

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Karolina Śledzińska

**„Rola witaminy D₃ oraz polimorfizmu genu kodującego receptor
witaminy D₃ w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci”**

Praca na stopień doktora nauk medycznych
Promotor: dr hab. n. med. Anna Liberek, prof. nadzw. GUMed

Gdańsk 2016

Streszczenie

Wstęp: Doniesienia ostatnich lat sugerują powszechny niedobór witaminy D w populacji zarówno dziecięcej jak i u osób dorosłych. Dwie główne przyczyny niedoboru witaminy D to obniżona synteza skórna oraz niedostateczna podaż z pokarmem.

Dzieci z NZJ stanowią szczególną grupę ryzyka niedoboru witaminy D. W przebiegu procesu chorobowego dochodzi do upośledzenia wchłaniania, enteropatii z utratą białka wtórnie do stanu zapalnego w jelicie, w grupie tej w związku z chorobą ma miejsce obniżona ekspozycja na słońce oraz obniżona podaż witaminy D z dietą. Szczególnie należy zwrócić uwagę na problem hipowitaminozy D u dzieci z wczesnym początkiem i cięższym przebiegiem schorzenia, z niskim stężeniem albuminy, niższym BMI oraz odchyleniami w badaniu densytometrycznym. Dodatkowym, ważnym czynnikiem ryzyka jest objęcie procesem chorobowym górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Dane z piśmiennictwa podkreślające udział witaminy D w różnych aspektach regulacji odpowiedzi immunologicznej ustroju, sugerują rozważenie jej zaangażowania nie tylko jako witaminy uczestniczącej w homeostazie wapniowo-fosforanowej, ale także jako mediatora auto- i parakrynnego z aktywnym udziałem w patomechanizmie wielu chorób, w tym nieswoistych zapaleniach jelit. W związku z tym, że wyniki większości badań analizujących status gospodarki wapniowo-fosforanowej w NZJ są niejednoznaczne, w ostatnich latach dyskusja skupia się na potencjalnej roli witaminy D jako czynnika ryzyka wystąpienia i ewolucji stanu zapalnego w jelicie.

Jednym z genów - kandydatów wymienianych w badaniach nad patogenezą NZJ jest gen receptora witaminy D (12q12-14). Do najczęstszych polimorfizmów genu *VDR* należą warianty ApaI, TaqI, BsmI, FokI oraz Cdx2.

Hipoteza badawcza: U dzieci chorujących na nieswoiste zapalenie jelit występuje obniżony poziom witaminy D we krwi oraz stwierdza się zaburzenia w zakresie gospodarki wapniowo-fosforanowej. Istnieje związek między obecnością polimorfizmów genu kodującego receptor witaminy D, a przebiegiem nieswoistych zapaleń jelit u dzieci.

Cel pracy:

1. Ocena stopnia niedoboru witaminy D w populacji dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej.
2. Poszukiwanie czynników mogących mieć wpływ na stężenie we krwi witaminy D w grupie dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej.
3. Ocena częstości występowania analizowanych polimorfizmów genu receptora witaminy D w badanej grupie dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej.
4. Poszukiwanie ewentualnego związku obecności polimorfizmów: Cdx2, FokI, ApaI, BsmI i TaqI genu receptora witaminy D (*VDR, vitamin D receptor*) z predyspozycją do zachorowania na nieswoiste zapalenie jelit.
5. Określenie ewentualnego związku niedoboru witaminy D u badanych dzieci z nosicielstwem analizowanych polimorfizmów genu receptora witaminy D.
6. Próba poszukiwania związku występowania polimorfizmów: Cdx2, FokI, ApaI, BsmI i TaqI genu receptora witaminy D z przebiegiem klinicznym (aktywnością choroby, lokalizacją i rozległością zmian chorobowych) oraz wynikami wybranych badań laboratoryjnych w grupie dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit.
7. Dodatkowym celem było rozważenie wskazań do suplementacji witaminy D w badanej grupie dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit oraz w grupie kontrolnej.

Material i metody: Badaniem objęto 109 dzieci w wieku od 3,16 do 17,9 lat hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci GUMed oraz Pediatrycznym Szpitalnym Oddziale Ratunkowym COPERNICUS Sp.z.o.o. W grupie chorych z NZJ były 62 osoby, w tym 34 pacjentów chorujących na ChLC i 28 z WZJG. Grupę kontrolną (porównawczą) stanowiło 47 dzieci.

Kryterium zakwalifikowania do grupy badanej było rozpoznanie NZJ, które ustalono na podstawie: obrazu klinicznego, badania endoskopowego – dolnego odcinka przewodu pokarmowego, a u części badanych także górnego odcinka przewodu pokarmowego (podejrzenie ChLC), oceny histopatologicznej bioptatów błony śluzowej jelita grubego oraz wyników badań dodatkowych.

Stężenie witaminy D we krwi oznaczano przy użyciu metody immunochemiluminescencji z wykorzystaniem analizatora Liaison XL firmy DiaSorin (metoda CLIA). Badanie wykonywano w osoczu uzyskanym z krwi pobranej do probówki z EDTA. Do oznaczenia polimorfizmów Cdx2, TaqI, ApaI, BsmI oraz FokI w genie *VDR* zastosowano metodę minisekwencjonowania opisaną przez Lins i wsp.

Wyniki: Średnie stężenie witaminy D w grupie badawczej wynosiło 19,87 ng/ml (20,21 ng/ml u chorych z ChLC, 19,45 ng/ml z WZJG) i było znamienne wyższe niż w grupie porównawczej (16,07 ng/ml). U zdecydowanej większości analizowanych, zarówno w grupie badawczej (59,7%) jak i porównawczej (80,85%) stwierdzono niedobór witaminy D; stężenie suboptymalne wykazano u 27,4% chorych z NZJ i u 15% dzieci z grupy porównawczej, natomiast prawidłowe stężenie witaminy D odpowiednio u 9,7% i 4,25% dzieci.

Wykazano istotnie wyższe średnie stężenie witaminy 25(OH)D w całej grupie dzieci (NZJ, K) stosujących jej suplementację (21,89 ng/ml) w stosunku do grupy dzieci, które nie stosowały suplementacji (16,03 ng/ml).

Analizując związek typu stosowanej terapii i stężenia witaminy D w grupie dzieci z NZJ wykazano istotnie niższe stężenie witaminy D u chorych przyjmujących jedynie GKS w stosunku do pacjentów otrzymujących jednocześnie GKS i preparaty witaminy D, ponadto wykazano istotnie wyższe stężenie witaminy D w grupie dzieci z ChLC, które w momencie włączenia do badania otrzymywały leki biologiczne (26,57 ng/ml).

Rozpatrując stężenie witaminy D w zależności od lokalizacji endoskopowej zmian chorobowych wykazano w grupie chorych z ChLC istotnie wyższe jej stężenie w grupie z lokalizacją L3 (26,22 ng/ml) w porównaniu do grupy dzieci z lokalizacją L2 (19,24 ng/ml) i grupą porównawczą (16,07 ng/ml).

Wykazano ponadto istotnie najwyższe stężenie witaminy D (28,24 ng/ml) w grupie osób eksponowanej na słońce codziennie w każdej porze roku w stosunku do pozostałych grup, najniższe stężenie (15,5 ng/ml) wykazano w grupie eksponowanej na słońce najrzadziej.

W wyniku analizy polimorfizmów genu *VDR* nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy częstości występowania poszczególnych genotypów między badanymi grupami (NZJ, K) i podgrupami (ChLC, WZJG, K) w zakresie wszystkich

analizowanych polimorfizmów (Cdx2, FokI, BsmI, ApaI, TaqI), jednakże wykazano istotnie statystyczną zwiększoną szansę zachorowania na NZJ dla genotypu GA polimorfizmu Cdx2 (2,3x krotnie) oraz genotypu GA polimorfizmu BsmI (2,07x krotnie).

W niniejszej pracy wykazano związek między stopniem aktywności choroby u pacjentów z WZJG z występowaniem polimorfizmu FokI ($p=0,027$); nie wykazano związku pomiędzy stopniem aktywności choroby a pozostałymi polimorfizmami genu *VDR*. Ponadto wykazano związek między lokalizacją choroby w paryskiej klasyfikacji endoskopowej u pacjentów z WZJG a występowaniem polimorfizmu Cdx2 genu receptora witaminy D ($p=0,046$); nie wykazano związku pomiędzy lokalizacją choroby a pozostałymi polimorfizmami genu *VDR*.

Analizując związek badanych polimorfizmów genu *VDR* z wybranymi wynikami badań laboratoryjnych u pacjentów z NZJ wykazano statystycznie istotną zależność w zakresie wyższego stężenia witaminy D u pacjentów z NZJ oraz ChLC z homozygotą recesywną (genotyp TT) polimorfizmu TaqI w stosunku do homozygoty dominującej oraz z homozygotą recesywną (genotyp GG) polimorfizmu BsmI w stosunku do homozygoty dominującej.

Wnioski:

1. Zarówno w populacji dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit jak i w grupie porównawczej obserwowano niedobór witaminy D, dotyczył on w większym stopniu dzieci z grupy porównawczej. Sugeruje to konieczność suplementacji witaminy D w grupie dzieci chorujących na nieswoiste zapalenia jelit oraz u ich zdrowych rówieśników, zwłaszcza u nastolatków.
2. Wykazano, że codzienna ekspozycja na promieniowanie słoneczne, wpływa korzystnie na stężenia witaminy D we krwi badanych dzieci. W związku z tym, wskazane jest promowanie przebywania dzieci na świeżym powietrzu.
3. Wydaje się, że stan odżywienia, styl życia badanych (dieta, aktywność fizyczna) nie modyfikują poziomu witaminy D we krwi. Obserwacje powyższe wymagają jednak weryfikacji w większych grupach badanych.
4. W związku z tym, że u badanych pacjentów z ChLC, mimo stwierdzenia rozległych zmian chorobowych w badaniu endoskopowym przewodu pokarmowego, wykazano wyższe stężenie witaminy D we krwi w porównaniu do grupy ze zmianami chorobowymi ograniczonymi

do okrężnicy, można wnioskować o mniej nasilonych zaburzeniach wchłaniania w przebiegu tego schorzenia niż dotychczas sądzono.

5. W związku z tym, że nie obserwowano różnicy w częstości występowania badanych polimorfizmów genu receptora witaminy D w grupie dzieci chorych i w grupie porównawczej, wydaje się, że analiza częstości ich występowania nie pozwala na szacowanie zapadalności na nieswoiste zapalenia jelit.
6. Ze względu na to, że występowanie genotypów heterozygotycznych dla polimorfizmów Cdx2 oraz BsmI genu receptora witaminy D zwiększa ryzyko zachorowania na nieswoiste zapalenia jelit, należy rozważyć poszukiwanie tych polimorfizmów w przypadku trudności diagnostycznych u pacjentów z objawami sugerującymi NZJ.
7. Wykazany związek obecności homozygoty recesywnej dla polimorfizmów TaqI oraz BsmI genu receptora witaminy D z wyższym stężeniem witaminy D we krwi pacjentów z NZJ być może wyjaśnia zróżnicowane poziomy tej witaminy w grupie dzieci chorych na nieswoiste zapalenie jelit. Obserwacje powyższe nie pozwalają jednak na wysunięcie jednoznacznych wniosków i wymagają badań w większej grupie pacjentów
8. Dla analizowanej populacji dzieci z WZJG wykazano wprawdzie związek między lokalizacją choroby w klasyfikacji paryskiej a występowaniem polimorfizmu Cdx2 genu receptora witaminy D oraz stopniem aktywności choroby i obecnością polimorfizmu FokI, jednak powyższe obserwacje wymagają szerokich badań w celu jednoznacznego potwierdzenia wpływu ich obecności na przebieg nieswoistych zapaleń jelit.
9. Wydaje się, że na tym etapie analizy wariantów genetycznych receptora witaminy D trudno formułować wiążące wnioski na temat wpływu ich obecności na wyniki parametrów laboratoryjnych.

Słowa kluczowe: dzieci, nieswoiste zapalenie jelit, witamina D, polimorfizmy genu receptora witaminy D

Summary

Introduction: Reports of recent years suggest that vitamin D deficiency in the population is fairly common, both in children and adults. Two main causes of vitamin D deficiency is its reduced skin synthesis and insufficient supply in everyday diet.

Children with IBD are at special risk of vitamin D deficiency as in the disease process comes to malabsorption, protein-losing enteropathy secondary to inflammation in the intestine, also in this group of patients sun exposure is reduced and intake of vitamin D in diet is decreased. We should especially pay attention to the problem of hypovitaminosis D in children with early-onset or severe course of the disease, with low levels of albumin, a lower BMI and with abnormalities in the densitometry study. An additional important risk factor is occupation of the upper gastrointestinal tract in the course of the disease.

Data from the literature emphasizing the participation of vitamin D in different areas of regulation of the immune response system, suggest the consideration of its commitment not only as a vitamin involved in the homeostasis of calcium and phosphate balance, but also as an auto- and paracrine mediator with the active participation in the pathogenesis of many diseases, including inflammatory bowel disease. In view of the fact that the majority of studies examining the status of the calcium-phosphate balance in IBD are ambiguous in recent years, the discussion focuses on the possible role of vitamin D as a risk factor of occurrence and evolution of inflammation in the intestine.

One of the genes - candidates mentioned in the study of the pathogenesis of IBD is a vitamin D receptor gene. The most common polymorphisms of *VDR* gene include ApaI , TaqI , BsmI , FokI and Cdx2 .

Research hypothesis: In children suffering from IBD vitamin D level in blood is decreased and abnormalities in the calcium - phosphate balance occur. There is a relationship between the presence of individual polymorphisms of *VDR* gene and the course of inflammatory bowel disease in children.

The aim of this study was to:

1. Evaluate the extent of vitamin D deficiency in the population of children with inflammatory bowel disease in comparison with control group.
2. Search for factors that may affect the blood levels of vitamin D in the group of children with inflammatory bowel disease and in the control group.
3. Evaluate the prevalence of polymorphisms of *VDR* gene in the group of children with inflammatory bowel disease and in the control group.
4. Search for a possible relation of polymorphisms of *VDR* gene: Cdx2, FokI, ApaI, BsmI and TaqI with susceptibility to inflammatory bowel disease.
5. Determine the possible relationship of vitamin D deficiency in the children with the carrier state of the analyzed polymorphisms of the vitamin D receptor gene.
6. Attempt to search for relation of prevalence of polymorphisms of *VDR* gene: Cdx2, FokI, ApaI, BsmI and TaqI with the clinical course of disease activity, location and extent of lesions and the results of some laboratory tests in children with inflammatory bowel disease.
7. Additionally examine the indications for supplementation of vitamin D in the group of children with inflammatory bowel disease and in the control group.

Material and Methods: The study included 109 children aged from 3.16 years to 17.91 years, hospitalized in the Department of Pediatrics, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition of Children MUG and Pediatric Emergency Department COPERNICUS. The group of patients with IBD consisted of 62 people, including 34 people suffering from Crohn's disease and 28 from ulcerative colitis. The control group (comparative) consisted of 47 people.

Diagnosis of IBD was the criterion to qualify for the study group; it was based on: the clinical course, endoscopy of the lower gastrointestinal tract and, if Crohn's disease was suspected, of the upper gastrointestinal tract, histopathological evaluation of colonic mucosa biopsies and results in additional blood studies.

Vitamin D concentration was determined with the method of immunochemiluminescence using XL analyzer Liaison DiaSorin (CLIA method). Assay was performed in plasma obtained from blood collected in EDTA tubes. For the determination of polymorphisms of *VDR* gene: Cdx2, TaqI, ApaI, BsmI and FokI mini-sequencing method described by Lins et al was used.

Results: The mean concentration of vitamin D in the research group was 19.87 ng/ml (20.21 ng/ml in patients with CD, 19.45 ng/ml in UC) and was significantly higher than in the control group (16.07 ng/ml). In the vast majority of the analyzed patients both in the research group (59.7%) and comparative group (80.85%) vitamin D deficiency occurred; suboptimal concentration was found in 27.4% of patients with IBD and 15% of children in the comparison group, while normal levels of vitamin D, respectively, in 9.7% and 4.25 % of the children.

In the entire group of children (IBD, K) significantly higher average concentration of vitamin 25(OH)D was found in the group supplemented with vitamin D (21.89 ng/ml) compared to a group of children who did not use supplements (16.03 ng/ml).

Analyzing the relationship between type of therapy and the levels of vitamin D, children taking only steroids had significantly lower levels of vitamin D in relation to children receiving concomitant glucocorticosteroids and vitamin D supplements. Also children with CD who were receiving biologic drugs (26.57 ng/ml) had significantly higher levels of vitamin D.

Considering the level of vitamin D based on the location of endoscopic lesions it has been demonstrated that patients with CD with location L3 (26.22 ng/ml) had significantly higher concentrations of vitamin D when compared to children with location of L2 (19.24 ng/ml) and the control group (16.07 ng/ml).

Additionally, significantly highest concentration of vitamin D (28.24 ng/ml) in patients exposed to the sun every day at any time of the year has been demonstrated, the lowest concentration (15.5 ng/ml) was shown in the group exposed to the sun the least likely.

During the analysis of polymorphisms of *VDR* gene, there was no statistically significant difference in the incidence of individual genotypes between the groups (IBD, K) and subgroups (CD, UC, K) of patients in all studied polymorphisms (Cdx2, FokI, BsmI, ApaI, TaqI), however, it was demonstrated a statistically significant increase in the chance of developing IBD with GA genotype for the polymorphism Cdx2 (2.3x fold) and with the genotype GA of BsmI polymorphism (2,07x times).

In the present study the relationship between the degree of disease activity in patients with UC and presence of polymorphisms FokI ($p = 0.027$) was demonstrated; there was no relationship between the degree of disease activity and other *VDR* gene

polymorphisms. Also the relationship between the location of the disease in Paris endoscopic classification of patients with UC and the presence of Cdx2 gene polymorphism of the vitamin D receptor ($p = 0.046$) was indicated; there was no relationship between the location of the disease and other *VDR* gene polymorphisms. Analyzing the relationship between the polymorphisms of *VDR* gene and selected laboratory findings in patients with IBD, statistically significant correlation for higher vitamin D concentrations in patients with IBD and CD with the homozygous recessive trait (TT genotype) of TaqI polymorphism and with homozygous recessive one (GG genotype) of BsmI polymorphism was found compared to homozygous dominant.

Conclusions:

1. Both in children with inflammatory bowel disease as well as in the control group vitamin D deficiency was observed, it concerned more children from the comparison group. This suggests the need for vitamin D supplementation in a group of children with inflammatory bowel disease and in their healthy peers, especially in teenagers.
2. It has been shown that daily exposure to sunlight has a beneficial effect on the concentration of vitamin D in the blood of the children. Therefore, it is desirable to promote spending time outdoors.
3. It seems that the nutritional status, type of lifestyle (diet, physical activity) does not modify the level of vitamin D in the blood. The observations above, however, require verification in larger groups of patients.
4. Patients with CD, despite having extensive lesions in the endoscopic examination of the gastrointestinal tract, showed higher levels of vitamin D in the blood as compared to the group of patients with lesions confined to the colon. It can be concluded that disturbances of absorption in the course of the disease are less severe than previously thought.
5. In view of the fact that there was no difference in the incidence of polymorphisms of *VDR* gene between the studied and comparative groups, it appears that the analysis of the frequency of occurrence does not allow to estimate the morbidity of the inflammatory bowel disease.
6. Due to the fact that the presence of heterozygous genotype for Cdx2 and BsmI of *VDR* gene polymorphism increases the risk of inflammatory bowel disease, one

should consider searching for the polymorphisms mentioned above in the case of difficulty in the diagnosis of patients with symptoms suggestive of IBD.

7. Recognized association between homozygous recessive trait for TaqI and BsmI polymorphisms of vitamin D receptor gene and higher levels of vitamin D in patients with IBD may explain different levels of this vitamin in the studied group of children. These observations do not allow to withdraw unequivocal conclusions and require further research in larger groups of patients.
8. For the population of children with UC it has been demonstrated the relationship between the location of the disease and the occurrence of Cdx2 polymorphism of *VDR* gene and the degree of disease activity and the presence of FokI polymorphism, but these observations require extensive research in order to unambiguously confirm the effect of their presence on the course of inflammatory bowel disease.
9. It seems that at this stage of the analysis of genetic variants of the vitamin D receptor it is hard to make firm conclusions about the impact of their presence on the results of laboratory parameters .

Keywords: children, inflammatory bowel disease, vitamin D, the vitamin D receptor gene polymorphisms

