις και να μειώσει τη νοσηρότητα και θνησιμότητα λόγω των ιογενών λοιμώξεων στη βρεφική ηλικία ειδικά την εποχή της πανδημίας SARS-CoV-2

6. Χρηματοδοτήσεις

Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Δράσης «ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του ΕΣΠΑ 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου και του ελληνικού δημοσίου, από τον 12/2016 έως 09/2019. Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε επίσης από την ετήσια ανταγωνιστική δωρεά «Παιδί και Υγεία» για το έτος 2015 της εταιρείας ¨Πρόκτερ & Γκάμπλ Ελλάς¨.

7. Βιβλιογραφία

1. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol*. 2019; 60(3): 237-244.
2. Christakos S, Li S, De La Cruz J, Bikle DD. New developments in our understanding of vitamin metabolism, action and treatment. *Metabolism*. 2019; 98:112-120.
3. Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 2009; 4(9): 1151-65.
4. Gunville CF, Mourani PM, Ginde AA. The role of vitamin D in prevention and treatment of infection. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2013; 12 :239-45.
5. Lin R. Crosstalk between Vitamin D Metabolism, VDR Signalling, and Innate Immunity. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 1375858.
6. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*. 2020; 12(7): 2097.
7. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365: 1147–52.
8. Challa, A., Ntourntoufi, A., Cholevas, V., Galanakis, E., Andronikou, S. Breastfeeding and vitamin D status in Greece during the first 6 months of life. *Eur J Pediatr.* 2005; 164: 724-729.
9. Larkin A, Lassetter J. Vitamin D deficiency and acute lower respiratory infections in children younger than 5 years: identification and treatment. *J Pediatr Health Care.* 2014; 28(6): 572-82.
10. Esposito S, Lelii M. Vitamin D and respiratory tract infections in childhood. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 487.

11. Thornton KA, Marín C, Mora-Plazas M, Villamor E. Vitamin D deficiency associated with increased incidence of gastrointestinal and ear infections in school-age children. *Pediatr Infect Dis J*. 2013; 32(6): 585-93.
12. Madden K, Feldman H, Smith E. Vitamin D deficiency in critically ill children. *Pediatrics*. 2012; 130: 421-28.
13. Radujkovic A, Hippchen T, Tiwari-Heckler S, Dreher S, Boxberger M, Merle U. Vitamin D Deficiency and Outcome of COVID-19 Patients. Nutrients. 2020 Sep 10;12(9):2757.
14. Thacher TD, Fischer PR, Tebben PJ, Singh RJ, Cha SS, Maxson JA, et al. Increasing incidence of nutritional rickets: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 2013; 88(2): 176-83.
15. Zhou JC, Zhu Y, Gong C, Liang X, Zhou X, Xu Y, et al. The *GC2* haplotype of the vitamin D binding protein is a risk factor for a low plasma 25-hydroxyvitamin D concentration in a Han Chinese population. *Nutr Metab.* 2019; 16:5.
16. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood. *J Infect Dis*. 2008; 197(5): 676-80.
17. Triantos C, Aggeletopoulou I, Kalafateli M, Spantidea PI, Vourli G, Diamantopoulou G, et al. Prognostic significance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in liver cirrhosis. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 14065.
18. Wang X, Cheng W, Ma Y, Zhu J. Vitamin D receptor gene FokI but not TaqI, ApaI, BsmI polymorphism is associated with Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2017; 7:41540.

19. Malik S, Fu L, Juras DJ, Karmali M, Wong BY, Gozdzik A, et al. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013; 50(1): 1-22.
20. Martineau AR, Leandro AC, Anderson ST, Newton SM, Wilkinson KA, Nicol MP, et al. Association between Gc genotype and susceptibility to TB is dependent on vitamin D status. *Eur Respir J.* 2010; 35(5): 1106-12
21. Zhu Q, Li N, Han Q, Li Z, Zhang G, Li F, et al. Single-nucleotide polymorphism at CYP27B1-1260, but not VDR Taq I, is possibly associated with persistent hepatitis B virus infection. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012; 16: 1115-1121.
22. Randolph AG, Yip WK, Falkenstein-Hagander K, Weiss ST, Janssen R, Keisling S, et al. Vitamin D-binding protein haplotype is associated with hospitalization for RSV bronchiolitis. *Clin Exp Allergy*. 2014; 44(2): 231-7.
23. Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, et al. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer. *Respir Res*. 2011;12(1):31.
24. Adams JS, Ren S, Liu PT., Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, et al. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J. Immunol.* 2009; 182: 4289–4295.
25. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013; 5: 2502–2521.
26. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, et al. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J. Immunol.* 2009; 182: 4289–4295.
27. Shahmiri M, Enciso M, Adda CG, Smith BJ, Perugini MA, Mechler A. Membrane Core-Specific Antimicrobial Action of Cathelicidin LL-37

Peptide Switches Between Pore and Nanofibre Formation. *Sci. Rep.* 2016;6: 38184.

28. Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A, Nash AA, York IA, Pohl J, et al. Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS ONE.* 2011;6: e25333.
29. Sousa FH, Casanova V, Findlay F, Stevens C, Svoboda P, Pohl J, et al. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus. *Peptides.* 2017; 95: 76–83.
30. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 266–281.
31. Adorini L, Penna G. Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009: 251–273.
32. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2000; 164:4443–4451.
33. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J. Clin. Investig.* 2009; 119: 387–398.
34. Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, Mathews RJ, Emery P, McDermott MF. Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatology.* 2010; 49: 1466–1471.
35. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245–252.
36. Weeres MA, Robien K, Ahn Y, Neulen ML, Bergerson R, Miller JS, et al. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro human NK cell

development from hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 2014; 193: 3456–3462.

37. Ota K, Dambaeva S, Kim MW, Han AR, Fukui A, Gilman-Sachs A, et al. 1,25-Dihydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell cytotoxicity, cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses. *Eur. J. Immunol.* 2015; 45: 3188–3199.
38. Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, et al. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol. Endocrinol.* 2014; 28:53–64.
39. Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients.* 2020; 12: 575.
40. He Y, Wu W, Wu S, Zheng HM, Li P, Sheng HF, et al. Linking gut microbiota, metabolic syndrome and economic status based on a population-level analysis. *Microbiome.* 2018; 6: 172.
41. Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 2227–2231.
42. Su D, Nie Y, Zhu A, Chen Z, Wu P, Zhang L, et al. Vitamin D Signaling through Induction of Paneth Cell Defensins Maintains Gut Microbiota and Improves Metabolic Disorders and Hepatic Steatosis in Animal Models. *Front. Physiol.* 2016; 7: 498.
43. Fakhoury HMA, Kvietys PR, AlKattan W, Anouti FA, Elahi MA, Karras SN, et al. Vitamin D and intestinal homeostasis: Barrier, microbiota, and immune modulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2020; 200:105663.

44. Chakaroun RM, Massier L, Kovacs P. Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients.* 2020; 12: 1082.
45. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: Presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983; 57: 1308–1310.
46. Amento EP, Bhalla AK, Kurnick JT, Kradin RL, Clemens TL, Holick SA, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces maturation of the human monocyte cell line U937, and, in association with a factor from human T lymphocytes, augments production of the monokine, mononuclear cell factor. *J. Clin. Investig.* 1984; 73: 731–739.
47. Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 321: 103–111.
48. Kongsbak M, von Essen MR, Levring TB, Schjerling P, Woetmann A, Odum N, et al. Vitamin D-binding protein controls T cell responses to vitamin D. *BMC Immunol.* 2014; 15: 35.
49. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells. *Nutrients.* 2015; 7: 3011–3021.
50. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: Preferential inhibition of Th1 functions. *J. Nutr.* 1995; 125: 1704S–1708S.
51. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *J. Immunol.* 2001; 167: 4974.

52. Mocanu V, Oboroceanu T, Zugun-Eloae F. Current status in vitamin D and regulatory T cells--immunological implications. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 2013; 117: 965–973.
53. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2002; 51: 1367–1374.
54. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin d receptor and T cell function. *Front. Immunol.* 2013; 4: 148.
55. Sarkar S, Hewison M, Studzinski GP, Li YC, Kalia V. Role of vitamin D in cytotoxic T lymphocyte immunity to pathogens and cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2016; 53: 132–145.
56. Mao X, Hu B, Zhou Z, Xing X, Wu Y, Gao J, et al. Vitamin D levels correlate with lymphocyte subsets in elderly patients with age-related diseases. *Sci. Rep.* 2018; 8: 7708.
57. Eckard AR, O'Riordan MA, Rosebush JC, Lee ST, Habib JG, Ruff JH, et al. Vitamin D supplementation decreases immune activation and exhaustion in HIV-1-infected youth. *Antivir. Ther.* 2018; 23: 315–324.
58. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol.* 2007; 179: 1634–1647.
59. Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Investig.* 1984; 74: 657–661.
60. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D

deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.

61. Weydert JA. Vitamin D in Children's Health. Children (Basel). 2014; 1(2): 208-26.
62. American Geriatrics Society Workgroup on Vitamin D Supplementation for Older Adults. Recommendations abstracted from the American Geriatrics Society Consensus Statement on vitamin D for Prevention of Falls and Their Consequences. *J Am Geriatr Soc*. 2014; 62(1): 147-52.
63. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GE, et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int*. 2010; 21(7): 1151-4.
64. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Erratum to: Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2015; 26(7):2045-7.
65. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M; Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 2008; 122(2):398-417.
66. American Academy of Pediatrics Dietary reference intakes for calcium and vitamin D**.** *Pediatrics.* 2012; 130: 1424.
67. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(2): 394-415.
68. Telcian AG, Zdrenghea MT, Edwards MR, Laza-Stanca V, Mallia P, Johnston SL, et al. Vitamin D increases the antiviral activity of bronchial epithelial cells in vitro. *Antiviral Res*. 2017; 137: 93-101.

69. Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol*. 2008;181(10): 7090–7099.
70. Hansdottir S, Monick MM, Lovan N, Powers L, Gerke A, Hunninghake GW. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state. *J Immunol*. 2010; 184: 965–74.
71. Zdrenghea MT, Makrinioti H, Bagacean C, Bush A, Johnston SL, Stanciu LA. Vitamin D modulation of innate immune responses to respiratory viral infections. *Rev Med Virol*. 2017; 27:1.
72. Belderbos ME, Houben ML, Wilbrink B, Lentjes E, Bloemen EM, Kimpen JL, et al. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics*. 2011; 127: e1513–20.
73. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*. 2017; 15; 356: i 6583.
74. Martineau AR, Jolliffe DA, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, Dubnov-Raz G, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: Individual participant data meta-analysis. *Health Technol. Assess.* 2019; 23:1–4.
75. Urashima M., Segawa T., Okazaki M., Kurihara M., Wada Y., Ida H. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 91: 1255–1260.

76. Camargo CA Jr, Ganmaa D, Frazier AL, Kirchberg FF, Stuart JJ, Kleinman K, et al. Randomized Trial of Vitamin D Supplementation and Risk of Acute Respiratory Infection in Mongolia. *Pediatrics.* 2012; 130: E561–E567.
77. Marchisio P, Consonni D, Baggi E, Zampiero A, Bianchini S, Terranova L, et al. Vitamin D Supplementation Reduces the Risk of Acute Otitis Media in Otitis-prone Children. *Pediatric Infect. Dis. J.* 2013; 32: 1055–1060.
78. Mailhot G, White JH. Vitamin D and Immunity in Infants and Children. *Nutrients*. 2020; 12(5):1233.
79. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002; 35(1): 126–131.
80. McNally JD, Sampson M, Matheson LA, Hutton B, Little J. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and severe RSV bronchiolitis: a systematic review and meta-analysis. Pediatr Pulmonol. 2014; 49(8): 790-9.
81. Abouzeid H, Abdelaal NM, Abdou MA, Mosabah AAA, Zakaria MT, Soliman MM, et al. Association of vitamin D receptor gene FokI polymorphism and susceptibility to CAP in Egyptian children: a multicenter study. *Pediatr Res*. 2018; 84(5): 639-644.
82. Alvarez AE, Marson FAL, Bertuzzo CS, Bastos JCS, Baracat ECE, Brandão MB, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in TLR4, TLR2, TLR9, VDR, NOS2 and CCL5 genes with acute viral bronchiolitis. *Gene.* 2018; 645:7-17.
83. Laplana M, Royo JL, Fibla J. Vitamin D Receptor polymorphisms and risk of enveloped virus infection: A meta-analysis. Gene. 2018; 678: 384-394.
84. Mansy W, Ibrahim NH, Al-Gawhary S, Alsubaie SS, Abouelkheir MM, et al. Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphism in Saudi

children with acute lower respiratory tract infection. *Mol Biol Rep.* 2019; 46(2):1955-1962.

85. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet.* 1993; 92(2): 183–188.
86. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 2005; 77(1): 15–22.
87. Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, et al. The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin d status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(6): 1339–1343.
88. Yamamoto N, Homma S, Millman I. Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. Role of vitamin D3-binding protein (group specific component, Gc) in lysophospholipid activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1991; 147: 273–80.
89. Yamamoto N, Kumashiro R, Yamamoto M, Willett NP, Lindsay DD. Regulation of inflammation-primed activation of macrophages by two serum factors, vitamin D3-binding protein and albumin. *Infect Immun*. 1993; 61: 5388–91.
90. Nagasawa H, Sasaki H, Uto Y, Kubo S, Hori H. Association of the macrophage activating factor (MAF) precursor activity with polymorphism in vitamin D-binding protein. *Anticancer Res*. 2004; 24(5C): 3361-6.

91. Palframan KM, Robinson SL, Mora-Plazas M, Marin C, Villamor E. Vitamin D-binding protein is inversely associated with the incidence of gastrointestinal and ear infections in school-age children. *Epidemiol Infect*. 2018; 146(15): 1996-2002.
92. Enlund-Cerullo M, Koljonen L, Holmlund-Suila E, Hauta-Alus H, Rosendahl J, Valkama S, et al. Genetic Variation of the Vitamin D Binding Protein Affects Vitamin D Status and Response to Supplementation in Infants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019; 104(11): 5483-5498.
93. Newton DA, Baatz JE, Kindy MS, Gattoni-Celli S, Shary JR, Hollis BW, et al. Vitamin D binding protein polymorphisms significantly impact vitamin D status in children. *Pediatr Res*. 2019; 86(5):674.
94. Kloc M, Ghobrial RM, Lipińska-Opałka A, Wawrzyniak A, Zdanowski R, Kalicki B, et al. Effects of vitamin D on macrophages and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) hyperinflammatory response in the lungs of COVID-19 patients. *Cell Immunol*. 2021; 360: 104259.
95. Feketea G, Vlacha V, Bocsan IC, Vassilopoulou E, Stanciu LA, Zdrenghea M. Vitamin D in Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) Related Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). *Front Immunol*. 2021;12:648546.
96. Marik PE, Kory P, Varon J. Does vitamin D status impact mortality from SARS-CoV-2 infection? *Medicine in drug discovery*. 2020; 6:100041.
97. Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A, Nash AA, York IA, Pohl J, et al. Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS One.* 2011;6(10): e25333.

98. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89-90(1-5): 387-92.
99. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020; 367(6485): 1444-1448.
100. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020; 181: 271-280.e8.
101. Yılmaz K, Şen V. Is vitamin D deficiency a risk factor for COVID-19 in children? *Pediatr Pulmonol*. 2020; 55(12): 3595-3601.
102. Riera M, Anguiano L, Clotet S, Roca-Ho H, Rebull M, Pascual J, et al. Paricalcitol modulates ACE2 shedding and renal ADAM17 in NOD mice beyond proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310(6): F534-46.
103. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med*. 2020; 8(4): e21.
104. Bombardini T, Picano E. Angiotensin-converting enzyme 2 as the molecular bridge between epidemiologic and clinical features of COVID-19. *Can J Cardiol*. 2020; 36(5): 784.e1-.e2.
105. Rehan VK, Torday JS, Peleg S, Gennaro L, Vouros P, Padbury J, et al. 1α, 25-Dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1α, 25-dihydroxy vitamin D3: production and biological activity studies in pulmonary alveolar type II cells. *Mol Gen Metab*. 2002; 76(1): 46-56.

106. McCartney DM, Byrne DG. Optimisation of Vitamin D Status for Enhanced Immuno-protection Against Covid-19. *Ir Med J*. 2020; 113(4):58.

107. Bayramoğlu E, Akkoç G, Ağbaş A, Akgün Ö, Yurdakul K, Selçuk Duru HN, et al. The association between vitamin D levels and the clinical severity and inflammation markers in pediatric COVID-19 patients: single-center experience from a pandemic hospital. *Eur J Pediatr*. 2021; 31:1–7.

108. Isoldi S, Mallardo S, Marcellino A, Bloise S, Dilillo A, Iorfida D, et al. The comprehensive clinic, laboratory, and instrumental evaluation of children with COVID-19: A 6-months prospective study. *J Med Virol*. 2021; 93(5): 3122-3132.

109. Speeckaert MM, Speeckeart R, Delanghe JR. Genetic polymorphisms, vitamin D binding protein and vitamin D deficiency in COVID-19. *Eur Respir J*. 2021; 4: 2004638.

110. Speeckaert MM, De Buyzere ML, Delanghe JR. Vitamin D binding protein polymorphism and COVID-19. *J Med Virol*. 2021; 93(2): 705-707.

111. Speeckaert MM, Speeckaert R, Delanghe JR. The biologic importance of the vitamin D binding protein polymorphism in pediatric COVID-19 patients [published online ahead of print, 2021 May 23]. *Eur J Pediatr*. 2021;1-2.

112. Spadera L, Spadera M. Potential role of GcMAF in suppressing the severity of COVID-19-induced immune responses: Lesson learned from HIV. *Med Hypotheses*. 2020; 144: 110293.

113. Feketea G, Vlacha V, Bocsan IC, Vassilopoulou E, Stanciu LA, Zdrenghea M. Vitamin D in Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) Related Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). *Front. Immunol.* 2021; 12: 648546.

114. Vassiliou AG, Jahaj E, Pratikaki M, Orfanos SE, Dimopoulou I, Kotanidou A. Low 25-Hydroxyvitamin D levels on admission to the intensive care unit may predispose COVID-19 pneumonia patients to a higher 28-day mortality risk: a pilot study on a Greek ICU cohort. *Nutrients.* 2020; 12: 3773.

115. Falcini F, Stagi S, Lepri G, Casalini E, Rigante D, Matucci-Cerinic M. SAT0505 severe vitamin D deficiency in patients with kawasaki disease: its possible role in the risk to develop coronary artery damage. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74: 843.

116. Radujkovic, A. Vitamin D deficiency and outcome of COVID-19 patients. *Nutrients.* 2020; 12: 2757.

117. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A,et al. Influence of vitamin D defi- ciency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis amongst Gujarati Asians in West London: a case-control study. *Lancet*. 2000; 355: 618-621.

118. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Maraki S, Papavasiliou E, Galanakis E. Staphylococcus aureus nasal carriage might be associated with vitamin D receptor polymorphisms in type 1 diabetes. *Int J Infect Dis.* 2009; 13: 437-443.

119. Mahyar A, Ayazi P, Sarkhosh Afshar A, Naserpour Farivar T, Sahmani M, Oveisi S, et al. Vitamin D receptor gene (FokI, TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms in children with urinary tract infection. *Pediatr Res*. 2018**;** 84: 527-532.

120. Biswas S, Kanwal B, Jeet C, Seminara R. S. Fok-I, Bsm-I, and Taq-I Variants of Vitamin D Receptor Polymorphism in the Development of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Cureus*. 2018; 10: e3228.

121. Xie CN, Yue M, Huang P, Tian T, Fan HZ, Wu MP, et al. Vitamin D binding protein polymorphisms influence susceptibility to hepatitis C virus infection in a high-risk Chinese population. *Gene*. 2018; 679: 405-411.

122. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to in- terferon-alfa based therapy. *J Hepatol.* 2011; 54: 887-893.

123. Lopez ER, Zwermann O, Segni M, Meyer G, Reincke M, Seissler J, et al. A promoter poly- morphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *Eur J Endocrinol*. 2004; 151: 193-197.

124. Palframan KM, Robinson SL, Mora-Plazas M, Marin C, Villamor E. Vitamin D-binding protein is inversely associated with the incidence of gastrointestinal and ear infections in school-age children. *Epidemiol Infect.* 2018; 146(15): 1996-2002.