

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 616.391:577.161.2-053.1/.2

VOLOC ALEXANDRU

**MODIFICĂRILE CLINICO – BIOLOGICE ȘI GENETICE ÎN
STATUTUL VITAMINEI D ÎN PERIOADELE PRE – ȘI
POSTNATALĂ A COPILULUI**

**322.01– PEDIATRIE ȘI NEONATOLOGIE
Teza de doctor habilitat în științe medicale**

Consultanți științifici:

ȚUREA Valentin
doctor habilitat în științe medicale,
profesor universitar

GARABÉDIAN Michèle,
doctor în științe medicale și biologice,
doctor de stat, director de cercetări de I clasă,
profesor

Autorul:

VOLOC Alexandru,
doctor în științe medicale,
conferențiar universitar

CHIȘINĂU, 2016

© VOLOC ALEXANDRU, 2016

CUPRINS

ADNOTARE (ÎN ROMÂNĂ, RUSĂ, ENGLEZĂ)	5
LISTA ABREVIERILOR.....	8
INTRODUCERE	10
1. VIZIUNI CLINICO-BIOLOGICE ȘI GENETICE ÎN PATOGENIA CARENȚEI VITAMINEI D ÎN PERIOADA PRE- ȘI POSTNATALĂ DE DEZVOLTARE A COPILULUI	21
1.1. Aspecte generale: definiție, tendințe epidemiologice, statutul optim și aportul zilnic al vitaminei D	21
1.2. Impactul vitaminei D asupra dezvoltării intrauterine a fătului (talia, greutatea corporală). Interacțiunea între mediul intern matern, statutul calcic și al vitaminei D și consecințele greutății mici la naștere.....	31
1.3. Rahitismul carențial la copiii de vârstă fragedă și adolescenții în creștere	37
1.4. Vitamina D, cu rol protector în infecțiile respiratorii acute, tuberculozei și altor granulomatoase.....	43
1.5. Carența vitaminei D, diabetul zaharat de tipul I, eclampsia și scleroza multiplă. Rolul determinismului genetic în fiziopatologia osteoporozei	47
1.6. Deficitul lactazei și intoleranța/malabsorbția lactazei definite în baza criteriilor genetice (variantele genei mcm6 care precedă gena lactazei).....	51
1.7. Concluzii la capitolul 1.....	53
2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE	57
2.1. Caracteristica generală a cercetării	57
2.2. Metodologia de cercetare	66
2.3. Metodele de analiză a rezultatelor obținute.....	72
2.4. Concluzii la capitolul 2.....	74
3. STATUTUL VITAMINEI D LA DIFERITE CATEGORII POPULAȚIONALE: FEMEI GRAVIDE, NOU-NĂSCUȚI, SUGARI, COPII DE DIFERITE VÂRSTE ȘI ADOLESCENȚI ÎN CORELAȚIE CU FACTORII ALIMENTARI, GENETICI ȘI AI MEDIULUI ÎNCONJURATOR.....	75
3.1. Statutul vitaminei D și impactul său asupra nou-născuților și sugarilor din Republica Moldova.....	75
3.2. Suplimentarea maternă cu vitamină D, calcemia și creșterea pre- și postnatală. Studiu multicentric internațional.	81

3.3. Statutul vitaminei D, consecințele clinice și biologice la copiii și adolescenții din Republica Moldova	88
3.4. Exteriorizarea genelor Klotho, VDR și LCT (lactază), în dependență de nivelul calciului alimentar, statutul vitaminei D și haplotipurile de la nivelul promotorul genei VDR	103
3.5. Concluzii la capitolul 3.....	106
4. CORELĂRILE STATUTULUI VITAMINEI D, APORTULUI DE CALCIU, GENOTIPULUI VDR ȘI KLOTHO LA COPIII ȘI ADOLESCENȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA ȘI FRANȚA.	108
4.1. Statutul vitaminei D, aportul de calciu și impactul genotipului VDR.....	108
4.2. Studiul polimorfizmului genei Klotho și corelarea statutului vitaminei D, mineralizarea osoasă, dezvoltarea fizică și pubertară la copii și adolescenți de rasă caucaziană.....	118
4.3. Concluzii la capitolul 4.....	128
5. ROLUL POLIMORFIZMULUI GENETIC AL LACTAZEI ÎN DEZVOLTAREA INTOLERANȚEI COPIILOR LA LACTOZĂ	131
<i>Tabelul 5.4. Calcemia corectată (nmol/L) în raport cu polimorfismele -13910 LCT, cloto și VDRp precum și a nivelului seric al 25(OH)D(ng/mL).....</i>	<i>141</i>
5.3. Concluzii la capitolul 5.....	148
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	173
BIBLIOGRAFIE	178
ANEXE	199
Anexa 1. Prevenirea rahitismului carențial în Republica Moldova 1998 – 1999.....	199
Anexa 2. Observații asupra copilului de la a 7-a zi de viață până la vârsta de 12 luni	200
Anexa 3. Prezentarea schematică a derulării primei etape a studiului	202
Anexa 4. Studiu asupra stărilor de carență a vitaminei D la copii și adolescenți.....	203
Anexa 5. Studiu clinic asupra depistării intoleranței la lactoză la copii și adolescenți.....	205
Anexa 6. Algoritmul de diagnostic al hipocalcemiei	206
Anexa 7. Acte de implementare	207
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	213
CV AL AUTORULUI	214

ADNOTARE

Voloc Alexandru

„Modificările clinico – biologice și genetice în statutul vitaminei D în perioadele pre – și postnatală a copilului”

Teză de doctor habilitat în științe medicale. Chișinău, 2016

Structura tezei: introducere, 5 capitole, sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale, recomandări practice, bibliografia include 434 de surse, 177 pagini text de bază, 21 figuri, 47 tabele, 4 formule, design-ul studiului, 1 algoritm, 7 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 36 lucrări științifice.

Cuvinte – cheie: Profilaxia prenatală și postnatală a carenței vitaminei D, statutul vitaminei D, gena Klotho, VDR, haplotipul, gena lactazică LCT.

Domeniul de studiu: pediatrie.

Scopul. Evaluarea impactului carenței/ insuficienței vitaminei D asupra metabolismului fosfo-calcic și sănătății osoase în corelație cu factorii genetici la copii și adolescenți, căile de corecție.

Obiective de investigare. Evaluarea impactului carenței/insuficienței vitaminei D asupra statutului clinico-fiziologic și genetic la copii și adolescenți. Studiarea manifestărilor deficitului vitaminei D în dependență de perioada ontogenetică de dezvoltare a copilului (intrauterină, postnatală precoce și tardivă), de anotimp și zonele climato-geografice (Moldova, Franța, Algeria, Martinica, Ingușetia). Analiza comparativă a deformărilor membrelor inferioare și a parametrilor biochimici în asociere cu valorile vitaminei D la copii și adolescenți din Moldova și Franța. Depistarea impactului factorilor genetici asupra metabolismului calciului, sănătății osoase, dezvoltării fizice, prin prisma polimorfismului a 3 gene: VDR, Klotho și LCT, în asociere cu valorile vitaminei D serice la copii de diferite vârste și adolescenți. Elaborarea algoritmului de diagnostic al hipocalcemiilor, pentru optimizarea diagnosticului timpuriu. Emiterea managementului de conduită al carenței vitaminei D în scopul eficientizării tratamentului și profilaxiei specifice.

Metodologia: două tipuri de studiu: studiul clinic controlat cu selectarea randomizată a femeilor gravide și nou-născuților și studiul de cohortă.

Noutatea și originalitatea științifică. Primar în RM, prin studiu multicentric internațional a fost cercetată pluridimensional dilema carenței vitaminei D, aplicând o strategie de profilaxie specifică și analizând polimorfismul genetic al diferitor gene cu impact asupra masei și densității osoase, totodată fiind elucidat impactul asupra sănătății osoase a aportului de calciu/produse lactate, prin investigații asupra polimorfismului genetic al genei lactazice LCT.

Problema științifică soluționată în cercetare rezidă în estimarea patternului clinico-fiziologic și genetic al carenței vitaminei D în perioadele pre- și postnatale de dezvoltare a copilului prin prisma determinării corelației statutului vitaminei D, aportului de calciu cu genotipul VDR și polimorfismul genei Klotho la copii și adolescenți în scopul obiectivizării diagnosticului și eficientizării tratamentului stărilor de hipocalcemie.

Importanța teoretică a lucrării: Evidențierea verigilor patogenetice antrenate în crearea tabloului clinico-paraclinic al demineralizării țesutului osos, constituie un reper esențial în extinderea și aprofundarea cunoștințelor existente privind deformările osoase.

Valoarea aplicativă a lucrării: A fost elaborat un nou concept de profilaxie specifică ante- și postnatală al hipocalcemiilor neonatale și al rahitismului carențial, optimizând managementul de conduită al acestora, astfel ameliorând calitatea vieții copiilor și adulților în timp.

Implementarea rezultatelor științifice multicentrice internaționale: Rezultatele studiului au fost implementate în activitatea Departamentului Pediatrie al USMF „N. Testemițanu”; Centrului Spitalicesc Regional din Franceville și Centrele universitare din Angondge, Koula-Moutou, Owendo și Libreville (Africa Ecuatorială).

РЕЗЮМЕ

Волок Александр

« Клинико-биологические и генетические изменения статуса витамина Д в пре- и постнатальном периодах развития ребёнка »

Диссертация доктора хабилитат медицинских наук, г. Кишинэу, 2016.

Структура диссертации: введение, 5 глав, синтез полученных результатов, общие выводы и практические рекомендации, список литературы, включающий 434 источника, 177 основных страниц текста, 21 рисунок, 47 таблиц, 4 формулы, дизайн исследования, 1 алгоритм, 7 приложений. Результаты исследования опубликованы в 36 научных работах.

Ключевые слова: Пренатальная и постнатальная профилактика дефицита витамина Д, статус витамина Д, ген Клото, рецептор VDR, гаплотип, ген лактазы LCT.

Область исследования: педиатрия.

Цель: Оценка воздействия дефицита/недостаточности витамина Д на фосфо-кальцевый метаболизм и костное здоровье в корреляции с генетическими факторами у детей и подростков, способы коррекции.

Задачи исследования: Оценка воздействия дефицита/недостаточности вит. Д на клинико-физиологический и генетический статус у детей и подростков. Исследование проявления дефицита витамина Д в зависимости от разных периодов онтогенетического развития ребенка (внутриутробный, ранний и поздний постнатальный), сезона и климатической зоны (Молдова, Франция, Алжир, Мартиника, Ингушетия). Сравнительный анализ деформаций нижних конечностей и биохимических показателей, в сочетании с уровнем вит. Д у детей Молдовы и Франции. Определение влияния генетических факторов на метаболизм кальция, костное здоровье, физическое развитие через призму полиморфизма 3 генов: VDR, Клото и LCT, в сочетании с уровнем сывороточного вит. Д у детей разного возраста и подростков. Разработка диагностического алгоритма гипокальциемии для оптимизации ранней диагностики. Разработка схемы ведения дефицита вит. Д, с целью улучшения специфического лечения и профилактики.

Методология: Два типа исследований: контролируемое клиническое исследование с рандомизированным выбором беременных женщин и новорожденных и в когорте.

Новизна и научная оригинальность: Впервые в Молдове проведено разностороннее международное исследование недостаточности витамина Д с применением стратегии специфической профилактики и анализом генетического полиморфизма разных генов, воздействующих на костную массу и плотность, одновременно раскрыв проблему воздействия потребления кальция/молочных продуктов на состояние здоровья костного аппарата путем исследования генетического полиморфизма гена лактазы LCT.

Решенная в исследовании научная проблема заключается в прогнозировании клинико-физиологической и генетической картины дефицита витамина Д в пре- и постнатальном периодах развития ребенка через определение корреляции статуса витамина Д, потребления кальция, генотипом VDR и полиморфизмом гена Клото у детей и подростков, с целью объективной диагностики и эффективного лечения гипокальциемий.

Теоретическое значение работы: Определение патогенетических звеньев, вовлеченных в клинико-параклиническую картину деминерализации костной ткани, является важной основой для расширения имеющихся знаний о деформации скелета.

Практическая значимость работы: Разработана новая концепция пре- и постнатальной специфической профилактики неонатальной гипокальциемии и витамин-Д-дефицитного рахита, путем оптимизации схем ведения данных состояний, таким образом улучшая качество жизни детей и взрослых в долгосрочной перспективе.

Внедрение результатов международного многоцентрового исследования: Результаты исследования были внедрены в работе Департамента Педиатрии ГУМФ «Н. Тестемицану», региональный госпитальный центр г. Франсвиль, университетские центры Ангондж, Кула-Муту, Овендо и Либревиль (Экваториальная Африка).

SUMMARY

Alexandru Voloc

" Clinical-biological and genetic changes in vitamin D status in pre- and postnatal periods of child's development "

Thesis of Doctor of Science in Medicine. Chisinau, 2016

Structure of thesis: introduction, 5 chapters, synthesis of obtained results, general conclusions, practical recommendations, bibliography of 434 titles, 177 pages basic text, 21 images, 47 tables, 4 formulas, one study design, one algorithm, 7 annexes. The results of this study were published in 36 scientific papers.

Keywords: prenatal and postnatal prevention of vitamin D deficiency, vitamin D status, Klotho gene, VDR, haplotype, lactase gene LCT.

The field of study: pediatrics.

Goal: Evaluation of the impact of vitamin D deficiency on phospho-calcic metabolism and bone health in correlation with genetic factors in children and adolescents, ways of correction.

The study objectives: Evaluation of the impact of vitamin D deficiency on the clinical-physiological and genetic status in children and adolescents. Study of manifestations of vitamin D deficiency depending on the ontogenetic period of child development (in utero, early and late postnatal), season and climatic and geographic area (Moldova, France, Algeria, Martinique, Ingushetia). Comparative analysis of inferior limbs deformities and biochemical parameters in association with vitamin D values in children and adolescents from Moldova and France.

Detecting the impact of genetic factors on calcium metabolism, bone health, physical development, through the prism of 3 gene polymorphism: VDR, Klotho and LCT in association with serum level of vitamin D in children and adolescents of different ages. Development of diagnostic algorithm of hypocalcaemia to optimize early diagnosis. Elaboration of therapeutic management of vitamin D deficiency aiming to improve specific treatment and prophylaxis.

Methodology: two types of study: clinical controlled study with randomized selection of pregnant women and newborns, and a cohort study.

Scientific novelty and originality: For the first time in the Republic of Moldova we have conducted a multicentric international study to assess multiple aspects of vitamin D deficiency, applying a specific vitamin D deficiency prevention strategy, in-depth study of genetic polymorphism of different genes with an impact on bone mass and density. We have studied the influence of calcium/dairy products intake on bone health by testing the LCT lactase gene polymorphism.

Scientific problem solved through this research lies in estimating the clinical-physiological and genetic pattern of vitamin D deficiency in pre- and postnatal child development through the prism of determining the correlation between vitamin D status, calcium intake with VDR genotype and Klotho gene polymorphism in children and adolescents for an abjective diagnosis and efficient treatment of hypocalcaemia conditions.

Theoretical value: Highlighting pathogenetic links leading to clinical and laboratory picture of bone demineralization is an essential baseline in broadening the existing knowledge in bone deformities.

Practical value of the research: A new concept of pre- and postnatal specific prevention of neonatal hypocalcaemia and vitamin D deficiency rickets was developed by optimizing the therapeutic management, thus improving the quality of life in children and adults in the long term.

Implementation of international multicentric scientific results: The result of the study were implemented in Department of Pediatrics of the SMPU "N. Testemitanu", Regional Hospital Centre of Franceville, University Centers in Angondge, Koula-Moutou, Owendo and Libreville (Equatorial Africa).

LISTA ABREVIERILOR

ADHR	Rahitism hipofosfatemie autosom dominant
BET	Bromura de etidium
BHE	Bariera hematoencefalică
BMC	Conținutul mineral al osului
BMP	Proteina morfogenetică a osului
BRU	Unitate osoasă de remodelare
CaBP	Proteina de legare a calciului
Calbindin-D9K	Proteina transportatoare de calciu
CaR	Receptor sensibil la calciu
CASR	Receptor cu rol „sensor” pentru nivelul calciului
CAT1	Canal de calciu epitelial
Cbfa	Reglator esențial al dezvoltării osoase, numit și Runx2, PEB2A, Osf2
Cdx2	Factor al diferențierii intestinale
CGP	Peptidă generată de calcitonină
CICN5	Gena codantă pentru canalele clor
CMO	Conținut mineral osos
Col2a1	Colagen de tipul II
CPM	Celule progenitoare mezenchimale
CREB	Proteina de legare a elementului de răspuns dependent de AMPc
CSF	Factor de stimulare a coloniei
CSF-M	Factor de stimulare a coloniei de monocite
CUD	Coeficient de utilizare digestivă
CYP24	Hidroxilaza mitocondrială
DBP	Proteina purtătoare de vitamina D
DEXA	Absorbtiometrie duală cu raze X
DRIP	Proteina de interacțiune cu receptorul vitaminei D
DSPP	Sialo-fosfoproteina dentiției
EAE	Encefalita autoimună experimentală
ECCE	Enzima de conversie a endoteliului
EFMPZD	Enzimele familiei de metaloproteaze zinc - dependente
EGF	Factorul de creștere epidermală
FCS-GM	Factorul cloniostimulator granulocitar - macrofagal

FGFR	Receptorul factorului de creștere a fibroblaștilor
GnRH	Hormonul eliberator al gonadotropinei
HACCP	Analiza Factorilor de Risc și Punctele Critice de Control
Hap1, Hap2, Hap3	Haplotipul 1, haplotipul 2, haplotipul 3
HPLs	Leziuni periosteocitice hipomineralizate
HRE	Element reactiv la acțiunea hormonului
IGF-1	Factorul de creștere – 1 de tipul insulinei
LCT	Gena codantă a lactazei
LeyCell	Celulele Leydig din testicule, epididim, ovare, uter, glande mamare, placentă
LHP	Lactaz-florizin hidrolaza
RM	Republica Moldova

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate. *Organizația Mondială a Sănătății, 2004* stipulează că osteoporoza/osteomalacia constituie a treia problemă de sănătate publică după afecțiunile cardiovasculare și cancer [1], iar *National Osteoporosis Foundation, 2014* o abordează ca o „epidemie tăcută” a secolului XXI, fiind caracterizată prin rezistență osoasă scăzută, indusă de scăderea masei osoase și de compromiterea calității osului, condiționând riscul de fractură. Astfel, deficitul de vitamină D poate constitui cauza esențială a dezvoltării atât a rahitismului/osteomalaciei la copii și adolescenți în perioada de creștere, a hipocalcemiei în perioada neonatală, cât și a osteoporozei/osteomalaciei la persoanele în vârstă. Aceste lacune impun desfășurarea unor cercetări complexe, pentru determinarea statutului vitaminei D la populația generală și evaluarea riscului de dezvoltare a semnelor clinice ale deficienței acesteia.

De la 50 până la 80% a masei minerale osoase este determinată de factori genetici, fapt confirmat prin depistarea mutațiilor genetice la pacienții cu masă osoasă patologică (rahitism, osteoporoză, densitate osoasă înaltă autosom dominantă) și prin asocierea masei osoase cu diferite variante genetice la persoanele sănătoase și la cele cu osteoporoză [2]. Studii genetice estimative menționează impactul genei care controlează receptorul pentru vitamina D (VDR), genei de collagen Ia1, receptorul pentru estrogeni și gena TGFβ [3-5]. În prezent există dovezi substanțiale, că variațiile acestor gene, implicate în metabolismul calcic și osos, ar putea descifra de ce mineralizarea osoasă la diferiți indivizi reacționează în mod diferit la factori identici ai mediului înconjurător (efortul fizic, aportul de calciu). Postulatele acestor studii, ne-au determinat să evaluăm distribuția genotipurilor asociate cu răspunsul la acțiunea vitaminei D, absorbția intestinală a calciului și/sau acumularea masei osoase în limitele unei populații anumite.

Descoperirea receptorilor specifici pentru vitamina D (1,25-dihidroxitaminală D) în 1994 (vitamine D receptors – VDR) a lărgit aria interpretativă a deficitului de vitamină D. S-a demonstrat existența interacțiunii între genotipul receptorilor pentru vitamina D, absorbția de calciu și nivelul de calciu din dietă [6]. Astfel, forma activă a vitaminei D (calcitriol) își exercită efectele biologice prin legarea de receptori specifici localizați în nucleii celulelor țintă [7, 8]. Activarea receptorilor VDR din intestine, oase, rinichi și paratiroide, cu ajutorul hormonului paratiroidian și al calcitoninei, contribuie la menținerea echilibrului fosfocalcic din organism și la asigurarea unei rezistențe osoase echilibrate. Dar VDR sunt implicați și în proliferarea și

diferențierea celulară, fiind prezenți în diferite serii leucocitare, inclusiv în monocite și în limfocitele T și B.

Atât factorii genetici, cât și factorii de mediu, influențează indisolubil dezvoltarea oaselor și mineralizarea pe tot parcursul vieții, dar influența lor poate fi evidențiată începând din perioada fetală precocă, susținând astfel următoarea declarație: „osteoporoza senilă este o boală pediatrică, deoarece diferențele privind masa osoasă, diagnosticate în copilărie constituie un element de predilecție pentru osteoporoza tardivă” [9]. Prin urmare, pentru a emite o viziune integrativă a probabilității riscului de dezvoltare a osteoporezei/osteomalaciei este esențial de-a analiza influența acestor factori asupra metabolismului calcic și osos în timpul creșterii prenatale și postnatale.

Descrierea situației în domeniul de investigare și identificarea problemelor de cercetare. În studiile consacrate factorilor cauzali ai hipocalcemiei neonatale, s-a relatat rolul stării de sănătate a mamei: perioada de gestație, prezența disgravidiei, particularitățile travaliului și nașterii, diabetul matern, hiperparatiroidismul matern și nivelul socio-economic [10-12]. În pofida acestor constatări, cercetătorii afirmă că deficitul de vitamină D este factorul primordial, în special în trimestru III de sarcină, odată cu transportul transplacentar masiv de calciu [13, 14]. În caz contrar, nou-născuții ale căror mame suferă de hipocalcemie, dezvoltă hiperparatiroidism tranzitor imediat postnatal (congenital) [15].

Numeroase cercetări au semnalat incidența crescută a rahitismului la sugari și copii mici, înainte de implementarea profilaxiei generalizate în multe țări temperate, remarcând cert rolul vitaminei D pentru creșterea, mineralizarea oaselor și plăcii de cartilaj de creștere în această perioadă [16]. Deși, rahitismul la copiii mari și adolescenți este cazuistic, necesarul vitaminei D, este indiscutabil asigurând o mineralizare optimă a osului la acest grup de copii [17, 18].

Ipotezele studiilor epidemiologice sugerează rolul vitaminei D asupra mecanismelor de protecție împotriva proceselor autoimune și a cancerului, astfel fiind suplimentat rolul clasic al acesteia de control al absorbției calciului și al statutului osos [19-22]. Efectul anticanceros, confirmat de numeroase referințe [23] este justificat de adeziunea intercelulară și a apoptozei, prin inhibarea angiogenezei în jurul tumorilor și a metastazelor [24].

Nivelul seric diminuat al vitaminei D (25(OH)D) are un fundal *sezonier* – iarna, *geografic* - latitudini înalte (> 40° N sau S) și alimentar - suplimentare deficientă a produselor lactate cu vitamină D [28]. Astfel, în aceste regiuni este asigurat un program național de profilaxie specifică maternă și infantilă a carenței vitaminei D. strategii, cum ar fi aportul continuu al vitaminei D la femeile gravide, nou-născuți și sugari, aportul oral discontinuu al unor doze mai

mari de vitamină D, ca de exemplu administrarea trimestrială a 2-2,5 mg de vitamină D3 în timpul sarcinii [29-32]. Prin consens, strategia dată a fost recomandată pentru implementare în practică și inclusă în Programul Național de Nutriție – Sănătate (PNNS) al Franței, începând cu anul 2001 [33]. Dat fiind faptul, că radiația solară asigură sinteza cutanată a unei cantități suficiente de vitamină D doar în lunile de vară-toamnă, sau mai exact din aprilie-mai și până în octombrie-noiembrie, în țările localizate la o latitudine mai mare de 30-40° Nord sau Sud, această profilaxie poate fi limitată doar la perioada sarcinii la femeile ce locuiesc la această latitudine și care vor naște în perioada de iarnă-primăvară [28]. Însă această profilaxie trebuie realizată pe parcursul întregului an la nou-născuții și sugarii ce locuiesc la nivelul latitudinilor mai mari de 30-40°, precum și la nou-născuții, sugarii și femeile gravide care nu sunt expuși radiației solare [30].

Multiple studii longitudinale și studii retrospective în cohortă confirmă faptul, că deficitul de vitamină D este un fenomen răspândit chiar și la femeile gravide sănătoase [34]. Această deficiență de vitamină D creează la nou-născut în perioada imediat după naștere un risc crescut de dezvoltare a stărilor patologice legate de hipocalcemie și/sau defecte de mineralizare osoasă, de asemenea, poate avea și repercusiuni de lungă durată, deoarece tot mai multe dovezi certifică, că riscul fracturilor osteoporotice la o vârstă adultă târzie este amplificat de acțiunea factorilor adversi ai mediului ambiant în perioadele precoce de dezvoltare, inclusiv în perioada intrauterină [34, 35].

Prin urmare, în afară de acțiunea clasică a vitaminei D, după cum am menționat mai sus, este tot mai mult vizat rolul vitaminei ca imunomodulator și ca factor ce influențează diferențierea celulară, astfel având un rol protectiv împotriva bolilor autoimune, cu predilecție a diabetului zaharat tip I [36-38] și a unor tipuri de cancer, în special de sân și de colon [39-43]. În plus, un șir de autori au studiat impactul carenței vitaminei D [44] și consecințele administrării vitaminei D [45, 46] asupra unui organism cu infestație parazitară intestinală. Astfel, un studiu [47] a demonstrat că invalidizarea transgenică a receptorilor vitaminei D, care face ca șobolanii să fie rezistenți la acțiunea vitaminei D, sporește riscul de dezvoltare a reacției inflamatorii în caz de infestație parazitară.

Rezultatele studiului nostru ne-au permis să apreciem în complex statutul vitaminei D la femeia gravidă, nou-născut, sugar, copilul în vârstă de un an și până la adolescență, cu evaluarea consecutivă a impactului clinico-biologic al unei eventuale carențe a vitaminei D în timpul tuturor acestor perioade de viață. Profilaxia antenatală corect efectuată la femeia gravidă, bazată pe administrarea discontinuă a calciului și vitaminei D, combinată cu expunerea rațională la

soare, echilibrată cu surse naturale, în special în ultimele luni de sarcină, precum și cu profilaxia nașterilor premature, vor scăde incidența osteopeniei la copiii prematuri, incidența hipocalcemiei neonatale și a retardului în creșterea intrauterină.

Deficitul matern de vitamină D poate fi observat independent de condițiile geografice și climaterice (lipsa expunerii la soare, multiparitatea, etc.). El sporește riscul hipocalcemiei neonatale și hiperparatiroidismului secundar la gravide și crește riscul greutății mici la naștere. Aportul oral de 2,5 mg vitamină D3 (la a 6 lună de sarcină) normalizează rezervele vitaminei D la mamă și făt, diminuează riscul hipocalcemiei, promovează creșterea fetală și favorizează osificarea matricei scheletare. Deși nu există dovezi științifice, totuși există ipoteza că suplimentarea cu vitamina D ar putea crește riscul hipercalcemiei la mame și copiii lor. Din acest motiv, profilaxia cu vitamină D trebuie limitată doar pentru mamele care nasc între lunile decembrie și iunie, precum și indiferent de sezon pentru alte femei cu risc înalt de dezvoltare a carenței vitaminei D în urma expunerii lor insuficiente la soare și aportului scăzut de vitamină D din alimente.

Polimorfismul genetic, care stă la baza intoleranței la lactoză a copiilor și adolescenților din Republica Moldova, este sau nu similar cu cel din Franța. Interrelația dintre fenotip, aportul de calciu și nivelul de vitamina D, sunt determinanții de bază ai simptomatologiei intoleranței la lactoză.

Luând în considerație cele sus-expuse și tendințele științifice moderne, în procesul realizării studiului dat, noi am evaluat nu numai statutul vitaminei D la femeile gravide, sugari și copii din Republica Moldova cu analiza posibilelor asociații cu homeostaza calcică, mineralizarea și creșterea osoasă în această cohortă, dar am testat și ipoteza că deficitul vitaminei D ar putea crea premise pentru o infestație mai ușoară a organismului cu helminți intestinali.

Scopul studiului

Evaluarea modificărilor statutului clinico-fiziologic și genetic al carenței vitaminei D în perioadele pre- și postnatale a copilului și căilor de corecție.

Obiectivele studiului

1. Evaluarea impactului carenței/insuficienței vitaminei D asupra statutului clinico-fiziologic și genetic la copii și adolescenți.
2. Studiarea manifestărilor deficitului vitaminei D în dependență de perioada ontogenetică de dezvoltare a copilului (intrauterină, postnatală precoce și tardivă), de anotimp și zonele climato-geografice (Moldova, Franța, Algeria, Martinica, Ingușetia).

3. Analiza comparativă a deformărilor membrelor inferioare și a parametrilor biochimici în asociere cu valorile vitaminei D la copii și adolescenți din Moldova și Franța.
4. Depistarea impactului factorilor genetici asupra metabolismului calciului, sănătății osoase, dezvoltării fizice, prin prisma polimorfismului a 3 gene: VDR, Klotho și LCT, în asociere cu valorile vitaminei D serice la copii de diferite vârste și adolescenți.
5. Elaborarea algoritmului de diagnostic al hipocalcemiilor, pentru optimizarea diagnosticului timpuriu.
6. Emiterea managementului de conduită al carenței vitaminei D în scopul eficientizării tratamentului și profilaxiei specifice.

Metodologia cercetării științifice

Pentru realizarea scopului și obiectivelor cercetării au fost proiectate: studiu de cohortă și studiu clinic caz-control cu selectarea randomizată a femeilor gravide și nou-născuților. Particularitățile metabolismului vitaminei D, sub aspect plurifactorial – genetic, alimentar și a factorilor mediului ambiant au fost cercetate conform studiului de cohortă internațional multicentric (Moldova, Franța, Algeria, Martinica, Ingușetia). Studiul clinic caz-control cu selectarea randomizată a femeilor gravide și nou-născuților a fost realizat în baza unui chestionar special structurat, în care au fost înregistrate rezultatele examenelor clinice, paraclinice și rezultatele examinărilor speciale.

Analiza datelor a fost realizată utilizând programele Statistica 6.0 (Statsoft Inc), EXCEL și SPSS 16.0 (SPSS Inc). Prelucrarea statistică ne-a permis calcularea ratelor, valorilor medii, indicatorilor de proporție.

Noutatea și originalitatea științifică

Pentru prima dată, problema carenței vitaminei D a fost cercetată complex: ante- și postnatal, prin analiza aprofundată a polimorfismului genetic al diferitor gene cu impact asupra masei și densității osoase, concomitent, testându-se ipoteza unei posibile invalidizări transgenice a receptorului pentru vitamina D în caz de infestare cu helminți. Autentic constituie și studiul impactului asupra sănătății osoase a aportului de calciu/produse lactate, prin prisma rolului polimorfismului genetic al genei lactazice LCT.

În premieră prin multiple investigații de o mare valoare interpretativă cum ar fi determinarea statutului vitaminei D (25(OH)D, osteocalcinei, indicelui Ca/creatinină în urină, factorului de creștere IGF-1, polimorfismului VDR, contribuției genei Klotho în dezvoltarea

pubertară a fetelor din Franța și Republica Moldova, corelației statutului vitaminei D, aportului de calciu și genotipului VDR atât la copiii din țara noastră, cât și la cei din Franța, aportului alimentar al calciului/produselor lactate și sănătății osoase a copiilor supuși studiului în cauză a fost determinat impactul administrării vitaminei D în perioadele pre- și postnatale de dezvoltare a copilului și carenței de calciu/produse lactate la diferite vârste asupra statutului clinico-fiziologic, metabolismul fosfo-calcic și sănătății osoase.

Înedit sunt datele referitor la prevalența înaltă a modificărilor specifice rahitismale (genu varum/valgum) la copiii și adolescenții cu praguri joase ale 25(OH)D, asociate cu o alimentație precară, insuficientă în calciu, magneziu și alte micro- și macroelemente, corelând cu activitatea înaltă a fosfatazei alcaline în perioadele prepubertare și pubertare la copiii din Gimnaziul Internat din orașul Orhei. Ca markeri ai sănătății osoase au fost apreciați calciul și fosforul seric, raportul calciu/creatinin din urină, concentrația serică a fosfatazei alcaline, IGF-1, PTH și osteocalcina. Studiarea polimorfismului genetic a permis eficientizarea algoritmului de diagnostic și managementul terapeutic al stărilor de hipocalcemie, pentru minimalizarea complicațiilor și ameliorarea prognosticului.

Problema științifică soluționată în cercetare rezidă în estimarea patternului genetic și clinico-fiziologic al carenței vitaminei D în perioadele pre- și postnatale de dezvoltare a copilului prin prisma determinării corelației statutului vitaminei D, aportului de calciu cu genotipul VDR și polimorfismul genei Klotho la copii și adolescenți în scopul optimizării diagnosticului și eficientizării managementului terapeutic al stărilor de hipocalcemie. Rezultatele studiului au oferit perceperea complexă a verigilor patogenetice ale hipocalcemiei și rolul unor gene cu impact asupra masei și densității osoase în dezvoltarea acestei nozologii, precum și datele, ce țin de optimizarea strategiilor cost-efective de profilaxie specifică ante- și postnatală a carenței de vitamina D în baza evaluării complexe a factorilor genetici, socio-demografici, nutriționali, mediului ambiant și factorilor endogeni.

Importanța teoretică a lucrării

Rezultatele studiului aprofundează și fundamentează referințele existente privind legitățile modificărilor fiziologice și metabolice, în raport cu metabolismul fosfo-calcic și sănătatea osoasă la nou-născuți, copiii de diferite vârste și adolescenți în perioada de creștere.

Cercetările complexe fiziologice, metabolice și clinice ce s-au soldat cu date originale despre specificul manifestării modificării stării fiziologice a țesutului osos, statusului morfo-

funcțional paralel cu modificările diverselor reacții metabolice ce sunt în raport cu activitatea osoasă în caz de statut precar al vitaminei D și insuficienței parțiale de microelemente, în special de calciu, au permis de a identifica noi factori patogenetici, ce determină tabloul clinico-paraclinic al disfuncțiilor mineralizării matricei osoase la copii și adolescenți și care necesită, în scopul eficientizării diagnosticului nozologiilor studiate, de a fi incluși în sistemele de teste de diagnosticare a disfuncțiilor cronice ale metabolismului fosfocalcic la copii și adolescenți.

Studiul a adus cunoștințe suplimentare privind particularitățile patogenetice, ce sunt antrenate în crearea tabloului clinico-paraclinic al demineralizării țesutului osos, analizând mecanismele deformărilor osoase, tetaniile rahitogene, precum și dereglările de statură și de ținută la copii și adolescenți. La conturarea conceptului etioatogenetic, cauzat de carența/insuficiența vitaminei D contribuie și polimorfismul genetic cu impact asupra masei și densității osoase.

Valoarea aplicativă a lucrării

Cercetarea a adus un aport primordial în elaborarea un nou concept de profilaxie specifică ante- și postnatală a hipocalcemiilor neonatale și a rahitismului carențial prin administrarea unor doze discontinue de 2,5 mg de vitamina D la femeia gravidă de la termenul de gestație de 6 luni și trimestrial la copiii primului an de viață. A fost propus managementul terapeutic al carenței vitaminei D, în dependență de valorile pragurilor serice ale 25(OH)D, în asocieră cu hipofosfatemie, hipocalcemie, carența fierului/folaților și de semne radiologice reprezentative rahitismului carențial. Elaborarea noilor strategii profilactice și terapeutice au impus o metamorfoză a conceptului de la profilaxia secundară la cea primară, ameliorând esențial calitatea vieții copiilor și adulților pe termen îndelungat. Rezultatele studiului genetic au permis completarea datelor privind identificarea factorilor genetici predispozanți și necesitatea examinării pacienților cu diferite dereglări ale metabolismului calcic și osos, pentru diagnostic timpuriu, management terapeutic rațional și monitoring evolutiv.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere

1. Patternul clinic și paraclinic al rahitismului/osteomalaciei, al hipocalcemiei și osteoporozei/osteomalaciei corelează cu statutul vitaminei D.
2. Manifestările carenței vitaminei D depinde de perioada ontogenetică de dezvoltare a copilului (intrauterină, postnatală precoce și tardivă), de anotimp și zonele climato-geografice.

3. Deformațiile membrelor inferioare și a unor parametri biochimici sunt în asociere cu valorile pragurilor vitaminei D atât la copiii și adolescenții din Moldova, cât și la cei din Franța.
4. Dozele vitaminei 25(OH)D pentru normalizarea calcemiei sunt în funcție de haplotipurile genei VDR.

Implementarea rezultatelor științifice, în activitatea curativă a specialiștilor de la Departamentul de pediatrie al USMF „N. Testemițanu”, Centrul Spitalicesc Regional din Franceville, Centrele universitare Angondge, Koula-Moutou, Owendo și Libreville din Africa Ecuatorială constituie un argument forte de-a aproba rezultatele obținute și au contribuit la diagnosticul timpuriu a carenței/insuficienței vitaminei D, precum și la optimizarea managementului terapeutic.

Aprobarea rezultatelor științifice. Concepțiile de bază ale tezei și rezultatele obținute au fost raportate la foruri științifice naționale și internaționale, conferințe științifico-practice.

• *Conferințe și simpozioane internaționale:*

- Atelier scientifique de travail. Institute national de la santé et de la recherche médicale Unit 561 et du Centre de Référence des Maladies du Calcium et du Phosphore de l’Enfant, Paris, Franța, 2007;
- Congresul Național al Societății Franceze de Pediatrie, Angers, Franța, 2007;
- 14th Vitamin D Workshop held, Brugge, Belgia, 2009;
- Ier Journée de l’Institut Claude Bernard, Paris, Franța, 2009;
- Ziua principală de ortopedie și traumatologie, Havana, Cuba, 2010;
- Congresul al 15 Internațional și al 14 European de endocrinologie, Florența, Italia, 2012.

• *Conferințe și simpozioane naționale:*

- Congresul al III-lea al obstetricienilor – ginecologi și pediatriilor din Republica Moldova, Chișinău, Moldova, 1999;
- Congresul V al igieniștilor, epidemiologilor și microbiologilor din Republica Moldova, Chișinău, Moldova, 2003;
- Zilele Universității consacrate jubileului 60 de ani ai învățământului medical superior din Republica Moldova, Chișinău, Moldova, 2005;
- Conferința națională cu participare internațională cu tematica Astmul bronșic la copil, Chișinău, Moldova, 2006;

- Zilele francofoniei din incinta Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” care s-a desfășurat sub lozinca “Etre pédiatre – un don particulier ou un souci supplémentaire”. Chișinău, Moldova, 2007 (*Raport în plenară cu decernarea diplomei de gradul II*);
- Conferința Națională (cu prezență internațională). Studiu asupra nutriției mamei și copilului în Republica Moldova, Chișinău, Moldova, 2009.

Tema tezei a fost discutată și aprobată la ședința catedrei de pediatrie nr.2 (proces verbal nr.2 din 15 noiembrie 2006); La ședința Comisiei Republicane Științifico-Metodice pe problemele pediatriei a MS al RM din 6 decembrie, 2006 (procesul verbal nr.4) și cea din 2 mai, 2007 (procesul verbal nr.1); La ședința Senatului USMF „Nicolae Testemițanu” din 10 mai 2007, și prezentată colaboratorilor Institutului Național de Sănătate și Cercetări Medicale UNITATEA 561 și a „Centrului de referință a maladiilor de calciu și fosfor la copil” din Paris pe data de 13 iunie 2007; la Seminarul științific de profil Pediatrie și Neonatologie din 14 decembrie 2015, proces verbal nr. 5, La Seminarul științific de profil extern de pe lângă Institutul de fiziologie și sanocreatologie al AȘM din 16 iunie 2016, proces verbal nr.1; la Seminarul științific de profil pediatrie din 28 iunie 2016, proces verbal nr.23.

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetării au fost relevate în 36 lucrări științifice naționale și internaționale, inclusiv: 3 monografii, 10 articole în reviste științifice internaționale, 7 articole științifice din Registrul Național (2 cu categoria B și 5 cu categoria C), materiale la forurile științifice internaționale și naționale, ghiduri practice, 1 recomandare metodică, 2 dicționare farmaco-terapeutice, 4 rapoarte de studiu la UNICEF: 1. Raport „Despre situația epidemiologică a rahismului carențial în Republica Moldova”; 2. Ancheta „Familiei”; 3. Raport „Evaluarea situației alimentare a femeilor și copiilor din Republica Moldova”; 4. Ancheta „Alimentația copiilor mai mici de 5 ani în Republica Moldova”.

SUMARUL COMPARTIMENTELOR TEZEI

Teza este expusă pe 177 pagini de text electronic și include: introducere, 5 capitole, concluzii generale și recomandări, indicele bibliografic cu 434 de surse citate și **6 anexe**. Materialul iconografic conține 21 figuri, 43 tabele, 4 formule, 1 design, 1 algoritm.

Cuvinte cheie: statutul vitaminei D, carența vitaminei D, profilaxia prenatală și postnatală, gena Klotho, VDR, gena lactazică LCT.

În *Introducere* este reflectată actualitatea problemei abordate, reperele conceptuale prin redarea scopului și obiectivelor lucrării, metodologia cercetării științifice, noutatea științifică a rezultatelor obținute, semnificația teoretică și valoarea aplicativă, principiile de bază înaintate spre susținere, aprobarea rezultatelor științifice.

În **Capitolul 1 (Revista literaturii)** este reflectată analiza referințelor de specialitate, consacrate studiului, sunt conturate particularitățile carenței vitaminei D la diferite vârste, rolul factorilor genetici și epigenetici în perioada pre-și postnatală de dezvoltare a copiilor. S-a apreciat situația globală a carenței vitaminei D, actual nefiind unificat un consens sau ghid la nivel internațional.

În **Capitolul II (Materialul și metodele de cercetare)** este vizat design-ul studiului materialul și metodele de investigație, sunt descrise etapele de cercetare, formarea loturilor de studiu. Minuțios, sunt descrise metodele clinice și paraclinice de acumulare a datelor primare, în special, metodele genetice de investigație și metoda de determinare a statutului vitaminei D (25(OH)D), ilustrată prin algoritm investigațional.

În **Capitolul III** este expus studiul profilaxiei hipovitaminozei D la gestante și sugarii din Republica Moldova, prin analiza comparativă a celor două strategii profilactice, cea *timpurie*, inițiată în perioada de gestație (al II-lea trimestru), prin administrarea trimestrială de 2,5 mg (100.000 UI) și, ulterior, pe parcursul primului an de viață și profilaxia *tardivă*, prin doze standarde, inițiată la nou-născutul de 14 zile, ulterior efectuându-se follow-up-ul clinic și paraclinic. A fost descris studiul multicentric internațional pe grupuri populaționale mamă-copil în care se compară suplimentarea maternă cu vitamina D, se studiază statutul matern și fetal al vitaminei D și impactul său asupra fătului în ansamblu. Au fost redate investigațiile genetice privitoare la frecvența insuficienței lactazice.

În **Capitolul IV** este reprodus studiul transversal, comparativ al corelației statutului vitaminei D, aportului de calciu și al genotipului VDR la subiecții din Moldova și cei din cohortele din Franța. S-au efectuat studii de asociere între 25(OH)D și markerii metabolismului calcic și osos, deformările membrelor inferioare și mineralizarea vertebrelor folosind trei valori de prag (30, 50, 70 nmol/l) și s-a determinat nivelul 25(OH)D, folosind Schema Internațională de Evaluare Externă a Calității pentru metabolitul vitaminei D (DEQAS) și, ulterior, prevalența insuficienței de vitamină D pentru fiecare nivel de prag. A fost apreciat polimorfismul genetic la nou-născuții, copii și adolescenții de rasă caucaziană (din Moldova și Franța) și contribuția genei Klotho în dezvoltarea pubertară a adolescentelor.

Capitolul V descrie studiul genetic asupra intoleranței la lactoză la copii și adolescenți din Republica Moldova. Se descriu variațiile genetice asociate cu hipolactazie (-13910 pb a genei Lactazice – LCT) care ar putea influența consumul de lapte și mineralizarea osoasă.

Sinteza rezultatelor obținute este un capitol de analiză și deliberări argumentate asupra rezultatelor obținute vizavi de opiniile expuse în literatura de specialitate cu referire la domeniul abordat.

1. VIZIUNI CLINICO-BIOLOGICE ȘI GENETICE ÎN PATOGENIA CARENȚEI VITAMINEI D ÎN PERIOADA PRE- ȘI POSTNATALĂ DE DEZVOLTARE A COPILULUI

1.1. Aspecte generale: definiție, tendințe epidemiologice, statutul optim și aportul zilnic al vitaminei D

În pofida numeroaselor cercetări, o noțiune unanim emisă a hipovitaminozei D nu există [31, 61, 71-78], conceptual, însă studiile recente o definesc ca un nivel seric diminuat al 25(OH)D asociat cu diverse consecințe maladive. Divergențele conceptuale sunt fundamentate pe metoda de apreciere a statutului vitaminic. Una din acestea constă în completarea unor chestionare despre conținutul vitaminei D în produsele alimentare consumate, fără a ține cont de sinteza endogenă a vitaminei D, care constituie 2/3 din rezervele totale ale colecalciferolului din organism. Astfel, atribuind această metodă femeilor gravide din Republica Moldova, derivă că toți nou-născuții ar avea un statut carențial al vitaminei D [30, 79].

Vitamina D, descoperită de secole continuă a fi intens studiată, grație importanței și impactului ei atât asupra dezvoltării organismului, cât și în prevenirea morbidității pe scară largă [48, 49]. Astfel, *Departamentul de nutriție pentru sănătate și dezvoltare al OMS, în colaborare cu Comitetul Executiv*, în aprilie 2015 au condus a 18-a sesiune practică, având drept obiectiv primordial - identificarea priorităților de cercetare a vitaminei D, susținerea și promovarea politicilor globale referitor la prevenirea rahitismului la sugari și copii, deficitul vitaminei D la femeile gravide și identificarea markerilor investigaționali ai hipovitaminozei D.

Palacios C. et al. (2013) și-au propus o revizuire a publicațiilor, PubMed/Medline, pe parcursul ultimilor 10 ani, analizând prevalența la indivizii aparent sănătoși (Figurile 1.1-1.6).

Recapitulând referințele analizate, precum și alte surse [51-56], putem reitera că prevalența hipovitaminozei D variază, atât printre populația adultă, cât și cea pediatrică, indiferent de localizarea geografică, gradul de insolare sau starea socio-economică. Potrivit cercetătorilor, în Italia, au fost semnalate diferențe semnificative între nivelul de vitamină D și perioada sezonieră a nașterii. Astfel, că la persoanele născute iarna crește probabilitatea de dezvoltare a hipovitaminozei (RA 11%), în comparație cu cei născuți primăvara sau vara [57, 58].

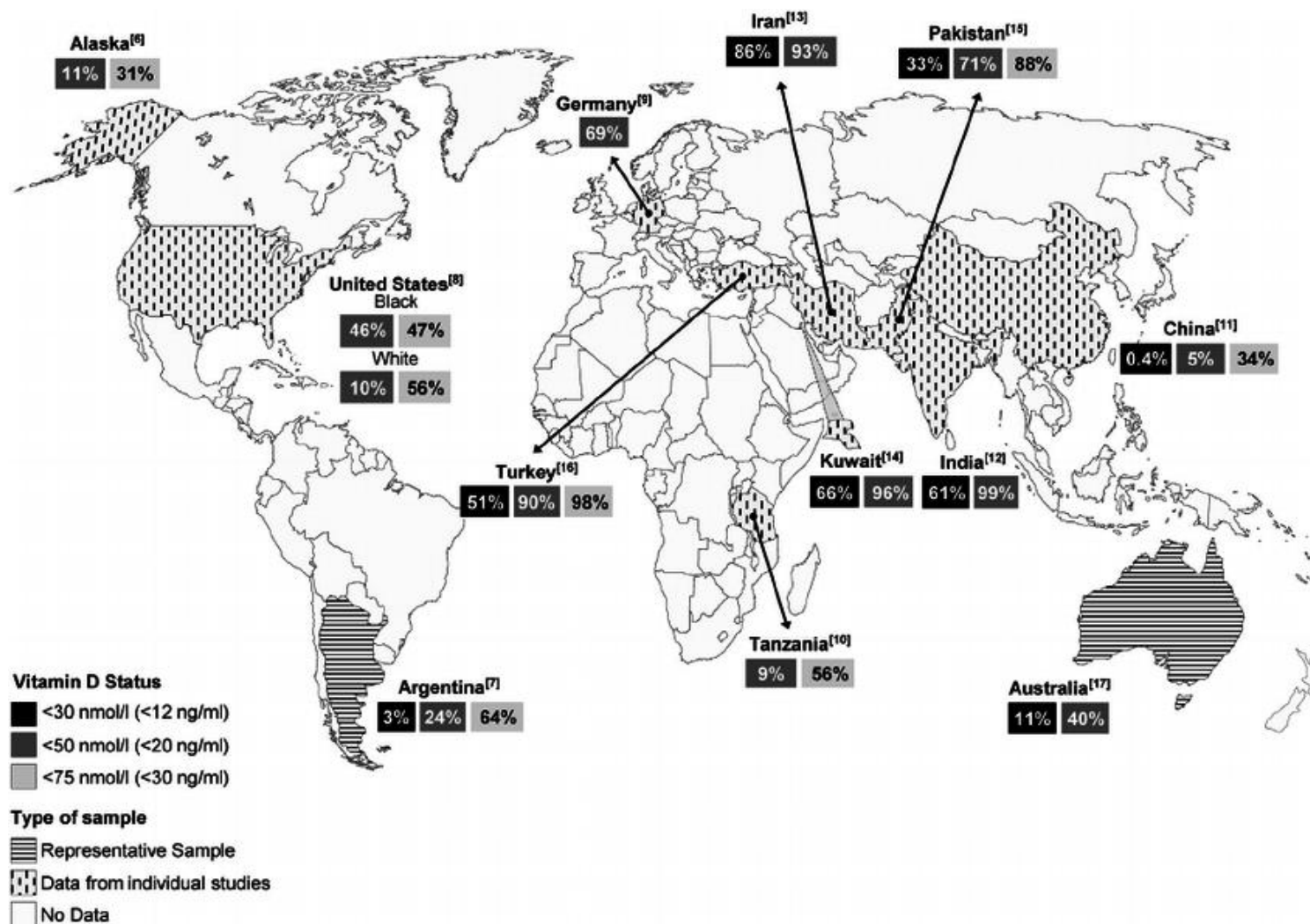


Fig. 1.1. Prevalența hipovitaminozei D la sugari, la nivel mondial.

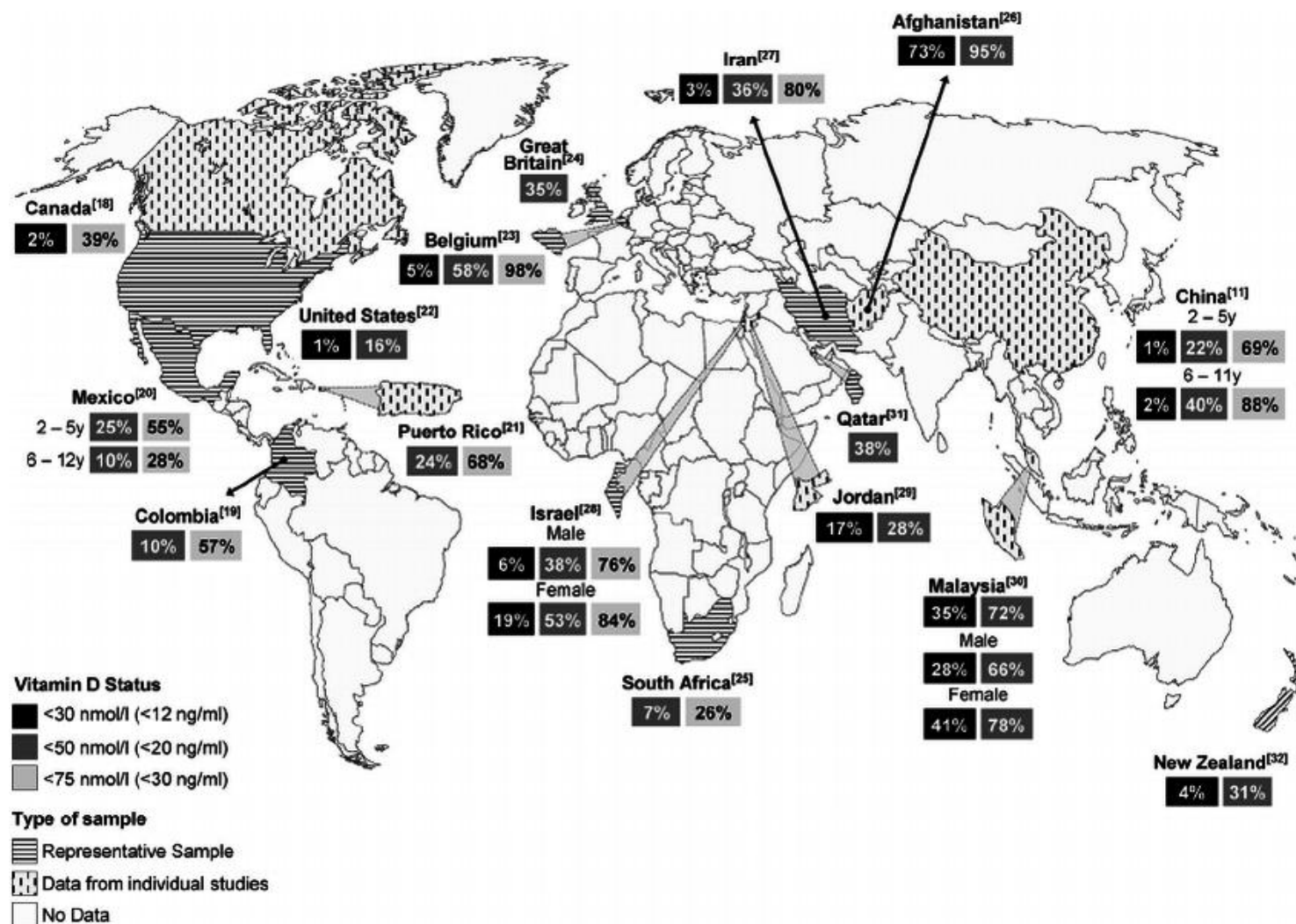


Fig. 1.2. Prevalența hipovitaminozei D la copii, la nivel mondial.

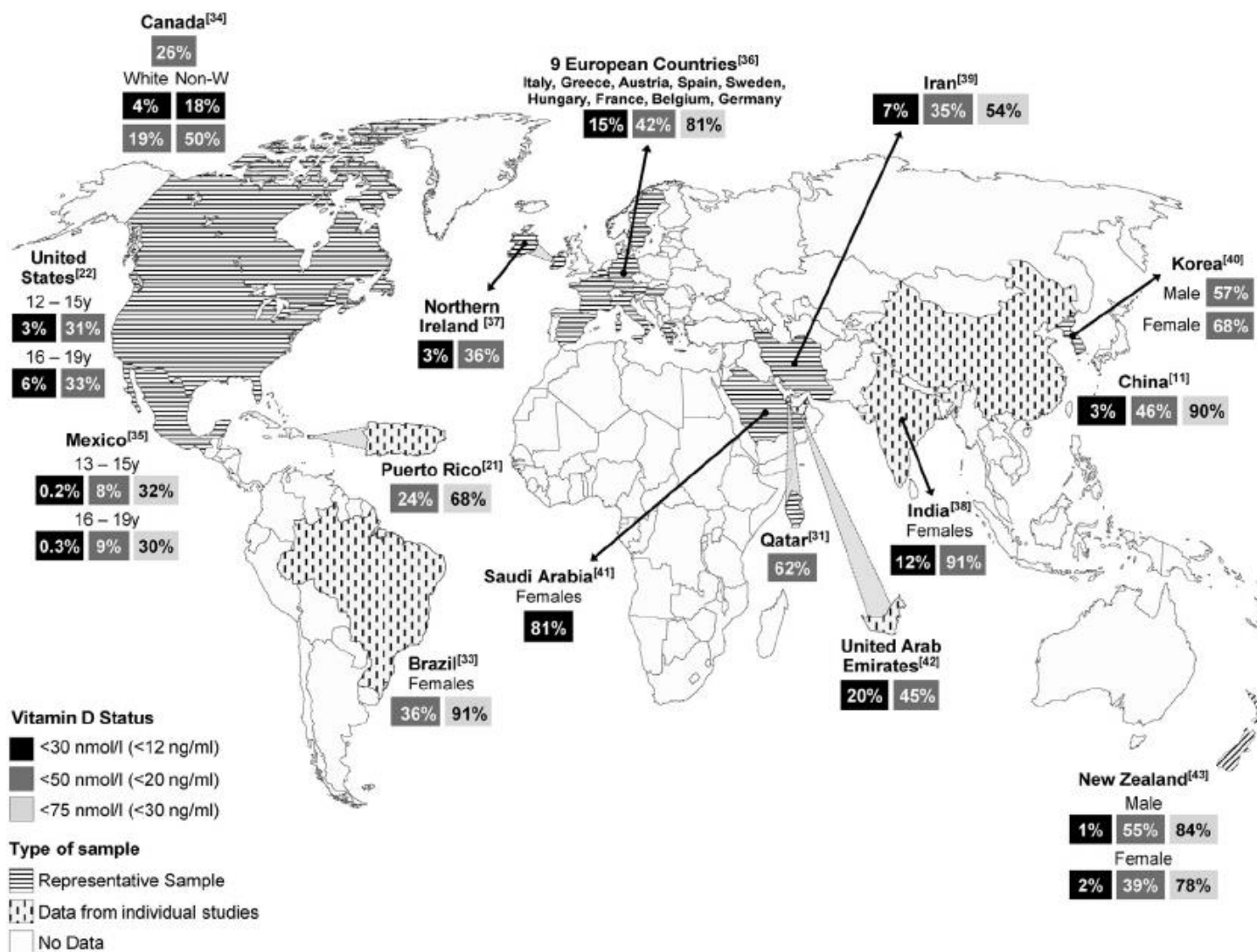


Fig. 1.3. Prevalența hipovitaminozei D la adolescenți, la nivel mondial.

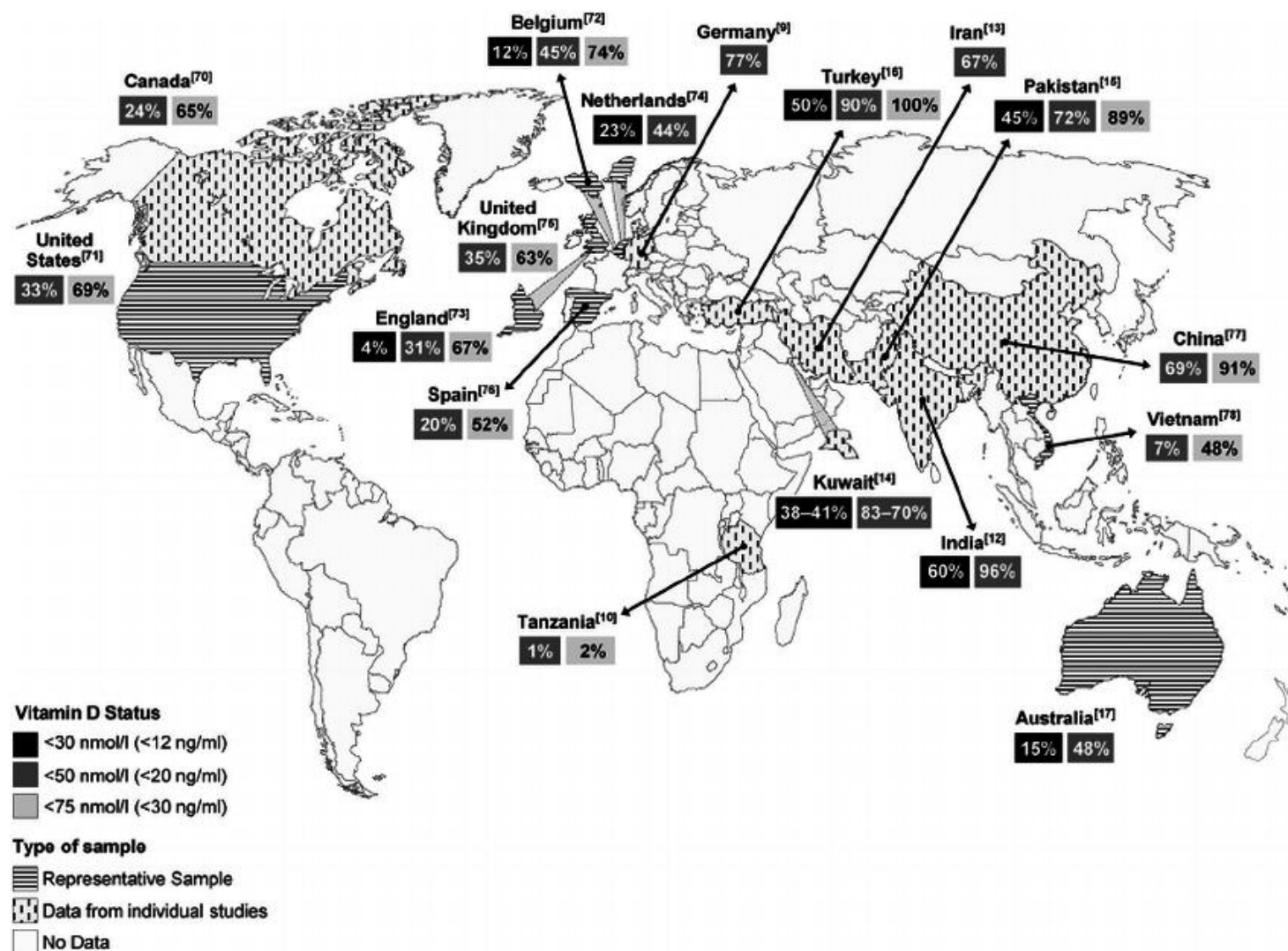


Fig. 1.5. Prevalența hipovitaminozei D la gravide și femeile ce alăptează, la nivel mondial.

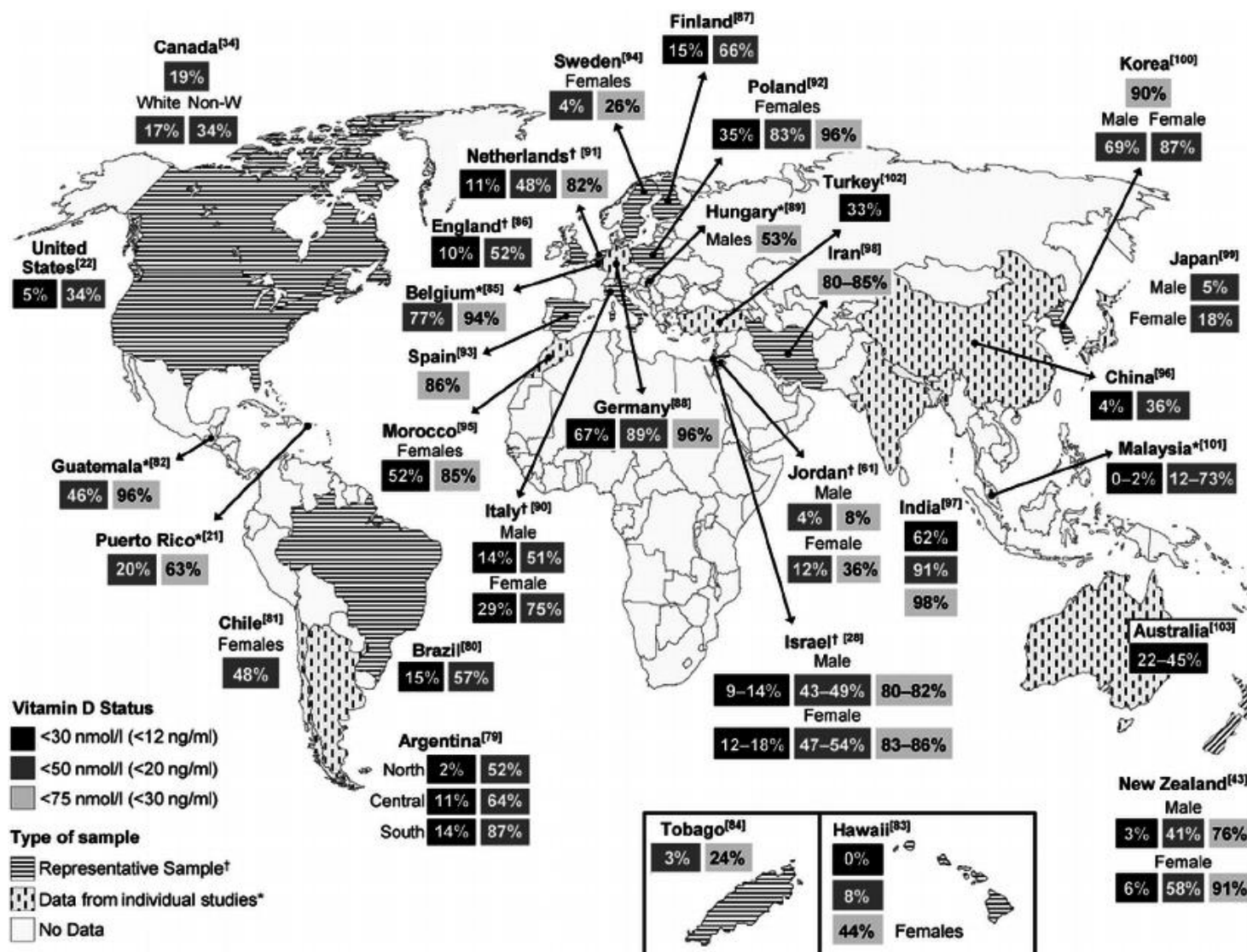


Fig. 1.6. Prevalența hipovitaminozei D la persoanele în vârstă, la nivel mondial.

Un alt grup de autori, opiniază că ponderea în creștere poate fi explicată și de geneza multifactorială, reflectată ca o interacțiune a factorului genetic și factorilor de mediu: geografici (latitudine, gradul de poluare a mediului ambiant, etc.), particularitățile alimentare, factorul socio-economic. Deficitul de vitamină D, exprimat biologic sau clinic, preponderent este evidențiat la persoanele în etate și la gestante, în trimestru al III-lea de sarcină, chiar și în țările înalt industrializate (SUA, Canada, țările Uniunii Europene, etc.) [59]. M.H. Gannagé-Yared et al. (2001) susțin că deficitul de vitamina D este o problemă majoră de sănătate publică în multe țări ale lumii [60-62], însă în Africa de Nord, China și țările Orientului Mijlociu, deficitul de vitamina D este o problemă mai stringentă, plasându-se pe locul 5 în clasamentul celor mai frecvente patologii [63].

În Europa, deficitul de vitamina D cu consecințe patologice severe (osteoporoză, fracturi) este predominant apreciat la persoanele în vârstă, dominant instituționalizate [64, 65], iar la persoanele tinere, practic sănătoase, ocazional este depistat un nivel seric diminuat de 25(OH)D, estimându-se la circa 40% din populația tânără europeană [66].

Ponderea dezvoltantă este înregistrată în țările din bazinul Mării Mediterane (Algeria, Tunis, Maroc, Egipt, Turcia,) având ca determinante factorul socio-cultural (inclusiv stilul vestimentar) și uneori religios. În mod contrar, populația țărilor de nord (Norvegia), în pofida energiei joase a radiației solare ultraviolete, suplimentează alimentația cu uleiul de pește și pește gras de mare sau ocean (sardină, somon, hering, etc.), fapt ce reduce deficitul de vitamină D la copii și adolescenți. Deși mai mulți autori consideră că în SUA incidența hipovitaminozei D este joasă datorită fortificării produselor alimentare cu vitamina D, administrării unor suplimente vitaminice, McCullough M. et al. (2007) susțin, prin prisma dovezilor statistice, că deficitul de vitamină D, nu evită persoanele americane [63, 67]. Beuzit C. et al. (2010) într-un studiu, realizat în regiunea Bretagne, Franța pe un eșantion de 352 copii, au consemnat o prevalență de 75% a hipovitaminozei D la copiii de vârstă 5-10 ani în absența suplimentări cu vitamină D [68].

În prezent, o modalitate globalizată de apreciere a statutului vitaminei D constă în determinarea nivelului seric al formei de rezervă a vitaminei D (25(OH)D) în organism, ce include atât aportul alimentar, cât și sinteza endogenă a vitaminei D. Însă, valoarea minimă a acestui nivel, pentru a defini hipovitaminoza D este contraversată. Majoritatea savanților consideră că valorile mai mici de 10-12 ng/ml (25-30 nmol/l) la gravide și nou-născuții lor [31, 32], la copii [80, 81], adulți și persoanele în vârstă [28, 64, 82, 83] reprezintă un deficit veridic de vitamină D, deoarece sub acest nivel există un risc crescut de modificări biologice (cum ar fi hiperparatiroidismul secundar, hipocalcemia, valori crescute ale markerilor resorbției osoase) și a

manifestărilor clinice (de exemplu retard în dezvoltarea fătului, convulsii hipocalcemice, rahitism la copii și osteoporoză la bătrâni - frecvent soldată cu fracturi).

Nivelul optim al vitaminei D, rămâne a fi un alt subiect contraversat în literatura de specialitate. Cercetătorii susțin că nivelul mai mare de 20 ng/ml (50 nmol/l) constituie aportul optim. Nivelul seric al 25(OH)D de 12 - 20 ng/ml, la persoanele în vârstă, este insuficient, deoarece valorile sub 20 ng/ml și chiar sub 32 ng/ml (50-80 nmol/l) sunt asociate cu un risc crescut de dezvoltare a hiperparatiroidismului secundar, accentuarea pierderilor masei osoase după menopauză la femei și după 65 ani la bărbați, precum și cu apariția fracturilor de col femural [66, 82-84]. Totodată, nivelul optim al vitaminei D la copii și adulți tineri nu este atât de evident determinat, iar valorile 25(OH)D între 12 și 20 ng/ml (30-50 nmol/l) nu sunt clar asociate cu semne clinice de hipovitaminoză D, cum ar fi hiperparatiroidismul secundar. Însă, rezultatele studiilor epidemiologice le-au afirmat ca valori serice insuficiente, argumentând existența unui risc crescut de dezvoltare a cancerului de sân și de colon [39, 43, 75, 85] asociat acestor valori, deși o astfel de corelație nu a fost confirmată de alți cercetători [86]. Astfel, aceste ipoteze continuă să fie un subiect al dezbaterilor științifice [41]. Au fost descrise asocieri similare între nivelul scăzut de 25(OH)D și riscul de dezvoltare a bolilor autoimune, cum ar fi diabetul zaharat tip I, scleroza multiplă și artrita reumatismală [28, 38]. Însă, cele mai convingătoare dovezi existente la momentul actual constau în posibilitatea creșterii riscului de dezvoltare a diabetului zaharat juvenil tip I, în caz de nivel insuficient al vitaminei D [37, 87, 88]. În pofida abordării critice a gradului de demonstrare a asocierii dintre nivelele atât deficiente cât și normale de vitamină D și riscurile de dezvoltare a diverselor maladii autoimune și oncologice, există actualmente tot mai multe rezultate științifice publicate, care tot mai mult confirmă cel puțin reducerea riscurilor sus-numite în caz de normalizare a nivelului 25(OH)D. Unii savanți americani [75] încă în 2006 afirmau că, nivelul seric al 25(OH)D₃ peste 20ng/ml reduce riscul cancerului de sân și de colon, actual, acest postulat este confirmat la nivel mondial [20, 21, 40, 42, 89, 90].

Nivelul seric al 25(OH)D este considerat a fi cel mai bun marker al statutului vitaminei D și este în permanență utilizat pentru determinarea prevalenței deficitului/insuficienței vitaminei D la copiii și adolescenții sănătoși. Cu toate acestea, rămâne neprecizată semnificația biologică a anumitor concentrații de 25(OH)D circulantă, iar valorile de referință sunt permanent revăzute în ceea ce privește valorile normale, comparate cu nivelurile optime.

Majoritatea clinicienilor sunt de acord cu faptul că valorile serice ale 25(OH)D sub 25-30 nmol/l (10-12 ng/ml) pot cauza rahitism nutrițional, convulsii hipocalcemice, probleme dentare

și creștere dereglată la copii și adolescenți. Însă, nivelul de prag al insuficienței vitaminei D la copiii și adolescenții sănătoși continuă a fi discutat, fiind propuse valori de prag pentru 25(OH)D circulant, de la 25-30 nmol/l până la 70-90 nmol/l la copii și la adulți.

Diferențele în metodele de determinare a 25(OH)D ar putea explica anumite divergențe, în special luând în considerare faptul că nu au fost efectuate controale sistematice externe pentru testarea validității ce ar permite compararea rezultatelor obținute în laboratoare diferite [277]. De asemenea, pragurile de 25(OH)D propuse pentru statutul adecvat și insuficient al vitaminei D în perioada de creștere nu au luat în considerație posibilele interrelații cu aportul de calciu, care este crucial pentru acumularea masei osoase, și, doar puține studii transversale, au examinat posibilele riscuri ale statutului crescut al vitaminei D.

Impactul vitaminei D asupra stării de sănătate este confirmat de secole. Sniadecki, 1822 a remarcat pentru prima dată interrelația dintre iluminarea solară insuficientă și prezența rahitismului la copii. Cercetările au continuat aproape un veac, astfel că, în Statele Unite și Europa, în 1930 produsele lactate au fost suplimentate cu 100UI de vitamina D. Comitetul medicilor obstetricieni din SUA, 2011 a emis opinia sa oficială, care a fost reafirmată în 2015, referitor la faptul că nivelul 25(OH)D la femeile gravide trebuie să fie determinat în mod individual, iar suplimentarea cu vitamină D trebuie să fie în limitele de 1000-2000 UI/zi fără careva pericol pentru mamă și copil. Dozele mai mari necesită confirmare prin studii randomizate de viitor [91].

National Institutes of Health, 2016 „Aportul zilnic de referință” – normative stabilite de Institutul de Medicină din SUA în 1997 [69], dau doza zilnică de 200 UI/zi, însă, chiar și în caz de administrare a 400 UI/zi la gravide și în perioada de lactație, nivelul seric de 25(OH) al vitaminei D s-a dovedit a fi mai jos de nivelul optim [70]. În 2011, același Institut de Medicină, susținut de Academia Americană de Dermatologie indică dozele zilnice recomandate de vitamină D la sugari – de la 400 până la 1500 UI/zi, iar ulterior la copiii mai mari – doze de la 600 UI/zi [71]. Un studiu efectuat în SUA la nivel național (NHANES) în 1988-1994 a demonstrat că, la administrarea dozelor „adecvate” de vitamină D (200 UI/zi), femeilor afro-americane de vârstă reproductivă, a persistat o prevalență înaltă a insuficienței de vitamină D [72]. Același studiu arată că doar jumătate din fetele adolescente consumă zilnic câte 200 UI de vitamină D3. Bazându-se pe aceste date, McCullough ridică întrebarea logică de adaptare a normativelor de aport zilnic de referință, în special pentru vitamina D, dozele putând fi în jur de 1000 UI/zi [63].

1.2. Impactul vitaminei D asupra dezvoltării intrauterine a fătului (talia, greutatea corporală). Interacțiunea între mediul intern matern, statutul calcic și al vitaminei D și consecințele greutății mici la naștere

Impactul vitaminei D asupra dezvoltării intrauterine a fătului este indiscutabil, fiind abordat de numeroase cercetări [31, 34, 35, 92-96], ce argumentează interrelația dintre statutul matern al vitaminei D și metabolismul calcic al nou-născutului, riscul înalt de dezvoltare al hipocalcemiei [97-102]. Absorbția intestinală crescută a calciului este principalul mecanism de acoperire a necesităților crescute în calciu în timpul gravidității [105], crescând până la circa 60% în trimestrul trei al gravidității [106, 107]. Concentrația serică a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ crește cu 50-100% în timpul trimestrului doi și cu 100% în trimestrul trei comparativ cu concentrația serică la femeia negravidă [13, 14, 106, 107]. Deși nivelul seric al proteinei fixatoare de vitamină D (vitamin D-binding protein) crește și el în timpul sarcinii, concentrația $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ continuă să crească în ultimul trimestru, pe când concentrația proteinei fixatoare rămâne stabilă. Astfel, se creează un nivel crescut de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ liberă [108, 109]. Amstutz și coautorii și Zhu și coautorii în studiile lor citate mai sus [106, 107], menționează existența unei asocieri pozitive între concentrațiile serice ale $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ și absorbția calciului la nivel de rinichi în termenii avansați de gestație, deși mecanismul de conservare al calciului la nivel renal nu se activează în timpul gravidității. Conform opiniei lui Specker [103], mecanismul ce stă la baza creșterii nivelului de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ în timpul sarcinii nu este complet elucidat. PTH deseori este considerat drept stimul al hidroxilării renale crescute a $25(\text{OH})\text{D}$ cu formarea $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ nu s-a dovedit a fi elevat la gravide [106, 107, 110], dar paralelismul observat între IGF-1 și nivelul de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ în caz de sarcină normală și patologică [111], precum și demonstrarea faptului că IGF-1 stimulează producția renală de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [113] sugerează implicarea posibilă a acestui factor de creștere în proces.

La începutul anilor 70, Purvis și coautorii [114] au raportat existența unei asocieri între survenirea tetaniei la nou-născuți și durata expunerii la soare a mamelor în ultimul trimestru de sarcină. Acești autori, precum și Okonofua și coautorii în 1986 [115], Daaboul și coautorii în 1997 [116] au arătat că deficitul de vitamină D3 la femeile gravide duce la dezvoltarea hiperparatiroidismului secundar, care rezultă în hipoparatiroidism tranzitoriu și hipocalcemie la nou-născut. Unii savanți au stabilit că nivelul seric al PTH este invers proporțional cu nivelul seric al $25(\text{OH})\text{D}$, iar femeile asiatice asupra cărora s-au reflectat cercetările aveau un nivel mai scăzut de $25(\text{OH})\text{D}$ și mai înalt de PTH în comparație cu mamele de rasă caucazoidă [117].

În 1980, Cockburn și coautorii [99] au raportat rezultatele unui studiu cvazirandomizat a 1139 femei scoțiene, care au născut în 2 secții de obstetrică diferite. Un grup de 506 femei a primit 400UI/zi de vitamină D de la termenul de 12 săptămâni de gestație, iar 633 femei din al doilea grup au primit placebo ce nu conținea vitamină D. Calciul, 25(OH)D și fosforul au fost determinate inițial din sângele matern la 24 și 34 săptămâni de gestație din cordonul ombilical, apoi la vârsta de 6 zile la copil. Ca rezultat, nivelul de 25(OH)D era mai mare la femeile care au primit profilactic vitamină D și, respectiv la nou-născuții lor, de asemenea calciul seric avea valori mai mari în comparație cu cei din grupul de control. Incidența hipocalcemiei neonatale s-a dovedit a fi mai înaltă la nou-născuții ce erau alimentați cu formule alimentare artificiale cu un conținut înalt de fosfor în comparație cu cei alăptați la sân. Brooke și coautorii [101] au stabilit că fontanela anterioară era mai mare la nou-născuții ale căror mame n-au fost suplimentate în ultimul trimestru al sarcinii cu vitamină D a câte 1000 UI/zi. Deși nu au existat diferențe în greutate la naștere la cele 2 grupuri de control și de intervenție, s-a depistat un procent mai mare de nou-născuți cu o „greutate mai mică în raport cu vârsta gestațională” din grupul tratat placebo (28,6%), în comparație cu 15,3% în grupul suplimentat cu vitamina D.

Într-o revistă a literaturii (76 studii publicate în Medline) realizată de Schroth et al. au remarcat că în 35 dintre acestea a fost raportat deficit de vitamină D la gravide. Menționăm, că cercetările au cuprins diferite grupuri etnice și regiuni geografice, inclusiv din America de Nord, Europa, Marea Britanie, Africa, Orientul Mijlociu și Asia, iar drept deficit s-a considerat nivelul seric de $25(\text{OH})\text{D} \leq 35\text{nmol/l}$.

De-Regil et al. (2012) au analizat Registrul studiilor Cochrane asupra gravidității și nașterilor (2011), Registrul de platformă al studiilor clinice internaționale (ICTRP, 2011) și biblioteca electronică a tezelor și disertațiilor (2011), precum și au contactat direct organizațiile relevante. Au fost analizate studiile randomizate și cvazi-randomizate, evaluând efectele suplimentării a femeilor gravide cu vitamină D aparte sau în combinație cu alte micronutrienți. În total au fost supuse analizei 6 studii cu o cohortă totală de 1023 femei, și cinci studii cu participarea a 623 femei ce au primit vitamină D comparate cu femeile ce au primit placebo sau fără suplimentare și încă un studiu asupra 400 femei care au primit vitamină D și calciu față de gravidele nesuplimentate. În concluzie cercetătorii afirmă că suplimentarea cu vitamină D în timpul gravidității mărește concentrațiile de 25(OH)D măsurat la naștere. Cu toate acestea, semnificația clinică a suplimentării necesită continuarea cercetărilor, deoarece nu există dovezi certe că administrarea vitaminei D previne pre-eclampsia, diabetul gestațional, dereglarea toleranței, frecvența nașterilor prin cezariene, hipertensiune gestațională sau mortalitatea

maternă, sau ar preveni careva stări anormale la nou-născuți (naștere prematură, mortalitate fetală, scor Apgar jos, etc.) [104].

O cercetare contraversată este cea reiterată de Specker et al. (2004), publicând o revistă a literaturii au analizat relația între statutul vitaminei D la femeia gravidă, metabolismul calcic, modificările osoase la femeie și impactul acestora asupra dezvoltării intrauterine a fătului, și a nou-născutului au stipulat insuficiența datelor ce-ar argumenta efectul benefic al vitaminei D asupra creșterii fetale [103].

Un studiu randomizat efectuat de Hollis B. et al au descris trei diferite tipuri de dozare a vitaminei D într-un grup de 334 perechi mamă-copil din două localități din SUA, cu mame care alptau exclusiv nou-născuții. În concluzie, s-a dovedit că doza necesară pentru a acoperi necesitățile mamei și sugarului este echivalentă 6400 UI/zi [92].

Carol L. Wagner (Universitatea de Medicina din Carolina de Sud) a discutat două studii recente efectuate de către grupul ei în colaborare cu grupul lui Bruce Hollis - Institutului Național de Sănătate a Copilului și Dezvoltare Umană (NICHD) – Studiul vitaminei D în sarcină și studiul de suplimentare comunitară cu vitamină D a Fondului de cercetare Thrasher – care indică faptul că 400 UI vitamina D, doza administrată în majoritatea cazurilor prenatal, este inadecvată și că 4000 UI/zi este necesar pentru optimizarea producerii de 1,25(OH)2D3, realizată atunci când nivelul total circulant al 25(OH)D3 este de cel puțin 40 ng/ml [31, 112].

Un alt studiu randomizat efectuat de Marya și coautorii în 1988 [118] a relevat efectul suplimentării cu vitamină D al gravidelor asupra creșterii fătului. Două sute de femei au fost împărțite în 2 grupuri egale și au primit fiecare câte 600 000 UI vitamină D3 de două ori în ultimul trimestru de graviditate, fie placebo. Ca rezultat, nou-născuții de la femeile ce au primit vitamină D3 au prezentat o creștere mai mare intrauterină, cu valori mai mari la naștere ale greutateii, taliei, perimetrului cranian, circumferinței antebrățului și a grosimii pliului cutanat.

Efectul specific al statutului vitaminei D matern asupra dezvoltării osoase la făt și nou-născut a fost menționat în mai multe studii, dat fiind riscul dezvoltării rahitismului și osteopeniei la nou-născuții ce au suferit de o mineralizare scheletală scăzută în timpul dezvoltării intrauterine. Deși, rahitismul congenital este rar întâlnit la nou-născuți, în literatură au fost raportate cazuri printre copiii născuți de la femei cu osteomalacie nutrițională severă asociată cu deficit de vitamină D și calciu [119-121]. Pettifor et al. [122] într-un studiu caz-control au raportat existența unei asocieri între craniotabes sau osificarea întârziată a vortexului cranian și concentrațiile scăzute a 25(OH)D la mamă și nou-născut. Totodată, menționăm și faptul că, în alte studii observaționale sau trialuri, aceste concluzii nu au fost reiterate [101, 123].

S-a stabilit că masa osoasă, la orice vârstă, este rezultatul diferenței dintre cantitatea acumulată în decursul dezvoltării și pierderile intervenite după oprirea creșterii. Osteoporoza este caracterizată printr-o masă osoasă scăzută și o microarhitectonică deteriorată a țesutului osos, fapt ce mărește riscul dezvoltării fracturilor. Ea afectează 50% femeii și 13% bărbați după vârsta de 50 ani. Eforturile inițiale de prevenire a osteoporozei au fost axate asupra pierderilor osoase secundare. Însă, procesul de dezvoltare al masei osoase, care determină picul masei osoase (PMO), influențează de asemenea riscul de instalare a osteoporozei. Rezultând din cele constatate în 1972, Charles Dent ajunge la concluzia că osteoporoza la persoanele în vârstă nu este altceva decât o patologie pediatrică [124].

Un rol distinct în atingerea PMO aparține caracteristicilor inițiale ale organismului sau, cu alte cuvinte, factorilor genetici și epigenetici. Variabilitatea PMO într-un anumit grup populațional este explicată de către influența factorilor genetici în perioada de dezvoltare și pe parcursul întregii vieți. Polimorfismele cunoscute la momentul actual, asociate cu masa osoasă și/sau cu riscul de dezvoltare a osteoporozei sau a fracturilor sunt în majoritate localizate în partea codantă și promotoare a genei VDR (receptorului pentru vitamina D) și în genele codante ale colagenului de tipul I, receptorului estrogenic α , IL-6, factorului transformator de creștere β (TGF- β) și LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5 = proteina legată de receptorul lipoproteinei cu densitate joasă 5).

Ținem să menționăm, că epigenetica sau modificarea dobândită a expresiei genelor, ocupă un rol semnificativ în rândul factorilor de risc pentru dezvoltarea osteoporozei.

La copiii ce prezentau un retard de creștere intrauterină (RCIU) sau cei născuți cu o greutate mică conform vârstei gestaționale (small for gestational age, SGA), „memoria” stării de „malnutriție” provoacă modificări de programare a compoziției corporale cu impact asupra masei osoase [125]. Studiile efectuate în Regatul Unit, Australia și Scandinavia [126, 127] au demonstrat existența corelației între greutatea la naștere și masa sau densitatea osoasă la diferite etape ale vieții: la naștere, în perioada de pubertate și cea adultă. Factorii genetici într-o mare măsură explică o astfel de asociere, totuși, un studiu recent efectuat asupra gemenilor, a demonstrat existența unei corelații între masa osoasă în perioada adultă și greutatea la naștere independent de factorii sus-menționați [128].

Corelația între masa osoasă și greutatea la naștere poate fi observată începând deja cu perioada neonatală. Ea se referă mai întâi de toate la CMO, dar se observă și o corelație cu densitatea minerală osoasă (DMO) – valoare mai puțin dependentă de mărimea taliei și greutateii corporale în comparație cu CMO [96].

Ipoteza cea mai frecvent acceptată presupune existența unei traiectorii individuale de achiziție a masei osoase de la o etapă timpurie, dar care se menține pe tot parcursul vieții, mai cu seamă în perioada de pubertate. Astfel, studiile la care ne-am referit mai sus sugerează concluzia că starea antenatală exprimată prin greutate mică la naștere, concomitent cu o diminuare a masei osoase, poate în final determina un PMO redus. Menționăm, că greutatea la naștere are impact asupra DMO în valoare aproximativă de 10% și este la fel de importantă ca și tabagismul matern în timpul sarcinii [96]. Acest deficit inițial al DMO, capabil să persiste pe parcursul întregii perioade de dezvoltare, ar putea constitui un potențial risc de dezvoltare a osteoporozei în perioada adultă.

Impactul greutății la naștere este de regulă interpretat drept fenotip care este rezultatul restricției *in utero*, și definit de către D. Barker ca „*fenotip econom*” (*thrifty phenotype*) [129]. Inițial, acest fenotip are o influență durabilă asupra expresiei unor gene. El are origine epigenetică, care corespunde modificărilor post-tranlaționale din histone (acetilare, metilare sau fosforilare) sau al metilării insulelor de dinucleotide CpG în ADN. În acest context, epigenetica are un component dobândit, cauzat de condițiile în care a decurs sarcina, deseori asociază și un component ereditar. Cu toate acestea, CMO necesită să fie ajustat și corelat cu talia mamei înainte de naștere. Având în vedere aceste fenomene privind impactul factorilor de mediu, cum ar fi restricția antenatală, ei se consideră a fi implicați și în programarea de lungă durată a genelor cu efect durabil asupra metabolismului și funcțiilor celulare.

Diverse carențe *in utero* pot amplifica impactul restricției asupra dezvoltării masei osoase. Asociat sau nu cu fenomenul de restricție, statutul vitaminei D și de calciu în timpul sarcinii este legat cu CMO postnatal. Unele studii relativ mai vechi au demonstrat impactul pozitiv al suplimentării cu vitamina D în timpul sarcinii asupra statutului calcic al nou-născutului. Recent, corelația dintre aportul calcic și cel al vitaminei D în timpul sarcinii cu DMO prepubertară a fost raportată în baza a două studii [34, 130]. De menționat că componentul genetic poate interveni pentru a amplifica impactul epigenetic al fenotipului de restricție asupra masei osoase. Există o interacțiune dintre polimorfismul Bsm 1, VDR (asociate riscului de osteoporoză) și greutatea corporală la naștere - prima amplifică influența ultimei asupra DMO [131].

Este confirmată corelația între greutatea mică la naștere și riscul de dezvoltare a osteoporozei, care nu reprezintă o relație cauză-efect, dar subliniază sensibilitatea creșterii osoase fetale și postnatale față de factorii mediului antenatal. Modelele de restricție proteică *in utero* la șobolan reproduc întocmai consecințele fenotipului de restricție umană, însoțite printre

altele, de hipertensiune și anomalii cardiovasculare [126]. Impactul lor asupra osului constau în diminuarea CMO la șobolanul adult, fapt ce poate avea originea în consecințele epigenetice ale unui regim cu restricții.

Consecințele **fenotipului econom (thrifty phenotype)** teoretic, în viziunea actuală includ 2 faze:

- Faza inițială *in utero* induce programarea unui organism destinat să trăiască într-un mediu restricționat. Fenotipul ce rezultă este caracterizat printr-o greutate mică la naștere și, probabil, o programare de dezvoltare în care funcțiile somatotrope sunt parțial „înghețate”.
- În faza a doua, expunerea unui astfel de organism unui mediu ambiant diferit de cel programat inițial, induce o discordanță cu consecințe fiziopatologice potențiale. Astfel, organismul răspunde variabil la o astfel de discordanță și de modificare a fenotipului său inițial, care depinde, fără îndoială, de caracteristicile sale genetice. Flexibilitatea postnatală împreună cu componenta genetică poate, prin urmare, intensifica consecințele patologice care sunt rezultatul lipsei de adaptabilitate a fenotipului programat vizavi de mediul ambiant real.

Mecanismele ce se implică în programarea dezvoltării osoase pot fi de 2 categorii. Din punct de vedere celular, dezvoltarea masei osoase postnatale depinde de capacitățile proliferative și de diferențierea celulelor progenitoare mezenchimale (CPM) spre linia osteoblastică. Restricția proteică la șobolan reduce și transformă potențialul CPM. Răspunsul acestor celule la acțiunea hormonului de creștere GH și la cea a IGF-1 este, prin urmare, redus. În plan endocrin, ar putea să existe o anomalie de programare a funcționării efectorilor somatotropi. Rezistența parțială către GH și IGF-1, frecvent observată în contextul greutății mici la naștere, poate participa la geneza osteopeniei relative. La persoanele în vârstă, osteopenia legată de greutatea mică la naștere, ar putea fi interpretată sub unghiul anomaliei secreției GH. În acest context, un polimorfism al genei umane codante pentru GH, asociat unei concentrații joase a acestui hormon, a fost corelată cu pierderile osoase crescute în relație cu greutatea mică la naștere [132].

Funcția leptinei și receptorului său, care de asemenea fac parte din programarea antenatală, poate influența compoziția corporală și osteogeneza. Evoluția copiilor născuți cu greutate mică nu este omogenă. În ceea ce privește talia, majoritatea lor îi vor ajunge din urmă pe semenii. Procentul mic de copii cu retard de creștere va servi drept argument pentru administrarea GH. În diferite studii de cohortă la adulți, relația dintre masa osoasă și greutatea la naștere la subiecții ce i-au ajuns din urmă pe semenii și cei ce au rămas în urmă n-a fost stabilită [133-135]. În aceste studii, intensitatea relației valorilor densitometrice în raport cu cea a greutății mici la naștere scade după o ajustare la talie, sugerând ideea că deficitul de masă osoasă, într-o mare

măsură ar putea fi cauzată de defectul de creștere fără un real impact asupra DMO și, deci, asupra osteoporozei. Cu toate acestea, modificări ale compoziției corporale legate de greutatea mică la naștere se observă și la grupele de subiecți, majoritatea redobândind deficitul statural, având frecvent un exces de masă grasă și un deficit de masă osoasă [136-138].

În fine, elementul cel mai important este riscul de fracturi care poate fi asociat unei astfel de osteopenii [95]. Faptul dat militează în favoarea ipotezei că programarea antenatală nu corespunde cu factorii mediului ambiant postnatal, mai ales când gradul de recuperare este mare.

1.3. Rahitismul carențial la copiii de vârstă fragedă și adolescenții în creștere

Rahitismul carențial este larg răspândit la copii în primii doi ani de viață în majoritatea țărilor de pe glob, inclusiv și în Republica Moldova [18, 79, 139-142]. Mai mult ca atât, cercetătorii declară o creștere constantă globală a prevalenței rahitismului nutrițional, în asociere cu deficitul de vitamină D [1]. Rahitismul este definit ca o afectare a mineralizării la nivelul plăcii de creștere (calcifiere endocondrală) în primul rând datorită prezenței hipofosfatemiei, care cauzează întârzierea apoptozei condrocitelor și mineralizării matricei [2,3]. Deși, hipofosfatemia este considerată a fi calea finală comună prin care se dezvoltă majoritatea cauzelor de rahitism, factorii etiologici pot fi clasificați în linii mari în trei grupuri: *cauze calciopenice*, cum ar fi deficitul de vitamina D și perturbări ale metabolismului vitaminei D; *cauze fosfopenice*, în care există o anomalie primară a homeostaziei fosfaților, în mod principal datorită pierderii crescute a fosfaților pe cale renală și în al treilea rând *factori care cauzează inhibarea directă a mineralizării*, ca de exemplu în hipofosfatazia ereditară, ingestia excesivă de fluoruri, intoxicare cu aluminiu și utilizarea bifosfonaților de primă generație [4].

În prezent, se consideră că rahitismul este un sindrom al organismului în creștere și are drept cauză un defect al mineralizării țesutului cartilagos nou-format (țesutului osteoid). Mineralizarea defectuoasă a țesutului osteoid nou-format în aceste zone generează osteomalacia, care în decursul creșterii se asociază cu rahitismul [79].

Printre factorii nutriționali care pot influența acreția osoasă la sugar și copilul mic se includ statutul nutrițional al mamei în timpul gravidității, tipul alimentației sugarului, conținutul fosforului și calciului în formulele alimentare, alimentația artificială, precum și dieta copilului mic și a preșcolarului [97]. Deficitul matern al vitaminei D în timpul gravidității este asociat cu dereglări ale homeostazei calcice ale nou-născutului, cauzând un risc crescut de apariție a

hipocalcemie, posibil retard de creștere intrauterină și un conținut mineral osos (CMO) redus al nou-născutului [97].

Copiii prematuri au un risc crescut de dezvoltare al osteopeniei și, deși utilizarea formulelor alimentare cu conținut înalt de minerale a redus riscul dezvoltării osteopeniei la acești sugari, ea nu a înlăturat acest risc complementar [97].

Rahitismul copiilor de vârstă fragedă (D-carențial, clasic) este o afecțiune plurifactorială. În stabilirea diagnosticului, profilaxiei și tratamentului său, este necesar a fi luați în considerare toți factorii implicați în mecanismul fiziopatogenetic: alimentari (aprovizionarea insuficientă și dereglarea echilibrului calciului și fosforului din rația alimentară), imaturitatea organelor endocrine, diferite maladii etc. [143]. Veriga principală din lanțul fiziopatogenetic al rahitismului D-carențial o constituie deficitul endogen și exogen al vitaminei D și metaboliților săi, odată cu micșorarea ulterioară a cantității de calciu absorbită din intestine. Totuși, metaboliții vitaminei D influențează nu doar funcția enterocitelor, ci și a celulelor altor organe, fapt ce lărgeste aria interpretativă a importanței biologice a vitaminei D și consecințelor dereglării metabolismului ei [144].

În pofida faptului, că rahitismul este o dereglare a schimbului de substanțe cu dereglarea predominantă a metabolismului fosfocalcic, pentru el sunt caracteristice și alte procese patologice în oxidarea radicalilor liberi, metabolismul proteic, microelementelor (Cu, Fe) etc. [143].

Mult mai frecvent se stabilește acest diagnostic la sugarii alimentați artificial cu produse lactate neadaptate (chefir, lapte de vacă etc.) sau consumarea produselor lactate cu un conținut scăzut de calciu și vitamină D [145-149]. La apariția rahitismului contribuie și modul sedentar de viață, mai ales când expunerea la soare este limitată. Predispun la rahitism bolile de piele în care este dereglată sinteza colecalciferolului; sindromul de maldigestie și de malabsorbție care duce la dereglarea absorbției calciului, fosforului, vitaminei D în intestin; bolile hepatice și renale în timpul cărora are loc dereglarea sintezei metaboliților vitaminei D [140, 143, 150].

Pe de altă parte, gradul înalt de expunere la soare generează pericolul de formare a concentrațiilor înalte de vitamina D, de aceea, pentru a-și îndeplini funcțiile sale optime ale vitaminei, există mecanisme de adaptare, care în linii generale, corespund principiilor de transformare în cascadă a altor sisteme biologice. Diferența constă în aceea, că sistemul de reglare al vitaminei D este mult mai vulnerabil sub influența factorilor externi (atmosferici, alimentari, sociali). Toate aceste particularități, inclusiv și polimorfismul genetic al structurii și funcției receptorilor pentru metaboliții vitaminei D precum și condițiile diferite de interacțiune cu

alte sisteme de reglare ale metabolismului mineral, creează premise pentru individualizarea dozelor preparatelor vitaminei D în tratamentul rahitismului.

Cel mai pronunțat efect homeostatic al 1,25(OH)2D3 constă în activarea transportului calciului în sânge și spațiul intercelular din tractul gastrointestinal, inducând sinteza de către enterocite a proteinei transportatoare de calciu [151]. Însă, în condiții de hipocalcemie 1,25(OH)2D3 acționează asupra țesutului osos similar parathormonului – temporar mărește resorbția țesutului osos și în același timp crește absorbția calciului din intestin [152]. După normalizarea nivelului seric al calciului, vitamina D inhibă producția/secreția parathormonului și îmbunătățește calitatea țesutului osos, contribuind la mărirea numărului de osteoblaști, și micșorând transparența corticală și resorbția osoasă.

Receptorii pentru 1,25(OH)2D3 există în celulele mai multor organe, asigurând reglarea universală a multiplelor procese intracelulare. Mecanismul de reglare constă în următoarele: 1,25(OH)2D3 activează receptorul specific pentru vitamina D, după care mediatorii cresc sau scad expresia multiplelor gene implicate în absorbția calciului, creșterea și mineralizarea osoasă, diferențierea celulară și procesele imune. Parțial, acțiunea sa poate fi mediată printr-un mecanism membranar rapid, care modifică compoziția lipidică a membranei celulare cu acumularea și distribuția intracelulară a calciului. Efectul final al acestui proces reglator este amplificarea funcției celulare și a organului în întregime [6, 153, 154].

Dereglarea structurii și funcției organelor ce participă în reglarea metabolismului fosfocalcic poate sta la baza diferitor maladii și sindroame hipocalcemice. Deși, se știe, că rahitismul D-deficitar este o afecțiune de sistem a copiilor de vârstă fragedă, mulți autori constată subdiagnosticul lui cu subaprecierea unei posibile dominări asupra unuia din organe/sistem și a astfel de simptome cum ar fi hipotonia, scăderea apetitului, transpirația, acutizarea inflamației atopice [47].

Patologia care se dezvoltă în rezultatul dereglării homeostazei calcice, poate fi legată atât de deficitul metaboliților vitaminei D, cât și de defectul receptorilor pentru această vitamină. Nu este exclus ca acest defect să fie cauzat secundar și/sau tranzitor.

Korovina N.A. și coautorii, în baza experienței acumulate și a publicațiilor analizate despre prescrierea vitaminei D, concluzionează că nu există o corelare strictă dintre dozele curative ale vitaminei D, nivelul metaboliților săi și eficacitatea clinică a dozelor terapeutice și profilactice. Se creează impresia unei funcții mult mai complicate a fiecărui metabolit, mediați fiind de către receptori. Ca rezultat, pentru corecția dereglărilor echilibrului electrolitic în rahitism, în special al calciului, este rezonabil de a indica diferențiat metaboliții vitaminei D,

hormoni și alți mediatori ai metabolismului. Această conduită pare a fi una dintre cele mai ideale și ține doar de viitor [143].

Rahitismul definit ca mineralizare defectuoasă a cartilajelor zonei de creștere se manifestă prin semne radiologice de carență a vitaminei D și deformații osoase ce afectează membrele inferioare, coloana vertebrală, coastele și craniul. Cauzele rahitismului, de asemenea, afectează procesul de mineralizare osoasă, astfel cauzând osteomalacia. Actualmente, mineralizarea osoasă defectuoasă, asociată sau nu cu rahitismul, poate fi observată în perioada de creștere, în special la sugari, copiii mici și la adolescenți.

La moment sunt destul de bine studiați și sistematizați factorii care contribuie nemijlocit la retardarea achiziției masei osoase la copii și adolescenți. Printre ei sunt evidențiați factorii de risc genetici, hormonal, iatrogeni, de mediu (particularități alimentare, mod de viață, activitate fizică) etc. [16, 155]. O importanță decisivă are activitatea fizică și asigurarea organismului în creștere cu cantități suficiente de calciu și proteine [16].

Conform cercetătorilor americani, doar 25% băieți și 10% fete întrebuințează zilnic cantități suficiente de calciu [157, 158]. În Federația Rusă există unele publicații separate, care afirmă că cea mai mare influență a calciului este în perioada de pubertate [156], iar aportul diurn al calciului la copii și adolescenți este foarte mic. Astfel, la jumătate dintre ei, el constituie doar 50% dintre necesitățile fiziologice ale vârstei [155]. Conform statisticii, frecvența hipovitaminozei D printre adolescenții ruși în perioada de iarnă constituie 80%. Expunerea la soare insuficientă, aflarea nesistematică și de scurtă durată la aer liber, modul sedentar de viață, consumul insuficient de vitamină D din produsele alimentare, contribuie la formarea „datoriilor” de vitamină D față de organism.

Rahitismul și/sau osteopenia la adolescenți poate fi cauzat de carența de vitamină D și/sau cea de calciu, în special în perioada de creștere rapidă. Vârsta adolescenței reprezintă o perioadă critică în dezvoltarea osoasă, iar nivelul vitaminei D, al hormonului paratiroidian (PTH) și DMO (densitatea minerală osoasă) au un rol foarte important în creșterea și dezvoltarea armonioasă a adolescentului.

Conform mai multor studii în consens, nivelul seric al 25(OH)D <12,5 nmol/l (5 ng/ml) este observat la copiii cu rahitism evident și la adulții cu osteomalacie [159], o concentrație <20-25 nmol/l (8-10 ng/ml) poate duce la rahitism și osteomalacie după o perioadă mai îndelungată de carență [160], deficit de vitamină D la adolescenți este considerat nivelul seric al 25(OH)D <25 nmol/l (10 ng/ml) [161, 162]. În funcție de nivelul seric al vitaminei D, deficitul vitaminei D poate fi clinic cu modificări osoase și subclinic cu/fără ușoare modificări osoase și hipocalcemie.

Totodată, nivelul seric al 25(OH)D, care reflectă deficitul subclinic al vitaminei D încă nu este pe deplin definit. Nivelul scăzut al vitaminei D $>12,5\text{nmol/l}$, dar nu $>25\text{nmol/l}$ la adulți, asociat cu 15-30% creștere în ser a PTH a fost descris ca deficit moderat de vitamină D cu diferite efecte asupra osului [161]. Unii autori în publicațiile lor atestă că deficitul ușor al vitaminei D (inclusiv carența de vitamina D) poate fi observat și la un nivel seric al 25(OH)D între 25-50nmol/l, fiind asociat cu creșterea PTH în 15% dintre cazuri și un țesut osos intact [161, 163].

Un studiu relativ recent efectuat la pre – și adolescenți (vârsta 10 – 15 ani) din nordul Franței a depistat o prevalență înaltă a deficitului de vitamină D la sfârșitul verii [164]. Creșterea nivelului seric al PTH în timpul verii în grupul de copii ce nu au fost suplimentați cu vitamină D, a sugerat ideea că acest hiperparatiroidism reprezintă o consecință secundară a hipocalcemiei în urma deficitului de vitamină D [165].

Conform unor studii naționale efectuate în Regatul Unit, SUA și Noua Zeelandă, prevalența deficitului vitaminei D la adolescenți este mai mare decât la copiii mai mici. Prevalența deficitului vitaminei D pare să crească cu vârsta, începând încă din frageda copilărie pentru ca, la adolescenții din Marea Britanie să fie foarte înaltă. Statisticile denotă că 11–16% adolescenți din această țară (vârsta între 11 și 18 ani) au un nivel seric de 25(OH)D $<25\text{nmol/l}$ pe parcursul anului. Prevalența deficitului de vitamină D este, însă, de două ori mai înaltă dacă studiul este limitat doar la perioada de iarnă [166].

Cauzele prevalenței înalte ale insuficienței/deficitului subclinic al vitaminei D la populația tânără, în particular la adolescenți, nu este încă bine cunoscută. Printre factorii predispozanți la adolescenți se consideră etnia, genul, stadiul de pubertate, concentrația hormonului paratiroidian, alimentația și expunerea solară. Multe țări europene, inclusiv Republica Moldova, sunt situate la latitudine înaltă (37°N), cu perioada lunilor de iarnă lungă, când razele solare au intensitate slabă pentru a stimula sinteza dermică a vitaminei D. Printre factorii predispozanți pentru deficitul de vitamină D, la tineri și adolescenți, se consideră și faptul că sunt expuși mai puțin la soare sau folosesc creme cu factor de protecție solară >15 (care reduce sinteza vitaminei D dermale cu 98%). Însă conform altor date, impactul cremelor protectoare asupra statutului vitaminei D este minimal [30, 167].

În China prevalența rahitismului clinic la fetele adolescente constituie 9,4%, cel subclinic constituind 42,5% iarna și 6,7% vara. Riscul de dezvoltare a rahitismului subclinic a fost de 10,5 ori mai mare iarna, decât vara [168].

Deficitul sever și îndelungat al vitaminei D, hiperparatiroidismul secundar la copil și adolescent crește riscul dezvoltării osteoporozei la vârsta adultă, în special când deficitul de

vitamină D persistă și în perioada adultă. Rahitismul și osteomalacia reprezintă un indice de deficit sever al vitaminei D și pot contribui la dezvoltarea mai multor boli cronice. În acest context, există mai multe studii efectuate la persoane în vârstă. Un nivel seric al 25(OH)D <50 nmol/l a sugerat definirea hipovitaminozei, deoarece studiile epidemiologice au depistat asocierea ei cu unele maladii cronice (hipertensiune, boli cardiovasculare, diabet, schizofrenie, astm bronșic, multe boli inflamatorii și autoimune, 17 forme de cancer) [169]. Un studiu epidemiologic retrospectiv efectuat la adulți [170] denotă că suplimentarea cu vitamina D (de obicei în doză 20-25 μg/zi) în unele cazuri combinată cu calciu este pozitiv asociată cu o mai bună funcție musculară, presiune sanguină, glicemie și nivelul al insulinei. La copii și adolescenți, cu părere de rău, există puține studii în această privință. În același timp, un studiu efectuat la copiii din Olanda care au primit zilnic câte 2000 UI (50 μg/zi) de vitamina D3 în primul an de viață și supravegheați în decurs de 31 ani, a demonstrat un risc redus de diabet zaharat tip I în 80% din cazuri, pe când cei cu un aport scăzut sau absent de vitamină D, în primul an de viață aveau un risc de 2,4 ori mai mare de dezvoltare a diabetului zaharat de tip I [37]. Un alt studiu relevă că cei aflați în primii 10 ani de viață la latitudinea 35° au risc scăzut cu 100% de dezvoltare a sclerozei multiple, și un risc scăzut de dezvoltare a diferitor boli autoimune [85]. Cu toate acestea, ținem să menționăm, încă o dată, că aceste rezultate au fost obținute din studii observaționale și necesită a fi confirmate prin studii intervenționale placebo-controlate. Mai multe studii demonstrează efectele adverse ale deficitului vitaminei D asupra creșterii osoase la adolescenți [16]. Un studiu efectuat în Olanda arată că 62% dintre fete, cu vârsta cuprinsă între 14-16 ani, aveau un deficit sever de vitamină D și un DMO scăzut la nivelul oaselor radiale și ulnare [80]. Răspândirea globală a infecției HIV în populația tânără ne-a impus necesitatea analizei studiilor asocierii statutului vitaminei D și a infecției date la adolescenți descrise în literatură. Publicațiile la acest compartiment atestă că infecția HIV nu influențează statutul vitaminei D, pe când vitamina D afectează funcțiile imune, făcând să progreseze infecția HIV [171, 172].

Rahitismul poate fi tratat efectiv prin suplimentarea cu vitamină D. În prevenirea lui un rol important îl joacă expunerea la soare și aportul suplimentar de vitamină D. Aceste două strategii diferă în perioada de vară și cea de iarnă. M.F. Holick [173] consideră că aproximativ 30 minute de expunere la soare a membrelor și feței poate produce vitamina D necesară zilnic organismului. Dacă expunerea solară este insuficientă este necesară suplimentarea cu vitamina D [43, 85]. Reieșind din cele sus-menționate, mulți autori consideră că este necesar suportul nutritiv cu vitamina D3 pentru menținerea adecvată a nivelului vitaminei D pe parcursul iernii și

chiar vara pentru cei care evită expunerea la soare sau au necesități crescute (sugari, bătrâni). Autoritățile americane recomandă o suplimentare zilnică cu 5μg vitamină D la copii și adolescenți (vârsta 1-18 ani), pe când cei din Marea Britanie recomandă administrarea unei doze zilnice de 7μg la copiii între 1 și 3 ani și nu recomandă administrarea vitaminei D la cei cu vârsta cuprinsă între 4 și 64 ani, deoarece consideră că acest nivel și-l acumulează prin expunerea la soare în timpul verii. Celor cu restricții în expunerea la soare li se recomandă 10μg/zi [173]. În Franța, aportul nutritiv de vitamină D recomandat variază în dependență de vârstă: 20-25 μg/zi până la vârsta de 1 an, 10 μg/zi între 1 și 3 ani, 5 μg/zi de la 4 ani până la vârsta adultă, și 10 μg/zi pentru bătrâni, precum și pentru femeile gravide și care alăptează [174]. Aceste recomandări impun o suplimentare sistematică cu vitamină D la toate vârstele, când alimentarea obișnuită (aportul mediu de vitamină D fiind între 2 și 5 μg/zi) nu poate acoperi necesitățile, cu alte cuvinte, copiilor mici, gravidelor și femeilor care alăptează, și bătrânilor.

Erupția dentară este influențată de aceiași factori, hormoni și vitamine ce reglează și dezvoltarea somatică. Se consideră că hormonii tiroizi, hormonul de creștere, vitaminele A, C și D au o influență deosebită asupra erupției dentare. Vitamina D este cea mai importantă, având rol în mineralizarea țesuturilor dentare. Lipsa ei duce la întârzieri în erupția dentară și la modificări de formă (dinți în formă de șurubelniță). Dinții prost mineralizați prezintă hipoplazii ale smalțului la nivelul incisivilor, caninilor și primului molar, tulburări în formarea cementului, adică în dezvoltarea rădăcinii dentare. Aceasta poate duce la pierderea rapidă a dinților sau, uneori, ei pot rămâne pe arcadă 4–5 ani.

La copiii cu rahitism controlat procesul de dezvoltare dentară alveolară decurge normal, cu erupție dentară aparent normală. În cazul rahitismului netratat, dezvoltarea și calcifierea osului alveolar este săracă, ce duce la pierderea *lamina dura* și a ligamentului periodontal al dinților [175].

1.4. Vitamina D, cu rol protector în infecțiile respiratorii acute, tuberculozei și altor granulomatoase

Maladiile respiratorii sunt frecvent întâlnite la copiii cu deficiență de vitamină D. Ele sunt rezultatul unei combinații de procese, care la rândul lor sunt cauzate de insuficiența de vitamină D: în primul rând mineralizarea defectuoasă a grilajului costal și deformațiile toracice, apoi rezistența scăzută la infecții și diferențierea întârziată a unor tipuri de celule pulmonare. La baza acțiunii 1,25(OH)₂D asupra sistemului imun stă influența ei asupra creșterii și diferențierii

celulelor albe ale sângelui [176-181]. Cu mulți ani în urmă, s-a constatat că instalarea rahitismului carențial este însoțită de o slăbire a răspunsului imun al organismului și frecvenței înalte a afecțiunilor pulmonare [144, 182]. Doar, în ultimul timp au început să se dea explicații științifice bazate pe dovezi a acestui fenomen [78, 79, 170, 183-186].

Studiile extensive *in vitro* au studiat efectul $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ în celulele leucemice umane HL-60. Ele conțin un număr foarte mare de receptori pentru $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (mai mult de 4000 de copii la o celulă). S-a dovedit, că, sub influența hormonului, are loc maturizarea rapidă a celulelor similare macrofagilor [187]. Acest proces este însoțit de inhibarea proliferării celulare și amplificarea activității fagocitare. Stimularea diferențierii macrofagilor sub influența $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se observă *in vivo* la șobolani [177]. $1,25$ -dihidroxitamina D_3 sporește numărul de macrofagi alveolari atât prin influența directă asupra proceselor de diferențiere a celulelor precursorare, cât și prin stimularea dezvoltării celulelor splinei. În culturile țesutului splinei aproape 90% dintre celule la 3 zile după administrarea $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se transformă în macrofagi, gradul de maturizare al lor fiind direct corelat cu doza de hormon.

Paralel faptului că macrofagii sunt celulele-țintă pentru $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aceștia manifestă activitate $25(\text{OH})\text{D}$ -1-hidroxilazică. Macrofagii din alveolele pulmonare umane produc $3\text{H} - 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, fiind cultivate pe un substrat marcat $3\text{H} - 25(\text{OH})\text{D}_3$ [179]. Activitatea 1-hidroxilazei crește brusc, sub influența interferonului și este în raport direct cu doza lui. Are loc creșterea atât a numărului de macrofagi, cât și a funcției lor antimicrobiene, reprezentând un factor important terapeutic. Cu ajutorul acestui mecanism local din macrofagi, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potențiază capacitatea monocito-macrofagică a omului de inhibare *in vitro* a creșterii micobacteriei tuberculoase [180]. Mai mult ca atât, limfocitele T activate la pacienții cu tuberculoză contribuie la producția locală a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [188]. Aceasta explică parțial cunoscutele exemple ale efectului benefic al vitaminei D_3 în tratamentul tuberculozei, dar și hipercalcemia întâlnită la 10-20% pacienți cu tuberculoză sau maladii granulomatoase, cum ar fi sarcoidoza.

Vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorizează într-o egală măsură diferențierea celulelor din linia hematopoetică și cea a monocitelor-macrofagilor [189-191]. Primele experiențe efectuate în 1983-1984 au demonstrat efectul pozitiv al vitaminei D asupra diferențierii liniilor leucemice promielocitare (linia HL-60) în celule de tip macrofagic. Aceste rezultate *in vitro* au fost ulterior confirmate și extinse prin demonstrarea multiplelor efecte asupra liniilor normale ale monocitelor-macrofagilor circulante. Astfel, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorizează diferențierea monocitelor în macrofagi, precum și fuziunea celulară cu formarea ulterioară a celulelor multinucleare. Ea

influențează proliferarea și recrutarea celulară reglând producția factorilor de creștere, cum ar fi IL-3 și GM-CSF de către limfocite și monocite. De asemenea, mărește capacitatea de aderență, fagocitoză, capacitatea bactericidă și citotoxicitatea antitumorală a celulelor [192-194].

În mod contrar, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ posibil are un rol imunodepresant. Inițial ea micșorează capacitatea monocitelor-macrofagilor de a activa celulele T. Acest efect necesită prezența IL-4 [195, 196] și are cel puțin 3 rezultate cunoscute [191, 195, 197]. Vitamina D inhibă, fapt demonstrat, diferențierea și maturizarea celulelor dendritice de origine monocitară în celule prezentatoare de antigeni. Ea mărește capacitatea de apoptoză spontană a celulelor mature. În fine, ea micșorează expresia de către celule a moleculelor HLA de clasa II și cea a proteinei B7.2, un costimulator al recunoașterii complexelor majore de histocompatibilitate de către limfocitele T. Ea micșorează și secreția IL-12 de către celulele prezentatoare de antigeni, care este o citokină ce activează limfocitele Th1. Aceste efecte duc la recrutarea limfocitelor T care sunt mai puțin reactive, mai puțin specifice și secretă mai puțin gama-interferon [198, 199].

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ acționează direct asupra celulelor limfocitare diminuând producerea imunoglobulinelor de către limfocitele B, diminuând proliferarea limfocitelor T cu fenotipul CD4^+ și CD8^+ , diminuând producerea și funcția citotoxică a celulelor killer („Natural Killer” - NK, și „Cytotoxic T Lymphocytes” - CTL), și modulând activitatea imunodepresantă a limfocitelor T [189-191]. Acțiunea sa asupra celulelor T este exercitată în mod preferențial asupra celulelor helper Th1 anume prin diminuarea secreției IL-2 și gama-interferonului de către acestea [200].

Epidemiologia clinică la copiii frecvent bolnavi din Republica Moldova a demonstrat prezența rahitismului la toți acești copii. Majoritatea copiilor ce manifestau și semne rahitismale, făceau parte din categoria copiilor frecvent bolnavi de boli respiratorii acute și pneumonii recidivante cu evoluție trenantă [201]. În carența vitaminei D și hipocalcemiei are loc o scădere vădită a nivelului acizilor sialici, care au rolul de a inhiba neuraminidaza agenților bacterieni și virali, de asemenea are loc dereglarea activității monocitar-macrofagică, a procesului de fagocitoză, pinocitoză, dereglarea funcției canalelor membranare ale celulelor odată cu micșorarea activității 3,5-AMP ciclic [184, 185].

Astfel, $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ acționează ca principal reglator al metabolismului calcic, atât la nivel celular cât și la nivelul întregului organism, având un impact sever asupra fortificării organismului infantil împotriva agenților infecțioși și, în primul rând, în infecțiile respiratorii acute [201].

Un alt tip de cercetări active în domeniul relațiilor dintre vitamina D și sistemul imun este efectuat asupra granulomatoaselor, în special asupra tuberculozei. În acest tip de granuloame, 1,25(OH)2D activează diferențierea monocitelor/macrofagilor și transformarea lor în celule gigante, favorizând efectul micobactericid și controlul activității granulomei, modulând producerea numeroaselor citokine, inclusiv al gama-interferonului, IL-1, PGE2 de rând cu expresia receptorilor Loret [189].

Un efect suplimentar, care face parte din lanțul evenimentelor ce controlează granulomul dat constă în capacitatea celulelor granulomei de a produce ele înseși 1,25-(OH)2D. O astfel, de producere a fost observată în mai multe tipuri de granulome, inclusiv în sarcoidoză, lepră și tuberculoză, în special [188, 189, 202]. Această producere contribuie la mărirea concentrațiilor locale ale 1,25(OH)2D până la nivelul ce permite controlul granulomei [172].

În caz de leziuni masive, sinteza extra-renală a 1,25(OH)2D se extinde în sânge, făcând să crească concentrația circulantă a 1,25(OH)2D. Supraproducerea metabolitului activ în cauză sporește absorbția intestinală a calciului, fiind responsabilă de hipercalcemiile observate în sarcoidoză, tuberculoză și alte tipuri de granulomatoase [188, 202], atrăgând după sine epuizarea rezervelor de vitamină D, de unde și carența vitaminei date care duce în ultimă instanță la agravarea maladiei [203, 204].

Astfel, vitamina D pare să joace un rol important în lupta organismului contra tuberculozei și agenților responsabili de alte granulomatoase [205]. Totuși, administrarea vitaminei D pacienților în cauză comportă un risc, care nu poate fi neglijat, de inducere a unei hipercalcemii și de calcificare a țesuturilor moi, cauzat de hiperproducerea locală a 1,25(OH)2D de către granulomă.

Totuși, ca și în toate maladiile autoimune, genotipul VDR ar putea influența răspunsul organismului la prezența agenților responsabili ai granulomei. În acest context, dorim să menționăm că unele variante genetice ale VDR au fost mai frecvent depistate în grupurile de pacienți ce sufereau de tuberculoză [203] sau de alte patologii înrudite [206].

1.5. Carența vitaminei D, diabetul zaharat de tipul I, eclampsia și scleroza multiplă. Rolul determinismului genetic în fiziopatologia osteoporozei

Diabetul zaharat tip I (insulinodependent) este una dintre cele mai frecvente maladii cronice care apare în copilărie. El apare ca rezultat al distrugerii mediate pe cale imună a celulelor pancreatice β și este legat de genele din complexul HLA al cromozomului 6q21 [207]. Însă, dat fiind faptul că susceptibilitatea genetică este insuficientă pentru inițierea procesului patologic, au fost studiați multipli factori care ar acționa ca „trigger”. Majoritatea studiilor au ajuns la concluzia că, deși influența factorilor de mediu este în principiu slab cunoscută, factorii dietetici și infecțiile virale sunt principalii inițiatori potențiali ai diabetului tip 1 [208].

Holick explică relația între vitamina D și diabetul zaharat tip 1. Celulele insulare β posedă receptori către vitamina D (VDR), și, respectiv 1,25(OH) $_2$ D stimulează producția și secreția de insulină [43, 82, 209] fie direct, prin interacțiunea sa cu receptorul VDR din celulele β , fie indirect, prin creșterea concentrației serice a calciului. Dată fiind capacitatea limfocitelor T și B activate, monocitelor și macrofagilor de a răspunde la acțiunea 1,25(OH) $_2$ D prin modularea funcțiilor sale imune [51], se consideră că nivelul suficient de vitamină D poate scădea riscul dezvoltării unor maladii autoimune, cum ar fi diabetul zaharat tip 1, scleroza multiplă, maladia Crohn și artrita reumatoidă [210]. Efectul imunomodulator al vitaminei D, ca un potențial factor protector împotriva DZ tip 1, a fost descris în literatură și este activ discutat până în prezent [211].

Preeclampsia este o dereglare a sarcinii caracterizată prin hipertensiune arterială și proteinurie[212]. Acest proces patologic este, de asemenea, asociat cu scăderea fluxului sanguin uteroplacental și retard al creșterii intrauterine a fătului [212, 213].

Primele articole, care descriu asocierea între nivelul 1,25-hidroxivitaminei D în sânge și riscul de dezvoltare a preeclampsiei, și care sunt bazate pe studii semnificative, au apărut doar în jurul anului 2000 [214]. Halhali A., Garabedian M., și colaboratorii au studiat asocierea între preeclampsie, factorul de creștere asemănător cu insulina I (Insulin-like Growth Factor – IGF-I) și 1,25-dihidroxivitamina D. În caz de preeclampsie, concentrația IGF-I în serul matern este scăzută în comparație cu nivelul femeilor cu graviditate normală [215, 216]. Adițional, la efectul IGF-I asupra creșterii fătului, el are și efect stimulant asupra sintezei renale a 1,25-dihidroxivitaminei D la femeile negravidă și la rozătoare [217-221].

Studiile epidemiologice efectuate într-un șir de țări ale lumii, au demonstrat că sunt mai frecvent afectați de scleroza multiplă (SM) reprezentanții rasei cauziene. Cea mai mare

incidență este înregistrată în regiunile de nord ale emisferei nordice și cele de sud ale emisferei sudice (mai sus sau mai jos de paralela 40°), adică în zonele îndepărtate de Ecuator. O astfel de răspândire geografică se observă și în osteoporoză (OP) la maturi și în rahitismul carențial la copii [222, 223]. În calitate de aspect important al acestor două maladii, trebuie menționată înregistrarea la acești pacienți a unei carențe de diferit grad a vitaminei D și a metabolitului său 1,25 – dihidroxivitamina D₃ (1 α 25(OH)2D₃). Ultimul este nu numai reglatorul hormonilor calcemici, dar și reglatorul diferențierii celulelor, fiind și un imunomodulator activ [224].

În 1974, P. Goldberg [225, 226] a emis ipoteza insuficienței fotosintezei endogene a vitaminei D sub influența razelor ultraviolete (RUV), ca factor extern de dezvoltare a SM. El a presupus ca, în perioada pubertară de dezvoltare a sistemului nervos central, indivizii genetic predispuși pot necesita o cantitate mai mare de vitamina D și de calciu pentru sinteza normală a mielinei. Totuși, fenotipul dermei și conținutul scăzut de melanină din piele se asociază cu debutul precoce al SM [227].

În ultimul timp, studierea rolului factorilor ereditari în geneza patologiilor multifactoriale a căpătat o amploare genetico-epidemiologică pronunțată. O atenție deosebită se atrage depistării heterogenității genetice a semnelor și maladiilor multifactoriale. În acest context, ține de perspectivă studierea markerilor biologici predispozanți, care pot direct reflecta patogenia bolii. O astfel de abordare oferă posibilitatea de a stabili rolul componentei genetice în etiologia anumitor maladii în același timp cu identificarea grupelor de risc importanta a fi cunoscute în etapa preclinică a bolii. O astfel de informație poate fi utilă în timpul consultației genetice [228].

Este cunoscut că țesutul osos este un sistem dinamic, în care pe parcursul vieții au loc permanent cicluri de remodelare (îmbătrânire, distrugere și formare a țesutului osos nou). În copilărie, osul este cel mai intens supus procesului de remodelare, precum și de modelare specifică necesară pentru a conferi osului o formă finală pe parcursul creșterii osului. Sunt deosebit de pronunțate procesele de creștere, maturizare histologică și mineralizare la vârstă fragedă, prepubertate și pubertate. Procesele în cauză conferă osului o stare particulară, când el devine foarte sensibil la influența oricărui factor nefavorabil [155, 229]. Contrar acestor afirmații, examenul histologic al osului osteoporotic, nu permite evidențierea unor deficiențe de mineralizare, ci existența unei porozități accentuate, cu subțierea țesutului conjunctiv, care are un aspect discontinuu [230-232].

Carența vitaminei D prin aport alimentar insuficient sau prin transformarea deficitară a provitaminei (expunerea insuficientă la ultraviolete), împiedică absorbția calciului, deși aportul alimentar al acestuia este normal. De asemenea, în literatura medicală de specialitate este

acceptată unanim ideea că hipovitaminoza C induce o deficiență de sinteză a colagenului, care sub formele I, II și XII intră în structura osului.

Modelul de studiu al gemenilor a demonstrat, că mai mult de 50% din variabilitatea densității osoase este probabil determinată genetic, ceea ce explică variațiile rasiale dintre oameni în ceea ce privește valoarea masei osoase maxime [233].

Cea mai studiată genă, până în prezent, este cea codantă a receptorului pentru vitamina D, probabil datorită rolului jucat de către această vitamină în reglarea homeostazei calciului și metabolismului osos, concretizat în:

- stimularea diferențierii osteoblaștilor și sintezei de osteocalcină de către aceștia;
- intensificarea procesului de diferențiere a celulei stem către osteoclaste [234, 235];
- activarea enzimelor din structura marginii „*in perie*” (dantelată) a osteoclastelor;
- creșterea concentrației, turnover-ului și activității unor protein-enzime din marginea „*in perie*” a celulelor epiteliale intestinale, implicate și în absorbția calciului ionic (Ca^{2+}).

Au fost determinate câteva variante de polimorfism ale genei VDR. Primele variante identificate (cu predilecție BsmI, ApaI, Taq I) sunt situate în regiunile intronice și nu au consecințe funcționale clare. Un interes deosebit, însă, posedă polimorfismele recent identificate și descrise. Polimorfismul FokI (Ff) poate modifica proteina VDR prin adăugarea unui aminoacid la capătul terminal N al secvenței. Polimorfismul Cdx2 este localizat în regiunea promotoare în locusul ce se unește cu factorul diferențierii intestinale Cdx2 [236]. Au fost descrise încă două polimorfisme localizate în regiunea promotoare [237]. Cele trei polimorfisme localizate în regiunea promotoare reprezintă un interes special, deoarece ele modifică transactivarea genei VDR și datorită asocierii lor cu riscul dezvoltării osteoporozei și fracturilor la persoanele în vârstă și cu talia la fetele adolescente [237-239].

În studiul genei receptorului pentru vitamina D (VDR), identificată sub forma a trei genotipuri (două homozigote [FF] și [ff] și unul heterozigot [Ff], s-a urmărit evidențierea posibilei asocieri a unui anumit tip de genotip, ce redă o anumită densitate osoasă apreciată cantitativ, dar și calitativ prin: mică, normală, mare [5, 240].

Concluziile studiilor pe gemeni au permis formularea ideii că genotipul VDR are valoare predictivă pentru densitatea osoasă, astfel încât:

- a) genotipul [FF] este asociat cu densitatea osoasă mică, iar genotipul [ff] se corelează cu valori mari ale densității osului;
- b) femeile cu osteoporoză postclimax prezintă o prevalență crescută a genotipului [FF];

- c) genotipul [FF] este responsabil de inducerea unui turnover osos crescut, nu numai în studiile axate pe gemeni, ci și pe populația neînrudită;
- d) femeile aflate în stare de postclimax cu fenotip [FF] au o viteză de pierdere a masei osoase mai mare, dacă aportul zilnic de calciu se prezintă sub o treime din necesarul maxim (necesarul zilnic, fiziologic de calciu la adult este de 0,6 – 0,9 g, la copii variază în funcție de vârstă și sex de la 200mg/zi la sugarii primilor doi ani de viață până la 1000mg la adolescenți). Variațiile alelice obișnuite ale genei receptorului pentru vitamina D se corelează cu nivelurile osteocalcinei și implicit cu turnover-ul osos, acestea sugerează că modificările genetice asupra densităților osoase sunt reprezentate de modificarea cantitativă a VDR.

Un alt studiu efectuat la femeile cu genotip [FF] a furnizat date clare referitor la acțiunea pozitivă a aportului alimentar de calciu asupra încetinirii distrucției osoase [231].

Alte gene studiate și posibil implicate în geneza osteoporozei au mai fost:

- a) gena interleukinei 6, care mediază pierderea osoasă în postclimax, iar recent, izolat cercetată, gena receptoare a interleukinei 4;
- b) gena receptoare α a estradiolului, care are acțiune independentă de reglare a densității osoase, adică față de acțiunea exercitată de gena receptoare a interleukinei 6 și cea a VDR, dar cu care are în comun acțiunea sinergică;
- c) factorul de creștere β , care reglează atât formarea cât și rezorbția osoasă. La femeile daneze în menopauză, studiul genei receptoare a factorului de creștere β a evidențiat un polimorfism al genei asociat cu niveluri ridicate sanguine ale factorului de creștere, cu densitatea mică osoasă și turnover crescut osos, polimorfism neîntâlnit, însă, la femeile nipone aflate, de asemenea, în postclimax.
- d) Studiul genei sintezei collagenului osos de tip I, a permis evidențierea existenței, la femeile finlandeze cu osteoporoză, a unei mutații care afectează structura collagenului.

Astăzi, când epidemiologia genetică a osteoporozei a demonstrat că variațiile densității osoase au sorginte genetică, studierea genelor implicate în dezvoltarea osteoporozei oferă și speranța unei noi metodologii de terapie a bolii.

1.6. Deficitul lactazei și intoleranța/malabsorbția lactazei definite în baza criteriilor genetice (variantele genei mcm6 care precedă gena lactazei)

Enattah și colaboratorii [241] au studiat gena LCT a lactazei situate în apropierea locus-ului 2q21 la mai multe generații din 9 familii finlandeze (haplotipii și dezechilibrul de legătură). Ei au identificat astfel două variante polimorfice în cadrul a doi introni (13 și 9) a genei MCM6 care precede gena LCT. Aceste variante sunt situate în – 13 910 (C/T) și – 22018 (G/A) în raport cu gena de lactază (Figura 1.7).

Variantele din – 13 910 au fost asociate cu o persistență (T/T sau C/T) sau absență (C/C) a activității lactazice evaluate cu ajutorul LTTE (lactose tolerance test with ethanol). Această asociere a fost confirmată la mai mulți pacienți ce depășeau vârsta de 20 ani prin măsurarea activității disaharidazei (lactazei/invertazei) în biopsiile de jejun. Această asociere de genotip/fenotip a fost mai apoi confirmată prin măsurarea activității diferitor enzime, în special a lactazei, zaharazei și maltazei în biopsiile intestinale recoltate de la 329 copii consultați în una dintre secțiile de gastroenterologie [242]. Astfel, a fost observată o corelație dintre genotipul – 13 910 C/C și o activitate redusă a lactazei (< 10 U/g de proteine) la populația europeană și africană. În plus, s-a observat o corelație strânsă dintre genotip/răspuns la testul de expulzie a hidrogenului la 123 de copii, inclusiv 30% dintre cei care aveau genotipul C/C. Astfel, 97% dintre copii cu genotipul C/C, și doar 14% dintre copii cu genotipul C/T sau T/T au avut răspuns pozitiv la testul H2 [243].

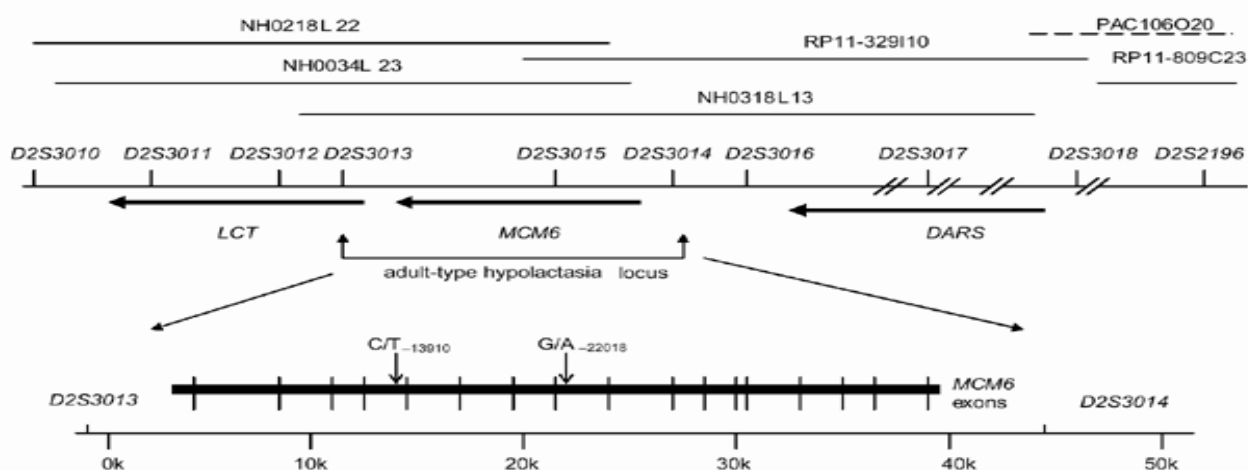


Fig. 1.7. Organizarea genei MCM6 cu pozițiile variantelor în intronii 9 și 13 asociate cu persistența lactazei [241].

Variantele asociate unei persistențe a lactazei în – 13 910 (T/T și C/T) și în – 22018 (A/A și A/G) a genei pentru lactază fac în esență parte din haplotipuri imense mai mari de 1 Mb, observate la 77% din populația eropeană, sugerând o selecție relativ recentă (5000 până la 10000 ani) a populației tolerante la lactoză [244, 245]. Din contra, genotipul favorabil (mai ales alela T din – 13910) se întâlnește rar la populația africană inclusiv la cei care nu suferă de malabsorbția gravă a lactozei [246]. Existența unui alt polimorfism (–13915 T/G) în sânul acestor populații ar putea explica această discordanță, deoarece o asociere dintre un polimorfism mononucleotidic (SNP – single nucleotide polymorphism) în – 13 915 și persistența lactazei a fost observată la populația africană cunoscută ca fiind lipsită de problema malabsorbției lactozei [247].

Ca rezultat, pare evident că analiza polimorfismului în poziția – 139 10 poate fi utilizată ca marker al deficienței lactazice. Totuși, este importantă abordarea critică a acestor rezultate, cu atât mai mult că, în aceste studii, n-a fost implicată populația Europei de Nord [248].

Scopul acestei cercetări constă în evaluarea impactului carenței/insuficienței vitaminei D asupra metabolismului fosfo-calcic și sănătății osoase în corelație cu factorii genetici la copii și adolescenți, pentru optimizarea algoritmului de diagnostic și managementului terapeutic.

Pentru realizarea scopului au fost trasate următoarele obiective:

1. Evaluarea impactului carenței/insuficienței vitaminei D asupra statutului clinico-fiziologic și genetic la copii și adolescenți.
2. Studiarea manifestărilor deficitului vitaminei D în dependență de perioada ontogenetică de dezvoltare a copilului (intrauterină, postnatală precoce și tardivă), de anotimp și zonele climato-geografice (Moldova, Franța, Algeria, Martinica, Ingușetia).
3. Analiza comparativă a deformărilor membrelor inferioare și a parametrilor biochimici în asociere cu valorile vitaminei D la copii și adolescenți din Moldova și Franța.
4. Depistarea impactului factorilor genetici asupra metabolismului calciului, sănătății osoase, dezvoltării fizice, prin prisma polimorfismului a 3 gene: VDR, Klotho și LCT, în asociere cu valorile vitaminei D serice la copii de diferite vârste și adolescenți.
5. Elaborarea algoritmului de diagnostic al hipocalcemiilor, pentru optimizarea diagnosticului timpuriu.
6. Emiterea managementului de conduită al carenței vitaminei D în scopul eficientizării tratamentului și profilaxiei specifice.

1.7. Concluzii la capitolul 1

1. Analiza lucrărilor științifice privind modificările statutului clinico-fiziologic și genetic al carenței vitaminei D în perioadele pre- și postnatală de dezvoltare a copilului atestă succese în dezvoltarea impactului vitaminei D asupra dezvoltării rahitismului/osteomalaciei la persoanele mature, concomitent indică despre existența unui șir de probleme majore ce necesită rezolvare sau concretizare: specificul manifestării deficitului vitaminei D în dependență de perioada ontogenetică de dezvoltare a copilului, de anotimp; dependența deformărilor membrelor inferioare de valorile pragului vitaminei D; impactul factorilor genetici asupra metabolismului calciului, sănătății osoase și dezvoltării fizice, etc.
2. Prezența lacunilor menționate în studierea impactului carenței/insuficienței vitaminei D asupra statutului clinico-fiziologic, biochimic și genetic la copii și adolescenți presupune realizarea unui studiu complex menit să evalueze particularitățile statutului vitaminei D la diferite categorii de vârstă (femei, gravide, nou-născuți, sugari, copii de diferită vârstă) în conexiune cu factorii alimentari ai mediului înconjurător, corelația statutului vitaminei D, aportului de calciu, genotipului VDR și factorului genetic KLOTHO, intoleranței la lactoză, ce ar permite elaborarea unei noi conduite de obiectivizare a diagnosticului și eficientizare a tratamentului.

În această etapă, considerăm utilă recapitularea fiziopatologiei interacțiunilor între vitamina D, calciu, fosfor, factorii genetici și ai sănătății osoase, de rând cu expunerea turnover-ului osos prin reprezentarea schematică a acestora în figurile de mai jos (Figurile 1.8-1.12).

VITAMINA D: SURSE ȘI METABOLISM

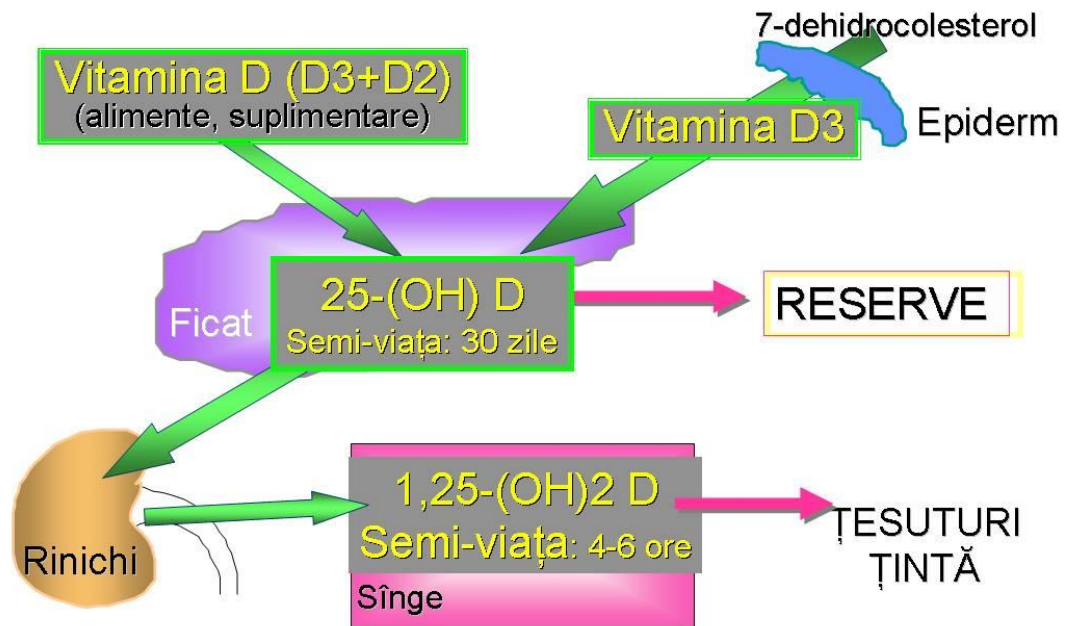


Fig. 1.8. Reprezentarea schematică a surselor și metabolismului vitaminei D (autor Alexandru Voloc).

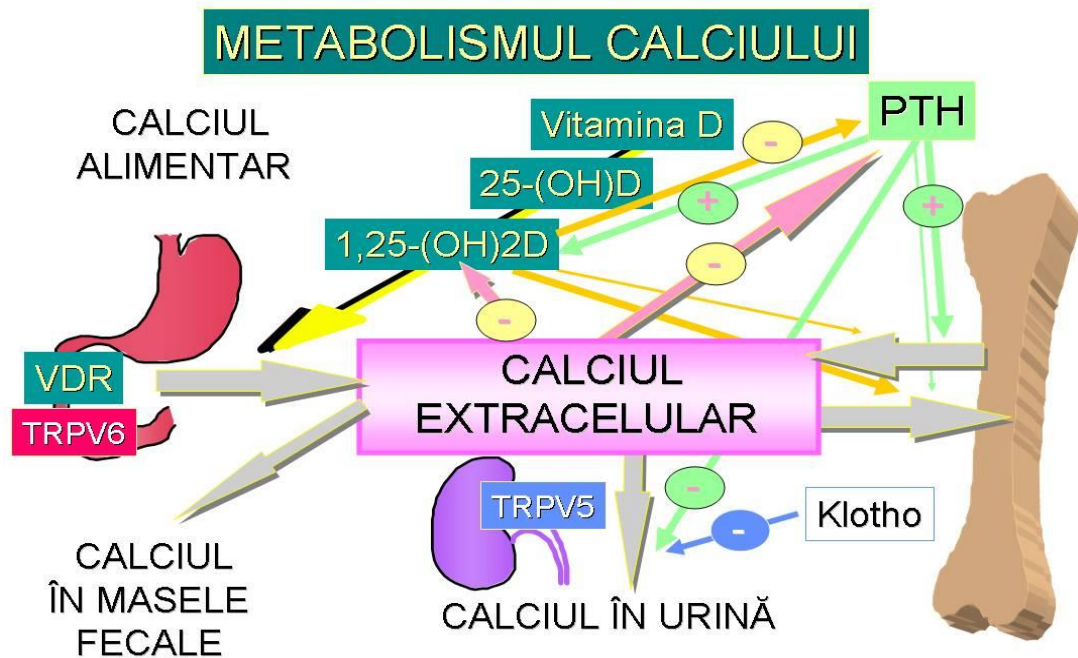


Fig. 1.9. Reprezentarea schematică a metabolismului calciului (autor Alexandru Voloc).

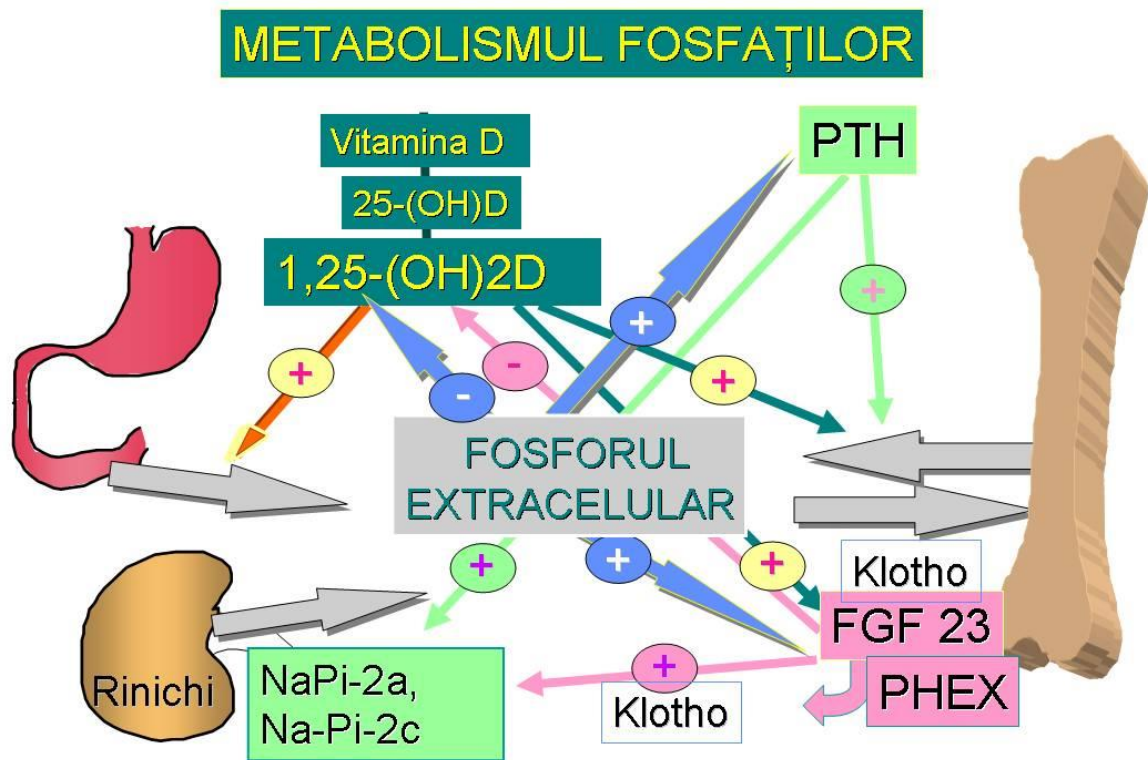


Fig. 1.10. Reprezentarea schematică a metabolismului fosfaților (autor Alexandru Voloc).

Interacțiunile statutului vitaminei D, aportului de calciu și a genotipului VDR

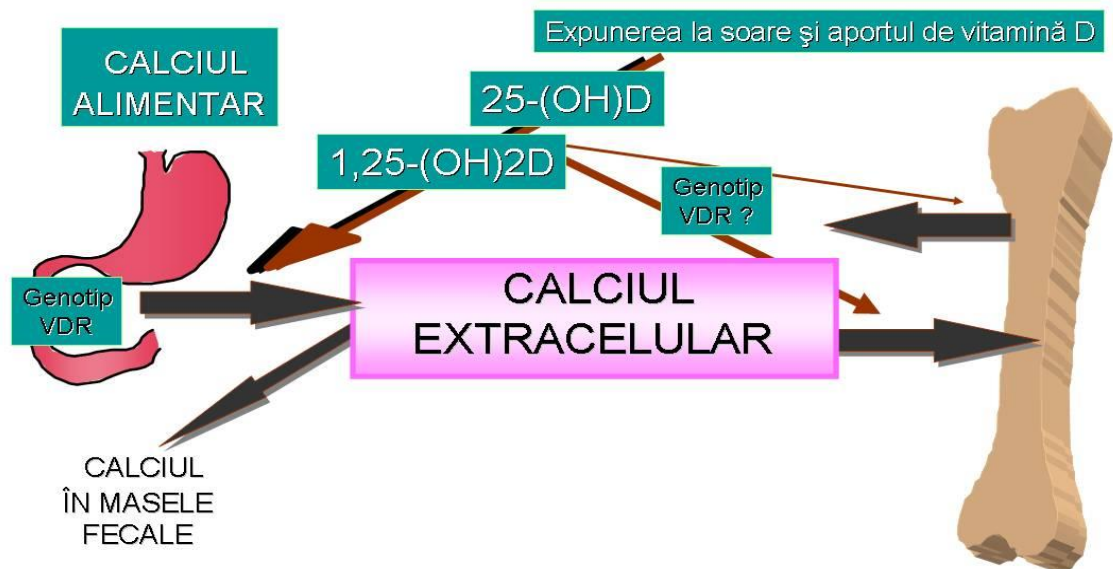


Fig. 1.11. Reprezentarea schematică a interacțiunilor între vitamina D, calciu și genotipul VDR (autor Alexandru Voloc).



Fig. 1.12. Reprezentarea schematică a *turnover*-ului osos și al ontogenezei scheletului uman (autor Alexandru Voloc).

2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE

2.1. Caracteristica generală a cercetării

Pentru realizarea scopului și obiectivele trasate au fost planificate două tipuri de studii: studiul clinic caz-control și studiul de cohortă. Pentru a determina eficacitatea administrării vitaminei D la femeile gravide a fost proiectat studiul clinic controlat cu selectarea randomizată a pacientelor. Volumul eșantionului a fost estimat prin aplicarea formulei respective:

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times P(1-P)}{(P_0 - P_1)^2} \quad (2.1)$$

unde:

- P_0 – proporția cumulativă a complicațiilor la femeile gravide cu carența vit.D în mediu constituie 43,0% conform formulei ($P_0=0,43$).
- P_1 – proporția femeilor gravide în lotul de cercetare. Presupunem, că rata complicațiilor în urma administrării vit. D va fi de 20,0% ($P_1=0,20$). $P = (P_0 + P_1)/2=0,315$.
- Z_{α} – valoarea tabelară. Când „ α ” – pragul de semnificație este de 5%, atunci coeficientul $Z_{\alpha}=1.96$;
- Z_{β} – valoarea tabelară. Când „ β ” – puterea statistică a comparației bilaterale este de 10.0%, atunci coeficientul $Z_{\beta}= 1,28$.
- f – proporția subiecților care posibil să abandoneze studiul din diverse motive $q = 1/(1-f)$, $f=10,0\%$ (0,1).

Introducând datele în formulă am obținut:

$$n = \frac{1}{(1-0.1)} \times \frac{2(1.96+1.28)^2 \times 0.315 \times 0.685}{(0.43-0.20)^2} = 95 \quad (2.2)$$

În cercetarea actuală au fost create două loturi:

- *lotul de cercetare* L_1 – 100 de gravide la care a fost administrat vit. D;
- *lotul de control* L_0 – 100 de gravide la care nu a fost administrat vit. D.

Cercetarea actuală a fost desfășurată în două etape:

Etapa I (februarie 1998 – septembrie 1999) a fost efectuată în raza de deservire a Centrelor medicilor de familie și maternităților spitalelor raionale Călărași și Ialoveni. Statutul vitaminei D a fost determinat în cadrul Institutului Național de Sănătate și Cercetări Științifice în Medicină (INSERM) Unitatea 561 din cadrul Spitalului Saint Vincent de Paul din Paris. Această etapă a fost realizată în două perioade: perioada A și perioada B.

Perioada A

Criteriile de selectare ale raioanelor.

Raioanele în care s-a efectuat perioada A a studiului au fost selectate după următoarele criterii: **1)** contingent suficient pentru a putea studia o sută de femei gravide și copiii născuți la sfârșitul iernii și verii; **2)** dispuneau de sectoare sanitare cu un nivel socio-economic identic al populației; **3)** familiile incluse în studiu s-au aflat în raza cea mai apropiată de deservire a maternităților și Centrelor de familie/de sănătate, ceea ce a facilitat supravegherea calitativă a gravidelor și copiilor pe parcursul primului an de viață; **4)** medicii șefi ai acestor două spitale raionale și-au dat acordul și și-au luat angajamentul în scris față de Ministerul relațiilor externe al Franței, de a organiza la timp și a monitoriza în permanență, în colaborare cu noi, calitatea și corectitudinea efectuării studiului.

Criteriile de selecție ale femeilor însărcinate.

1. sarcină cu evoluție normală;
2. sarcină monofetală;
3. naștere prevăzută în perioada între începutul lunii aprilie și începutul lunii septembrie;
4. follow-up regulat al copiilor până la vârsta de 12 luni cu prelevarea tuturor analizelor prevăzute în protocolul de studiu, de către medicii de circumscripție;
5. prezența consimțământului.

Protocoloalele de studiu din etapa I

Lotul de cercetare L₁. Conform datelor statistice instituționale, în maternitatea din Spitalul Raional Călărași, lunar aveau loc 110-120 nașteri. Ca rezultat au fost supuse examinării 100 de gravide în a 6-a lună de sarcină, începând cu 1 februarie 1998. După discuții individuale și cu consimțământul fiecăreia dintre ele de a participa la studiu, toate gravidele lotului L₁ în a 6-a lună de gestație, au primit pe cale orală o doză de 100 000 UI de vitamină D₃ (o fiolă buvabilă de soluție uleioasă de Uvedose®, Crinex, Franța), administrată în prezența medicului. Fiecărei gestante i s-a atribuit un număr de ordine de la 1 până la 100 în ordine cronologică, odată cu includerea în protocolul de supraveghere. Orice administrare de medicamente a fost sistematic monitorizată și notată în fișa de supraveghere a gravidei până la sfârșitul sarcinii. În luna martie 1998, în a 7-a lună de sarcină, toate cele 100 de femei gravide au fost repetat examinate. În laboratorul Spitalului Raional din raionul Călărași, prin metoda spectrofotometrică, a fost determinat nivelul seric al calciului. Totodată, s-au prelevat suplimentar câte 2 ml de sânge, care a fost centrifugat obținându-se 0,5-1 ml de ser, păstrat mai apoi la temperatura de -20°C până la

transportarea sa pe cale aeriană la laboratorul Institutului Național de Sănătate și Cercetări în Medicină Unitatea 561 din Spitalul Saint Vincent de Paul din Paris, pentru aprecierea statutului vitaminei D (25(OH)D) după metoda radioimună cu fază lichidă.

Lotul de control L₀ a inclus femeile ce trebuiau să nască începând cu 15 aprilie 1998, în maternitatea din raionul Ialoveni. Protocolul de supraveghere a fost identic cu cel al maternității din raionul Călărași, cu excepția faptului că gravidelor din lotul martor nu li s-a administrat vitamina D în timpul sarcinii. La naștere (aprilie – iunie 1998), s-au prelevat probe de sânge din cordonul ombilical pentru aprecierea nivelului calciului seric în laboratorul raional al maternității. Concomitent, au fost prelevați 2 ml de sânge ulterior supus centrifugării. Serul obținut după centrifugare, în cantitate de 0,5-1 ml, într-o eprubetă de plastic tip eppendorf, a fost pus la păstrare la temperatura -20°C până în momentul transportării în laboratorul de referință, aplicându-se aceeași metodă radioimună de dozare a 25(OH) D.

Perioada B

S-a desfășurat pe un număr de 200 nou-născuți de la femeile ce făceau parte din ambele loturi de studiu (maternitatea I – 100 nou-născuți și maternitatea II – 100 nou-născuți), de la care s-a prelevat sânge din cordonul ombilical pentru determinarea nivelului seric al calciului în laboratoarele ambelor spitale raionale și nivelul seric al 25(OH)D prin metoda radioimună cu fază lichidă în laboratorul de referință din Paris. Pe parcursul celor 7 zile de studiu în maternitate, nou-născuții din ambele raioane au fost examinați și supravegheați în permanență de către medicii-neonatologi, care au fost în prealabil instruiți în vederea examinării și depistării semnelor clinice de hipocalcemie, efectuând concomitent măsurările antropometrice necesare. Protocolul de studiu din ambele loturi a prevăzut pentru fiecare cuplu „mamă-copil” completarea unui chestionar de către medicul-neonatolog din maternitate. Odată cu externarea lăuzei și a nou-născutului din maternitate, chestionarele erau acumulate pentru verificare și prelucrare statistică (Anexa 1, Chestionarul nr. 1). Nou-născuți (n=200), imediat după naștere, au fost departajați în 2 loturi: lotul de cercetare L₁ și lotul de control L₀.

Lotul de cercetare L₁ a inclus 100 nou-născuți din ambele maternități cu numerele de ordine în intervalele 1-25; 51-75; 101-125 și 151-175, cărora li s-a administrat o doză orală de 100 000UI vitamină D₃ (o fiolă buvabilă de soluție uleioasă de Uvedose®, Crinex, Franța) în a 7 zi după naștere, apoi la 3, 6, 9 și 12 luni de viață, fiind permanent monitorizați pe parcursul primului an de viață de către medicul-pediatru de circumscripție în baza unui protocol clinic standardizat elaborat pentru facilitarea depistării la timp a unor semne eventuale de rahitism sau de hipervitainoza D (Anexa 2, Chestionarul nr.2).

Lotul de control L₀ a inclus 100 nou-născuți din ambele maternități cu numerele de ordine cuprinse în intervalele 26-50; 76-100; 126-150; 176-200, care au primit o profilaxie specifică fracționată a rahitismului carențial recomandată de Ministerul Sănătății al Republicii Moldova în consens cu OMS/UNICEF. Ca și în sublotul I, copiii au fost permanent monitorizați de către un medic-pediatru de circumscripție, oficial delegat și instruit în vederea depistării la timp a unor semne eventuale de rahitism sau de hipervitaminoză D, având la bază același protocol clinic standardizat. Semnele clinice de carență ale vitaminei D sau de hipervitaminoză, indicate în fișa de supraveghere a fiecărui copil, erau cercetate în timpul fiecărei consultații sistematice și notate cu meticulozitate. De asemenea, erau notate eventualele patologii și tratamente administrate fiecărui copil.

Protocolul de supraveghere a prevăzut ca tuturor copiilor cu semne de hipervitaminoză D, pe perioada de studiu, să li se preleveze probe de sânge pentru: 1) dozarea calcemiei; 2) colectarea a 0,5 ml de ser pentru determinarea statutului 25(OH)D. Dacă semnele de hipervitaminoza D ar fi fost eventual confirmate prin evidențierea unei hipercalcemii (calcemie mai mare de 2,8 mmol/l), era prevăzută stoparea ulterioară a administrării vitaminei D, cu reluarea administrării doar peste 3 luni, la un nivel seric al calciului în limitele normei.

Copii, care puteau eventual prezenta semne clinice de hipovitaminoză D, în perioada de studiu (rahitism carențial, convulsii febrile sau afebrile), li se preleva sânge venos pentru dozarea calcemiei și 25(OH)D. În caz de confirmare a carenței vitaminei D era instituit un tratament specific, recomandat de către Ministerul Sănătății sau tratamentul propus de către Grupul internațional al metabolismului fosfocalcic și al vitaminei D cu sediul la Paris, ce presupune:

- **rahitism carențial moderat** (stadiul II, concentrația serică a calciului depășește nivelul de 2 mmol/l), se recomandă administrarea unei doze orale de 200 000 UI (2 fiole buvabile de soluție uleioasă Uvedose®).
- **rahitism carențial grav** (stadiul III fără semne clinice de hipocalcemie în care calcemia era mai mare sau egală cu 2 mmol/l), era recomandată administrarea unei doze orale de 200 000 UI vitamină D₃ și a unei doze orale de 500-600 mg/zi de calciu pe o durată de minimum trei luni în funcție de severitatea manifestărilor osoase.
- **semne clinice de hipocalcemie cu sau fără rahitism** (calciu seric < 2 mmol/l), s-a recomandat o perfuzie de gluconat de calciu timp de 1-4 zile, în funcție de severitatea hipocalcemiei (până la ridicarea nivelului calciului seric mai sus de 2,2 mmol/l). Protocolul dat prevedea ca, în astfel de situații, să se administreze o doză orală de 200 000 UI vitamină D₃ doar după 24 ore de la administrarea perfuzată a calciului (500mg de Ca la kg). Totodată,

era recomandat și un aport oral de calciu (300 mg/zi copilului mai mic de 3 luni și 600 mg/zi celui mai mare de 3 luni) pe o durată de 1-3 luni în funcție de severitatea semnelor osoase.

La toți copiii, indiferent de grupul de tratament din care ar fi făcut eventual parte, profilaxia specifică a rahitismului era reluată peste 3 luni cu un aport oral de 100 000 UI vitamină D₃ cu o periodicitate de 3 luni.

Copii incluși în lotul de studiu (n=200), după externarea din maternitate, au fost supravegheați în permanență de către medicul-pediatru de circumscripție și examinați lunar în baza aceluiași chestionar clinic standardizat, pînă la vârsta de 1 an, cu aprecierea taliei și greutatei corporale, de 3 ori, fiind notată cea mai mare valoare. La această vîrstă, copiilor li s-a determinat în laboratorul raional nivelul calciului seric și s-au prelevat 2 ml de sînge în vederea obținerii a 0,5 – 1ml ser pentru determinarea statutului vitaminei D în laboratorul de referință, fiind folosită trusa „Hydroxy Vitamin D a Institutului de Diagnostic Nichols” (simplu numită trusa Nichols). Eprubetele, similar celor precedente, purtau numărul cuplului: mamă – copil și data prelevării.

Descrierea socio-demografică a loturilor din I etapă de studiu

Vârsta gestantelor din ambele loturi de studiu este redată tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Repartiția femeilor gravide din ambele loturi de studiu după vîrstă.

Grup de vîrstă (ani)	Lotul L1 (n ₁ =100)		Lotul L0 (n ₀ =100)		t	p
	Abs	P ₁ ±ES ₁ %	Abs	P ₂ ±ES ₂ %		
16 – 17	1	1,0±0,99	2	2,0±1,46	0,4	>0,05
18 – 20	19	19,0±3,92	23	23,0±4,21	0,8	>0,05
21 – 25	38	38,0±4,85	36	36,0±4,80	0,3	>0,05
26 - 30	32	32,0±4,66	28	28,0±4,49	0,5	>0,05
31 – 35	8	8,0±2,71	9	9,0±2,86	0,2	>0,05
36 – 38	1	1,0±0,99	2	2,0±1,40	0,4	>0,05
39	1	1,0±0,99	-	-	-	-

Rezultatele statistice obținute denotă că majoritatea femeilor (89% în primul lot și 87% în lotul al doilea) au avut vîrsta cuprinsă între 18-30 ani, fără diferențe semnificative (p>0,05). Conform mediului de reședință, femeile gravide din loturile de studiu s-au repartizat în felul următor: mediul rural – lotul I – 77,0±4,21% și lotul II – 69,0±4,62% (p>0,05) și mediul urban, la fel, fără diferențe semnificative statistice (23,0±4,21% și 31,0±4,62% respectiv, p>0,05).

Rata femeilor căsătorite a fost practic identică în ambele loturi de cercetare (lotul I – $92,0 \pm 2,71\%$ și lotul al II -lea– $90,0 \pm 3,0\%$, $p > 0,05$) (figura 2.1).

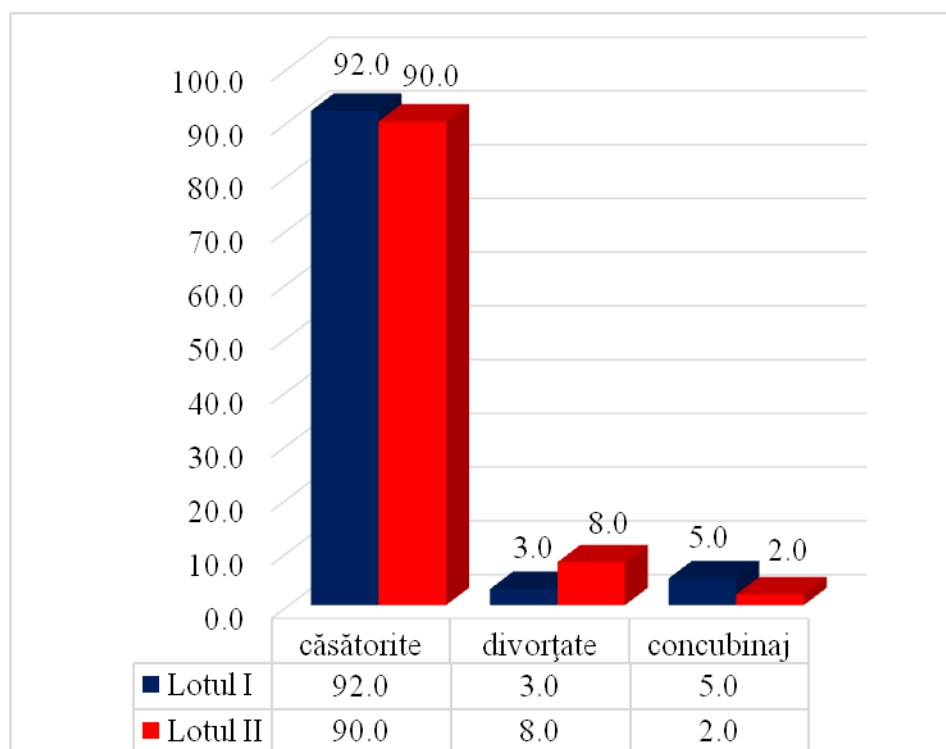


Fig. 2.1. Caracteristicile loturilor de cercetare în funcție de statutul (%).

Numărul mediu de copii în lotul L_1 este de $3,1 \pm 1,17$ copii și în lotul L_0 – $2,9 \pm 0,65$ ($p > 0,05$). Caracteristica femeilor incluse în studiu, în funcție de rangul nașterii copiilor, este redată în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Caracteristica femeilor gravide, în funcție de rangul nașterii.

Rangul nașterii	Lotul L1		Lotul L0		t	p
	Abs.	$P_1 \pm ES_1$ %	Abs.	$P_2 \pm ES_2$ %		
Rangul I	22	$22,0 \pm 4,14$	19	$19,0 \pm 3,92$	0,8	•
Rangul II	52	$52,0 \pm 4,99$	47	$47,0 \pm 4,99$	1,2	•
Rangul III	13	$13,0 \pm 3,36$	33	$33,0 \pm 4,70$	3,4	•••
Rangul IV	3	$3,0 \pm 1,71$	1	$1,0 \pm 0,99$	1,1	•

• $p > 0,05$; ••• $p < 0,01$

Expunerea schematică a derulării primei etape a studiului este redată în Anexa nr.3.

Etapa a II-a de studiu

La etapa a II-a (septembrie 2005 – august 2007) s-a realizat studiul de cohortă de tip 1 pentru a evidenția asocierea cu nivelul și valorile pragurilor 25(OH)D, aplicând formula respectivă:

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times P(1-P)}{(P_0 - P_1)^2} \quad (2.3)$$

unde:

- P_0 – proporția diferitor patologii la copii asociate cu nivelul de 25(OH)D în mediu constituie 29,0% conform formulei ce urmează ($P_0=0,29$).
- P_1 – proporția copiilor în lotul de cercetare. Presupunându-se că rata vor fi de 2 ori mai mare ($P_1=0,58$). $P = (P_0 + P_1)/2=0,315$.
- Z_{α} – valoarea tabelară. Când „ α ” – pragul de semnificație este de 5%, atunci coeficientul $Z_{\alpha}=1.96$.
- Z_{β} – valoarea tabelară. Când „ β ” – puterea statistică a comparației bilaterale este de 10.0%, atunci coeficientul $Z_{\beta}=1,28$.
- f – proporția subiecților care era așteaptă să abandoneze studiului din motive diferite $q = 1/(1-f)$, $f=10,0\%$ (0,1).

Introducând datele în formula am obținut:

$$n = \frac{1}{(1-0.1)} \times \frac{2(1.96+1.28)^2 \times 0.435 \times 0.565}{(0.29-0.58)^2} = 68 \quad (2.4)$$

Pentru acest studiu au fost examinați 320 de copii, conform criteriilor de includere pentru lotul de cercetare L_1 au corespuns 71 de copii, iar 226 s-au atribuit lotului de control și 23 de copii au fost excluși din diverse motive. În studiu de cohortă au fost create două loturi: lotul de cercetare L_1 ce-a inclus 71 de copii spitalizați în secția de pediatrie generală în perioada: septembrie 2005 - aprilie 2006 cu boli acute ale aparatului respirator care, până la survenirea infecției respiratorii date, au fost considerați somatic sănătoși și lotul de control L_0 a inclus 226 de copii somatic sănătoși. Acest studiu s-a efectuat în cadrul Instituției Medico-Sanitare Publice Spitalul Clinic Municipal de copii nr.1 din Chișinău, Institutului Național de Sănătate și Cercetări Științifice în Medicină (INSERM) Unitatea 561 din cadrul Spitalului Saint Vincent de Paul din Paris, laboratorul parazitologic al Centrului Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă al Republicii Moldova (CMȘPMP al RM).

Descrierea socio-demografică a loturilor din a II-a etapă de studiu

A doua parte a lucrării a fost efectuată în perioada septembrie 2005 – august 2007 și a inclus 297 de copii, de diferită vârstă (de la 2,5 ani până la 17,33 ani), care au fost distribuiți în 2 loturi de studiu. Distribuția ambelor loturi, în funcție de sex și vârstă, este redată în tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Distribuția copiilor, în funcție de sex și vârstă.

Sexul și vârsta	Lotul L ₁ , n=71	Lotul L ₀ , n=226	t	p
Numărul total de copii	71	226		
Vârsta medie a copiilor ($X_1 \pm ES_1$)	9,02 $\pm$ 0,33	11,50 $\pm$ 0,75	3,024	...
Fete (total)	33	97		
Vârsta medie a fetelor ($X_2 \pm ES_2$)	9,17 $\pm$ 0,36	11,68 $\pm$ 0,13	6,605	
Extremele de vârstă la fete	2,5 – 15	7,74 – 17,33		
Băieți (total)	38	129		
Vârsta medie a băieților ($m \pm DS$)	8,88 $\pm$ 0,31	11,38 $\pm$ 0,11	7,576	
Extremele de vârstă la băieți	3,33 – 14,10	7,90 – 15,10		

... $p < 0,01$; $p < 0,001$

Descrierea chestionarelor din etapa a II-a de studiu

Copiii din ambele loturi au fost examinați conform metodei clasice de examinare, având la bază un chestionar clinic standardizat (Anexa 4, Chestionarul nr.5) în care se nota adresa, vârsta, sexul, acuzele specifice studiului nostru, modificările sistemului osos și organelor țintă implicate în metabolismul fosfocalcic și al vitaminei D. S-a precizat, dacă copilul era supus tratamentului de lungă durată cu anticonvulsivante sau cu corticosteroizi sau dacă a primit (primea) vitamină D, cantitatea și durata administrării. Greutatea corporală și talia au fost măsurate în valori absolute și în DS și comparate cu curbele de creștere de referință pentru copiii francezi. Măsurările antropometrice erau efectuate de 3 ori în prima jumătate a zilei, fixându-se cifra cea mai înaltă obținută din aceste măsurări consecutive. Designul cercetării este prezentat în figura 2.2.

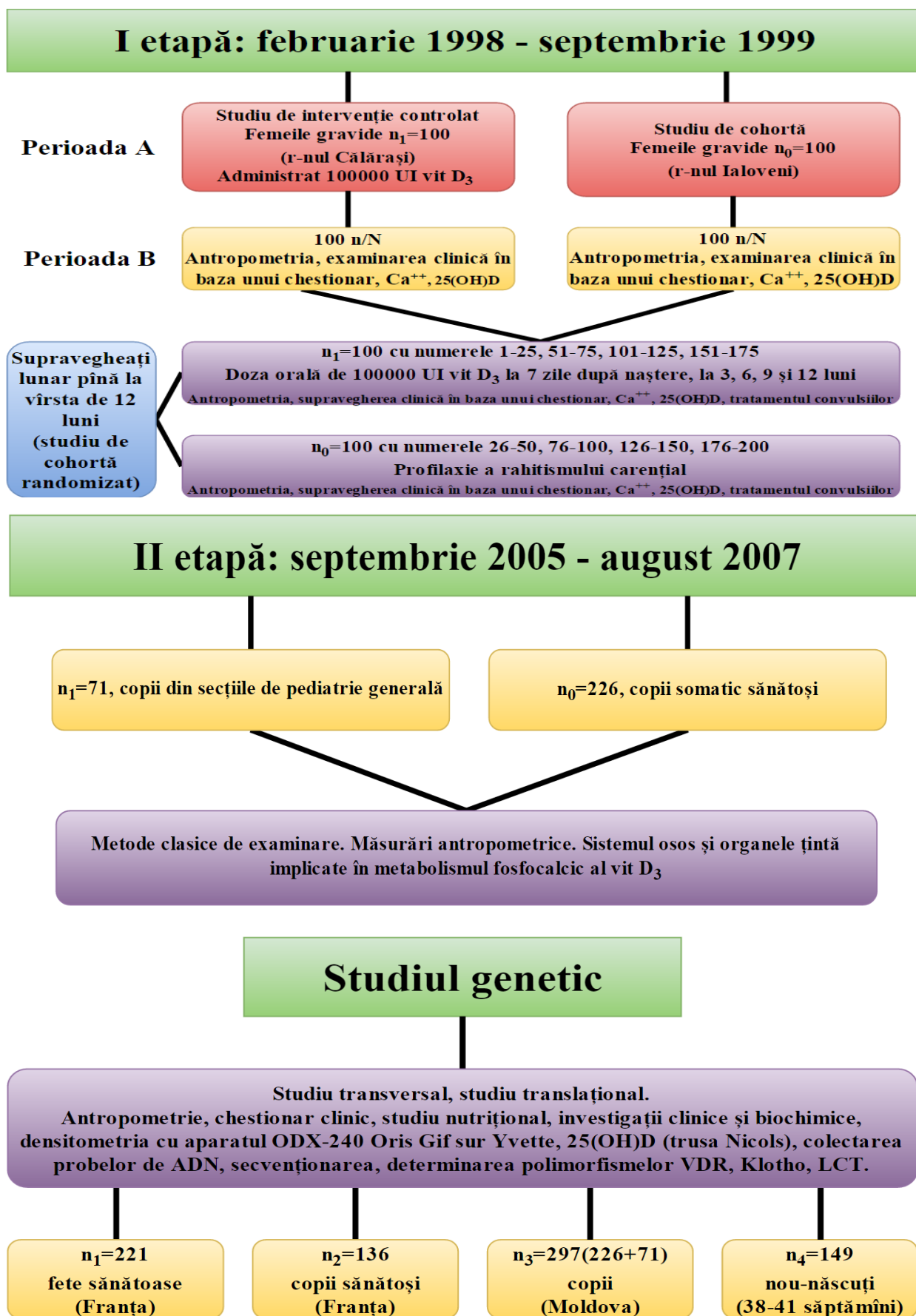


Fig. 2.2. Design-ul cercetării.

2.2. Metodologia de cercetare

Pentru realizarea obiectivelor trasate au fost vehiculate diverse **metode de cercetare**: istorică, clinice, paraclinice, genetice, epidemiologia analitică, matematice și biostatistice.

Parametrii dezvoltării fizice au inclus talia, greutatea corporală, distanța inter-condilară și inter-maleolară, analizând incidența deformărilor osoase ale membrelor inferioare (*genu varum* sau *genu-valgum*). Deformare a gambelor era considerată când distanța inter-condilară sau inter-maleolară depășea 5 cm. Greutatea și înălțimea au fost înregistrate ca valori absolute și ca valori DS pe baza curbelor standard ale Organizației Mondiale a Sănătății.

Analizele serului sanguin au înglobat determinarea nivelului seric al calciului, fosforului, magneziului, glucozei sanguine, proteinei totale, probei cu timol, aminotransferazelor, ureei și creatininei. În a II-a etapă de cercetare, a fost efectuat studiul de secțiune transversală a creșterii, al statutului vitaminei D, metabolismului fosfo-calcic, al invaziilor cu helminți precum și al intoleranței la lactoză asupra copiilor și adolescenților recrutați în studiu.

Markerii metabolismului. A fost cercetată asocierea între 25(OH)D și markerii metabolismului calcic și osos, deformările membrelor inferioare, folosind trei valori de prag (30, 50, 70 nmol/l). În determinarea nivelului 25(OH)D a fost utilizată Schema Internațională de Evaluare Externă a Calității pentru metabolitul vitaminei D (DEQAS). Analizele coproparazitologice ale copiilor și adolescenților din mun. Chișinău și Orhei au fost efectuate în laboratorul parazitologic al Centrului Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă (șef de laborator - A. Colofițchi) prin metode standard de examinare (metoda Kalantarean, Ritci, Brumpt și Rabinovici).

În conformitate cu studiul multicentric internațional, sub egida Ministerului Afacerilor Externe al Franței, un obiectiv esențial a fost calitatea analizelor, corespunderea acestora cu standardele internaționale, iar rezultatele obținute să fie comparate între centrele incluse. Astfel, studiul transversal asupra creșterii și metabolismului calcic și osos la copii de diferite vârste și adolescenți (n=629) cu implicarea factorilor genetici (polimorfismul genei Klotho și VDR) a fost realizat în 4 cohorte:

- **1-a cohortă** – 279 de copii și adolescenți de ambele sexe (4,1 – 17,9 ani) recrutați din Gimnaziul internat din mun. Orhei și Spitalul clinic municipal de copii nr.1 din or. Chișinău, ambele cohorte fiind descrise anterior.
- **a 2-a cohortă** – 136 copii sănătoși examinați la Centrele de sănătate „Bilans de Santé de l’Enfant, CPAM” din Paris, unde a fost efectuată examinarea sistematică fizică și biologică la vârsta de 10 luni sau de 2 ani. Valorile lungimii și greutatea corpului au fost obținute din

carnetul de sănătate al copilului completat la naștere de către medicii neonatologi. În acest studiu au fost efectuate metodele de analiză biochimică, cum ar fi calciul seric, fosforul, activitatea fosfatazei alcaline, raportul creatinina/calciu în urină, determinarea osteocalcinei, IGF-1 seric, PTH și nivelului seric al 25(OH)D.

- **a III-a cohortă** – 221 adolescente cu vârsta cuprinsă între 11 și 17,9 ani, recrutate din liceele și Universitatea din orașul Caen (Normandia de Jos, Franța). Perioada de supraveghere a fost de 4 ani, pentru estimarea creșterii, dezvoltării pubertare și achiziției masei minerale osoase, fiind măsurate talia și masa corporală, calculat indicele masei corporale (IMC). Talia a fost evaluată atât în valori absolute, cât și în DS în comparație cu curbele de creștere de referință pentru copiii din Franța. Partea lombară a coloanei vertebrale (L₂-L₄), densitatea minerală, lungimea vertebrală și lățimea vertebrală s-au măsurat în poziția culcat pe spate (decubitus dorsal) cu vedere anteroposterioară prin DXA, folosind aparatul ODX-240 (Oris, Gif-sur-Yvette). Acest aparat utilizează aceleași dispozitive-hard ca și Sophos L-XRA cu aceleași referințe pentru țesutul moale și cel osos. DMO a părții lombare a coloanei vertebrale a fost evaluată în g/cm² și scorul Z ajustat vârstei și etapei pubertare, folosind curbele interne de referință, ținând cont de etapa pubertară Tanner pentru fetele premenarheale și perioada după menarhă (intervale de 6 luni) pentru celelalte. CMO (g) a fost calculat pe baza DMO a L₂-L₄ și ariei. Vârsta scheletului a fost evaluată la subiecții sub 16 ani prin radiografiile mâinii stângi și articulației, folosind atlasul Greulich și Pyle ca standard, cu o valoare maximă de 17. A fost calculată maturizarea osoasă (vârsta scheletică - vârsta cronologică). Analizele biochimice au inclus calcemia, fosfatemia, activitatea fosfatazei alcaline, osteocalcina, statutul 25(OH)D, hormonul paratiroidian (PTH), factorul de creștere similar insulinei (IGF-1) și raportul de calciu/creatinină urinară în probele de urină colectate la 2 ore după abținerea de la consumarea alimentelor pe timp de noapte, osteocalcina, IGF-1 și PTH au fost analizate, folosind seturile comerciale (Elsa-Osteo, CIS BIO International, Gif-sur-Yvette, Franța, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA; intact PTH Nichols Institute Diagnostics). Serul vitaminei D 25(OH) a fost determinat, utilizând teste de legare a proteinelor cu evaluarea continuă a calității externe a probelor 25(OH)D. Valorile IGF-1 au fost evaluate ca valori absolute, cât și ca DS ajustate vârstei, utilizând curbele interne de referință.
- **a IV-a cohortă** – 149 nou-născuți la termen (38 – 41 săptămâni), de la mame sănătoase în spitalele din Paris și periferiile sale. Talia și greutatea corporală au fost obținute din carnetele de sănătate ale copiilor. Au fost determinați următorii parametri serici ai metabolismului

fosfo-calcic și osos: calciul, fosforul, magneziul, proteinele totale, cretinina. Concentrațiile 25(OH)D serice au fost măsurate în laboratorul SNRS printr-o tehnică radio-competitivă, utilizându-se controalele de calitate externă DEQAS.

Pentru studierea polimorfismelor genei Klotho, au fost testate 4 polimorfisme, utilizând tehnica de genotipag rapid cu Light Cycler LC480 (Roche Diagnostics) bazat pe hibridizarea sondelor fluorescente specific după amplificarea AND cu ajutorul reacției de polimerază în lanț (RPL): G-395A din regiunea promotorului (rs 1207568); F352V din exonul 2 (rs9536314); C1818T/H589H din exonul 4 (rs564481); și C2298T/A749A din exonul 4 (rs 648202). Vârsta la sfârșit de creștere a fost determinată, folosind curbe de creștere în timpul studiului de patru ani. Au fost luate în considerație doar fetele cu viteza de creștere ce-a depășit 2 cm în decursul primilor 2 ani de studiu. Vârsta la sfârșitul creșterii, a fost vârsta, în conformitate cu care viteza de creștere a fost mai mică de 2 cm în decursul următorilor 2 ani.

Aportul alimentar, în cohorta din mun. Orhei a fost efectuată, având la bază meniul săptămânal cu ajutorul tabelului compoziției nutrienților alimentari CIQUAL. Calculul aporturilor ingredientelor alimentare la copiii din SCMC nr.1, au fost efectuate în baza meniului alimentar zilnic pe parcursul unei săptămâni de către asistenta medicală. La subiecții din cohortele franceze, nutriționistul a estimat consumul de alimente, folosind metoda de reamintire a alimentelor consumate timp de 7 zile și a calculat aportul total de calciu de la mesele și gustările combinate, folosind tabelele computerizate franceze de compoziție a produselor alimentare (Bilnut 4.0. S.C.D.A Nutrisoft, 1995). Aportul de proteine, energie, fosfor și magneziu a fost calculat în același fel. Consumul de lapte și produse lactate (iaurt, brânză și alte produse proaspete și preparate) a fost evaluat separat.

Testarea genotipurilor

Genotipul VDR. ADN-ul genomic a fost extras din sânge cu ajutorul seturilor comerciale de extracție (Qiagen, Courtaboeuf, Franța). A fost analizat polimorfismul A-1012-G (rs4516035) superior de exonul 1a în promotorul receptorului vitaminei D uman (hVDRp) prin intermediul curbelor de topire a sondelor de hibridizare fluorescentă în timp real. Primerii specifici PCR (Tib MolBiol, Berlin, Germania) au fost următorii: forward: TTCTATGCCTCAATTTCCCAC; revers: TCTGGAATAGAAATGCTCACAAA. Analiza polimorfismelor a fost efectuată cu ajutorul aparatului the Roche LightCycler LC480 (Roche Diagnostics, Germania), iar datele au fost analizate folosind programul computerizat Light Cycler Software 3.5: pentru rs4516035 10 min denaturare; 40 cicluri la 95°C, 10 s; 50°C, 15 s; 72°C, 15 s. Variațiile în sit-urile polimorfismelor au fost măsurate prin hibridizarea/fuziunea sondelor specifice marcate cu

fluoresceină la capătul 3' pentru sonda sensorie și LightCycler Red 640 la capătul 5' pentru sonda ancoră (LightMix system, TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germania și the Roche Diagnostics, Germania).

Sondele de hibridizare erau următoarele: AGGCGAATAGCAATATATCTTCCCTG-FL și LC-Red 640 CTAAAGGAGGTCATCGACTGACTGCTGGATGA-p.

Fluoresceina emisă de aceste sonde a fost măsurată folosind combinația de filtre 483-640nm prin efectuarea curbei de topire cu puncte specifice de topire pentru tipurile sălbatice și pentru mutanți (65,5°C pentru A și 59,8°C pentru G). Pentru realizarea studiului asupra intoleranței la lactoză, au fost recrutate loturile de copii și adolescenți din mun. Chișinău și or. Orhei care au fost descrise anterior și comparate cu lotul din Caencare. La fel, a fost descris în studiul transversal asupra creșterii și metabolismului calcic și osos la copii de diferite vârste și adolescenți cu implicarea factorilor genetici. Pentru a evalua situația din ambele instituții, a fost elaborat un chestionar special (Anexa 5, Chestionarul 5), care a inclus patru simptome principale. Statutul de 25(OH)D₃ a fost determinată folosind kitul Nicols. În determinarea nivelului 25(OH)D a fost utilizată Schema Internațională de Evaluare Externă a Calității pentru metabolitul vitaminei D. Polimorfismul unei singure nucleotide (SNP) a genei care codifică lactaza-phlorizine hidrolază (LCT, rs4988235 -13910C → T) a fost efectuată folosind genotiparea rapidă tehnica cu ajutorul sondelor fluorescente duale (tib Molbiol, Berlin, Germania), după amplificarea reacției clasice în lanț a polimerazei (RPL), folosind Light Cycler LC 480 (Roche Diagnostics, Franța). Algoritmul determinării standard a nivelului seric al 25(OH)D este redat în figura 2.3.

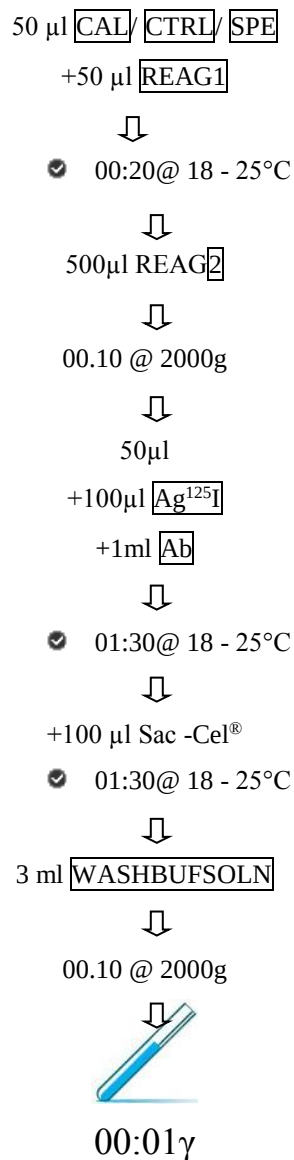


Fig. 2.3. Expunerea schematică a metodei de determinare a nivelului seric al 25(OH)D.

Descrierea haplotipurilor studiate. Grație rezultatelor de laborator din Franța, au fost identificate diferite haplotipuri corespunzătoare polimorfismelor estimate în lume. Astfel, este cunoscută existența a 3 haplotipuri majore regrupate, ce reprezintă 98,9% din totalitatea haplotipurilor posibile întâlnite în această regiune. Determinarea polimorfismului Cdx2 (situat pe sit-ul de legare cu factorul de transcripție intestinală și localizat la – 3700 kb depărtare de sit-ul de transcripție) și a unuia din polimorfismele – 1521 sau 1012 (situate înaintea exonului 1 α a genei VDR) a fost suficientă pentru determinarea haplotipurilor la pacienții noștri (Figura 2.4.).

	Cdx2	-1521	-1021
Hap 1	G	C	G
Hap 2	G	G	A
Hap 3	A	G	A

Fig. 2.4. Expunerea schematică a haplotipurilor.

- Un individ G/G în Cdx2, C/G în -1521 și G/A în -1012 va avea două haplotipuri distincte – Hap 1 și Hap 2 (1,2).
- Un individ G/A în Cdx2, G/G în -1521 și G/A în -1012 va avea două haplotipuri distincte – Hap 1 și Hap 3 (1,3).
- Un individ A/A în Cdx2, G/G în -1521 și A/A în -1012 va avea două haplotipuri identice – Hap 3 (3,3).

Noi am studiat două polimorfisme localizate în -1012 (înainte de exonul 1a) și în sit-ul de legare a Cdx-2 (în exonul 1f) al promotorului de genă VDR (Figura 2.5).

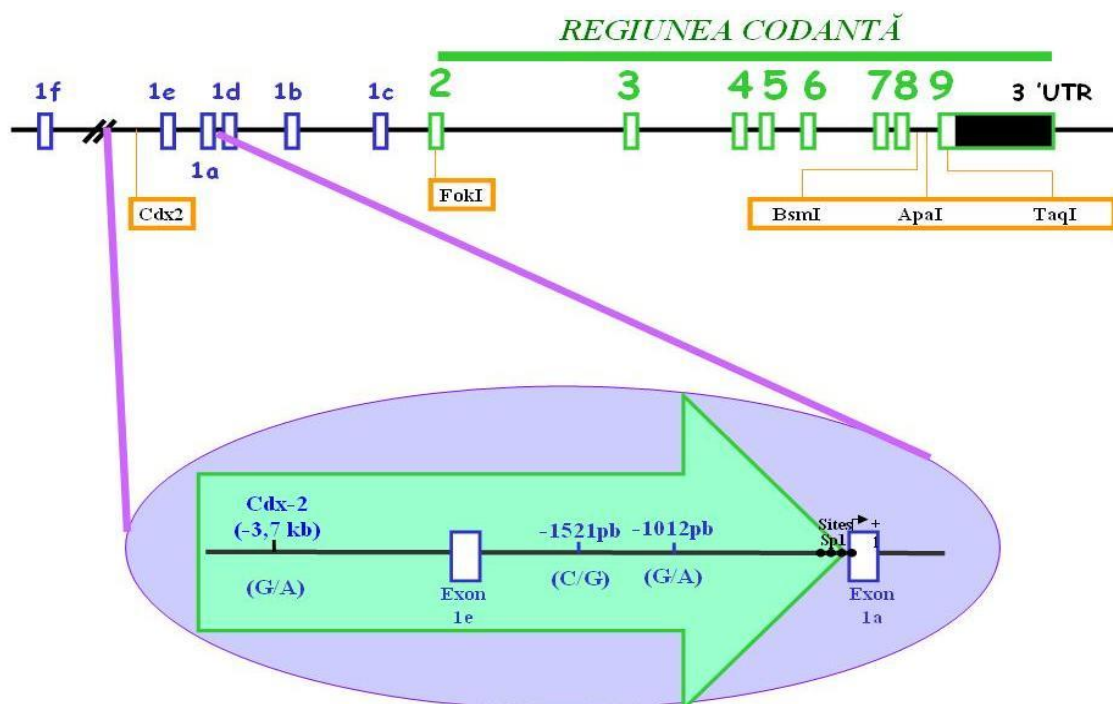


Fig. 2.5. Schema genei receptorului vitaminei D (VDR) la om.

Metodele de acumulare ale datelor primare (descrierea chestionarelor).

Chestionarele elaborate au fost structurate în 3 compartimente (date generale, date clinice și rezultatele investigațiilor), ce-au inclus de la 17 până la 60 întrebări (adresa, sexul, vârsta, greutatea corporală, talia, anamneza, acuzele specifice studiului, au fost evaluate tegumentele,

sistemul locomotor și scheletal, sistemul nervos central și periferic, sistemului respirator, cardiovascular, endocrin, aparatul reno-urinar, s-a notat tratamentul cu anticonvulsivante, glucocorticosteroizi, profilaxia/tratamentul cu vitamina D sau metaboliții săi, testele biochimice (Ca, P, Mg, glicemia, proteina totală, proba cu timol, ALT, AST, urea), examenele maselor fecale după diferite metode, rezultatele investigațiilor instrumentale (ECG, USG organelor interne).

2.3. Metodele de analiză a rezultatelor obținute

Analiza datelor a fost realizată utilizând programele Statistica 6.0 (Statsoft Inc), EXCEL și SPSS 16.0 (SPSS Inc). Prelucrarea statistică ne-a permis calcularea ratelor, valorilor medii, indicatorilor de proporție. Pentru determinarea legăturii dintre unele semne clinice și investigații de laborator a fost utilizat indicatorul de corelație care ne-a permis stabilirea diferitor grade de corelație. Analiza de corelație între variabilele continue s-a efectuat prin determinarea coeficienților de corelație Pearson, și respectiv Spearman. Coeficientul de corelație intermediază între valorile -1 și $+1$. Astfel, valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între ± 1 denotă o corelație foarte puternică între fenomene; $\pm 0,99$ și $\pm 0,70$ denotă o corelație puternică; valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între $\pm 0,69$ și $\pm 0,30$ denotă o corelație medie între fenomene; $\pm 0,0$ și $\pm 0,29$ exprimă existența unei corelații slabe între fenomene; valoarea coeficientului de corelație 0 denotă că legătura dintre fenomene, în mod practic, o considerăm inexistentă. Cele două fenomene evoluează, deci, independent unul de altul.

Pentru determinarea eficacității tratamentului și suplimentarea cu vitamina D a fost aplicat „Tabelul de contingență 2×2 ”, au fost calculați RR (riscul relativ), ÎI (intervalul de încredere), χ^2 (chi-pătrat), NTN (numărul de tratamente necesare), etc.

Tabelul 2.4. Tabelul de contingență 2×2 .

Loturile de studiu	Rezultat		
	da	nu	total
Lotul L_1	a	b	m_1
Lotul L_0	c	d	m_0
TOTAL	n_1	n_0	T

unde:

a = numărul de pacienți din lotul experimental care au rezultatul așteptat;

b = numărul de pacienți din lotul experimental care nu au rezultatul așteptat;

c = numărul de pacienți din lotul martor care au rezultatul așteptat;

d = numărul de pacienți din lotul martor care nu au rezultatul așteptat;

$a + b$ = numărul total de pacienți din lotul experimental (Lotul L_1);
 $c + d$ = numărul total de pacienți din lotul martor (Lotul L_0);
 $a + c$ = numărul total al celor care au rezultatul așteptat;
 $b + d$ = numărul total al celor care nu au rezultatul așteptat;
 $a + b + c + d$ = suma celor patru celule și mărimea eșantionului studiului.

Tabelul 2.5. Aprecierea rezultatelor.

RR	Rezultat
0.0 – 0.3	Factor de protecție puternic
0.4 – 0.5	Factor de protecție moderat
0.6 – 0.9	Factor de protecție redus
1.0 – 1.1	Factor indiferent
1.2 – 1.6	Risc redus
1.7 – 2.5	Risc moderat
>2.5	Risc foarte mare

Toate rezultatele sunt reprezentate în formă de medie $\pm$ DS, diferențele între grupuri au fost evaluate prin analiza unilaterală a variației (ANOVA), folosind programul Staviw 5.0. Valoarea $p < 0,05$ a fost considerată statistic semnificativă.

Diferențele între grupurile de 25(OH)D, sau de genotip au fost evaluate folosind t-testul pereche. Diferențele semnificative între grupurile mai mici de 30 indivizi au fost verificate folosind testul U Mann-Whitney non-parametric.

Compararea prevalențelor între grupuri a fost testată prin testul χ^2 . Pentru a estima prevalența valorilor joase și înalte ale calciului seric, au fost determinate percentilele a 10-a și a 90-a în cohorta fetelor franceze (2,38 mmol/l, respectiv 2,59 mmol/l) și în cohorta totală a copiilor moldoveni (1,81 mmol/l, respectiv 2,66 mmol/l). Pentru a estima prevalența valorilor înalte ale PTH seric, a fost determinată percentila a 90-a în cohorta franceză (43 pg/ml). Toate analizele statistice au fost efectuate cu ajutorul programului computerizat Statview 5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, SUA). În studierea genotipării polimorfismelor nucleotidice unice Klotho la fetele adolescente sănătoase, frecvența alelică a indicat frecvența alelelor majore și minore în fiecare polimorfism. Valoarea p este indicată pentru fiecare polimorfism, folosind ANOVA (vederea 5.0).

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Cercetarea actuală s-a realizat în baza planificării a două tipuri de studii: studiul clinic controlat cu selectarea randomizată a unităților pentru cercetare și studiul de cohortă.
2. Cercetarea s-a efectuat în două etape. La I-a etapă au fost cercetate a câte 100 femei gravide și a câte 100 de nou-născuți repartizați echilibrat în lotul de cercetare L_1 și lotul de control L_0 . La a II-a etapă au fost examenați copiii din lotul de cercetare L_1 ($n=71$) și lotul de control L_0 ($n=226$).
3. Este prezentat algoritmul metodei de determinare a nivelului seric al 25(OH)D, testarea polimorfismelor genetice: polimorfismele genei codante a receptorului pentru vitamina D – Vitamin D receptor (VDR), polimorfismul genei Klotho și polimorfismul -13910 al genei pentru lactază.
4. Rezultatele obținute au fost prelucrate la calculator individual cu ajutorul programelor EXCEL, EPI-Info 2004 și prezentate prin diferite tipuri de tabele, grafice și diagrame.
5. Luînd în considerație obiectivele proiectate și centrate pe realizarea obiectivelor propuse pentru ameliorarea rezultatelor cercetării, au fost aplicate instrumente moderne de prelucrare statistică a datelor obținute. Metoda regresiei logistice a oferit informații referitor la prezența variabilelor care pot gestiona riscul pentru dezvoltarea dereglărilor metabolismului fosfo-calcic și osos în corelație cu valorile pragurilor statutului vitaminei D. Această metodă permite elaborarea modelelor predictive, prognozarea bolii, a rezultatelor posibile ale unei afecțiuni cu consecințele sale, precum și frecvenței cu care se pot dezvolta afecțiunile.

3. STATUTUL VITAMINEI D LA DIFERITE CATEGORII POPULAȚIONALE: FEMEI GRAVIDE, NOU-NĂSCUȚI, SUGARI, COPII DE DIFERITE VÂRSTE ȘI ADOLESCENȚI ÎN CORELAȚIE CU FACTORII ALIMENTARI, GENETICI ȘI AI MEDIULUI ÎNCONJURATOR

3.1. Statutul vitaminei D și impactul său asupra nou-născuților și sugariilor din Republica Moldova

3.1.1. Rezultatele din perioada gravidității și cea neonatală

Grupul ce nu a primit suplimentare cu vitamina D

În urma analizei s-a determinat că nou-născuții din grupul martor au fost la un termen mediu de 39 săptămâni, cu o greutate medie la naștere de $3,24 \pm 0,4$ kg și o suprafață a fontanelei anterioare de $4,1 \pm 3,1$ cm² (tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Datele antropometrice și biochimice la nou-născuții din ambele loturi.

Parametri	Lotul I (de studiu)		Lotul II (martor)		t	p
	Abs.	$X_1 \pm ES_1$	Abs.	$X_0 \pm ES_0$		
<i>Termenul de sarcină (săptămâni)</i>	99	$38,9 \pm 0,11$	95	$39,3 \pm 0,11$	2,5	••
<i>Datele antropometrice la naștere:</i>						
Greutatea (kg)	100	$3,31 \pm 0,048$	99	$3,24 \pm 0,04$	1,2	•
Înălțimea (cm)	100	$51,6 \pm 0,2$	100	$49,97 \pm 0,123$	10,2	•••
Perimetrul cranian (cm)	100	$33,8 \pm 0,14$	99	$34,9 \pm 0,12$	6,1	•••
Suprafața fontanelei anterioare (cm²)	100	$1,48 \pm 0,117$	88	$4,10 \pm 0,33$	7,5	•••
<i>Concentrațiile în sângele din cordonul ombilical</i>						
Calciu (mmol/L)	99		100			
% nou-născuți cu Ca < 1,8 mmol/L*	10%	$2,31 \pm 0,45$	52%	$1,74 \pm 0,068$	7,1	•••
% nou-născuți cu Ca > 2,8 mmol/L*	17%		5%			
25(OH)D (ng/ml)	82		99			
% copiilor cu 25(OH)D < 10 ng/ml (25 nmol/L)	1,2%	$24,9 \pm 9,7$	27%	$13,5 \pm 0,49$	10,7	•••

• $p > 0,05$; •• $p < 0,05$; ••• $p < 0,001$; * compararea incidenței nivelurilor joase și înalte de calciu seric a fost efectuată cu testul χ^2 .

Valorile medii ale calcemiei, determinate din sângele cordonului ombilical, erau diminuate (1,74 mmol/l; 13,7 ng/ml). Mai mult de 1 copil din 4 (27%) din lotul martor aveau concentrații de 25(OH)D sub 10 ng/ml, fiind considerat ca deficit de vitamină D în perioada neonatală [31]. Valori similare au fost depistate în Franța, situată la aceeași latitudine ca și Moldova, la femeile ce au născut la sfârșitul iernii și nu au primit vitamină D în timpul gravidității [31]. În acest grup, nivelul calciului în sângele prelevat din cordonul ombilical era foarte scăzut (în medie 1,74 mmol/l sau 69,6 mg/l). Totodată, nu putem exclude efectul negativ al deficienței de vitamină D asupra acestui indice. Colectarea datelor clinice a fost posibilă la 89 copii în perioada neonatală (tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Hipocalcemia neonatală și datele biochimice la copiii născuți în Ialoveni (media ± ES).

Teste de hipocalcemie neonatală	Absente (n=46)	Prezente (n=43)	Total (n=89)
Calciu seric (mmol/L)	2,11±0,59	1,28±0,44	1,74±0,68
25(OH)D seric (ng/ml)	13,6±0,50	13,7±0,46	13,5±4,9
% de nou-născuți cu 25(OH)D ≤ 10 ng/ml	20,4 %	32,5 %	27 %

* $p > 0,05$

La aproape jumătate din numărul total de nou-născuți examinați (n=43 sau 48%) au fost notate semne neurologice de hipocalcemie și li s-a administrat gluconat de calciu cu sau fără fenobarbital pe parcursul primei zile de viață. Calcemia acestor copii s-a dovedit a fi profund scăzută (1,28 mmol/l în mediu) și semnificativ mai joasă decât la copiii fără manifestări clinice caracteristice unei hipocalcemii (în mediu 2,11 mmol/l). În grupul cu semne de hipocalcemie 32% dintre copii aveau rezerve scăzute de vitamină D (nivelul 25(OH)D în sângele din cordonul ombilical fiind mai mic de 10 ng/ml).

Indicii determinați în lotul de nou-născuți din Călărași (lot de intervenție) au arătat diferențe importante în comparație cu copiii din Ialoveni. Nou-născuții mamelor care au primit vitamină D s-au dovedit a avea:

- o talie mai mare cu 1,7cm, în pofida unei nașteri premature;
- un perimetru cranian redus și o suprafață a fontanelei anterioare mai mică;
- un nivel de 25(OH)D mai înalt, fiind în limitele valorilor normale (10-40 ng/ml) și doar 1 copil din 82 a avut un nivel inferior pragului de jos, sub care se constată o deficiență de vitamină D;
- în sfârșit, valoarea medie a concentrației calciului în sângele omfalic era normală (2,31 mmol/l), fiind, de asemenea, semnificativ mai înaltă decât în grupul din Ialoveni. Totodată,

nu putem exclude faptul că diferențele observate erau parțial determinate de diferențele în metodele de dozare ale calcemiei utilizate, aceste măsurări fiind efectuate în fiecare maternitate.

3.1.2. Rezultatele cercetării la copii în primul an de viață

Follow-up în primul an de viață, în lotul martor

Copii din Ialoveni (n=89) au fost supravegheați pe parcursul primului an de viață, la 44 din aceștia s-a administrat o doză trimestrială de 2,5 mg de vitamină D3 (100 000 UI/ 3 luni sau un aport total de 500 000 UI până la vârsta de un an). La ceilalți copii s-a efectuat profilaxia obișnuită în această unitate medicală: 1500 UI/zi de vitamină D la 11 copii (sau un aport total de 547 500 UI). Specificarea modalității de profilaxie n-a fost posibilă la ceilalți 34 copii.

Din tabelul 3.3 rezidă că semnele clinice neuromusculare care evocă carența vitaminei D au fost observate la 23% dintre copiii care n-au primit un aport definit de vitamină D, în perioada de sugar (1-4 luni):

- manifestări de hipocalcemie - 5 copii;
- semne de hipotonie musculară, craniotabes și semne osoase caracteristice rahitismului în stadiul I sau II - 3 copii;
- fractură de os lung - 1 copil.

Ținem să menționăm, că manifestări clinice carențiale n-au fost semnalate la copiii ce-au primit zilnic sau trimestrial vitamină D.

Datele antropometrice, frecvența afecțiunilor respiratorii de tipul bronșitei și manifestările hematologice nu s-au evidențiat prin diferențe între grupurile cu sau fără suplimentare cu vitamina D (tabelul 3.3). Remarcăm, că aceste rezultate au fost obținute într-un grup populațional, majoritatea copiilor au fost alimentați la sân timp de 9 luni (de la 73% până la 83% din trei subgrupuri de copii). Nicio relație n-a fost determinată între frecvența semnelor de carență de vitamină D și durata alimentației naturale.

Tabelul 3.3. Supravegherea clinică și aportul de vitamina D, la copiii din lotul martor.

Aportul de vit. D	Trimestrial (n=49)	Zilnic (n=11)	Nespecificat sau absent (n=29)
<i>Semne clinice de carență de vitamina D</i>			
Rahitism	0	0	5 (15 %)
Hipocalcemie	0	0	3 (9 %)
Fracturi	0	0	1 (3 %)
Total	0	0	8* (23 %)
<i>Alte semne clinice</i>			
Anemie	10 (23 %)	2 (18 %)	10 (30 %)
Bronșită	8 (18 %)	2 (18 %)	9 (26 %)
<i>Antropometria la vârsta de 1 an</i>			
Masa (kg)	10±1,0	10±0,7	10,5±1,5
Înălțimea (cm)	74,4±2,2	74,4±2,1	74,7±2,2
<i>Durata alimentației la sân</i>			
< 1 lună	2 (5 %)	1 (9 %)	2 (6 %)
1-6 luni	11 (25 %)	1 (9 %)	3 (9 %)
6-9-12 luni	31 (70 %)	9 (82 %)	29 (85 %)

*-un copil avea rahitism și semne clinice de hipocalcemie

Follow-up în primul an de viață, în lotul de cercetare

A fost posibilă supravegherea pe parcursul primului an de viață a 91 de copii din lotul de cercetare, inclusiv 84 copii (95%) care au primit alimentație naturală pe parcursul întregului an de viață (tabelul 3.4). Datele antropometrice au fost similare celor obținute în lotul martor (tabelul 3.3), deci, profilaxia maternă a deficitului de vitamină D a indus intensificarea creșterii intrauterine în lungime (Tabelul 3.1), însă fără impact la vârsta de un an (tabele 3.3 și 3.4).

Prin contrast, în grupul de copii din Călărași, mamele cărora au primit 2,5 mg de vitamină D3 în al II-lea trimestru, doar câte un copil a avut semne clinice de rahitism (1%) și unul simptome clinice de hipocalcemie (1%), 6% au avut anemie și 12% – bronșită. Aceste incidențe sunt toate mai mici decât cele determinate în cohorta din Ialoveni (tabelul 3.4). Acest fapt sugerează că prevenirea deficienței materne a avut o influență de protecție împotriva apariției acestor simptome în timpul primului an de viață. La fel, ca în Ialoveni, au fost individualizate trei grupe de profilaxie cu vitamină D:

- 1) copiii care au primit o doză trimestrială de 2,5 mg de vitamină D3 (100 000 UI/3 luni sau un aport total de 500 000 UI până la vârsta de un an);
- 2) copiii care au primit o variantă de profilaxie zilnică obișnuită;
- 3) copiii pentru care nu a putut fi obținută informație privind profilaxia cu vitamina D.

Ca și în lotul martor, profilaxia cu vitamină D nu a influențat semnificativ asupra parametrilor antropometrici, însă rahitismul și hipocalcemia au fost observate numai la sugarii care nu au primit vitamina D zilnic sau trimestrial. În plus, anemia (17%) și bronșita (41%) au fost mai frecvent întâlnite în lotul de copii la care suplimentarea cu vitamina D a fost absentă sau nespecificată, în comparație cu copiii care au primit doze zilnice sau intermitente de vitamină D (3-10%). Diferențe semnificative nu au fost determinate nici la copiii care au primit doze zilnice sau doze trimestriale de vitamină D.

Astfel, profilaxia postnatală cu vitamina D, fie în doze zilnice sau trimestriale, previne apariția simptomelor clinice ale deficitului de vitamină D în timpul primului an de viață, însă profilaxia maternă n-are rol preventiv, deși apariția simptomelor sunt mai puțin frecvente și mai puțin severe la sugarii născuți de către mamele care au primit suplimentare cu vitamina D. Riscul de dezvoltare a anemiei și bronșitei, de asemenea, pare a fi în corelație cu suplimentarea cu vitamina D, atât înainte cât și după naștere. Într-adevăr, incidența mai mică a acestor boli a fost observată la sugarii născuți de către mamele care au primit suplimentar vitamina D și cărora, postnatal, li s-a administrat vitamina D în mod regulat.

Tabelul 3.4. Supravegherea clinică și aportul de vitamină D, la copiii din lotul de cercetare.

Aportul de vitamina D	Trimestrial (n=41)	Zilnic (n=38)	Nespecificat sau absent (n=12)
<i>Semne clinice de carență de vitamină D</i>			
Rahitism	0	0	1 (8 %)
Hipocalcemie	0	0	1 (8 %)
Fracturi	0	0	0
Total	0	0	2 (16 %)
<i>Alte semne clinice</i>			
Anemie	3 (7 %)	1 (3 %)	2 (17 %)
Bronșită	2 (5 %)	4 (10 %)	5 (41 %)
<i>Antropometria la vârsta de 1 an</i>			
Masa (kg)	11,0±0,2	10,9±0,2	10,8±0,4
Înălțimea (cm)	74.9±1,9	74.0±1,2	74.8±1,2
<i>Durata alimentației la sân</i>			
< 1 lună	0	0	1 (8 %)
1-6 luni	2 (5 %)	3 (8 %)	1 (8 %)
6-9-12 luni	39 (95 %)	35 (92 %)	10 (84 %)

Follow-up la vârsta de 1 an.

De la toți copiii s-a prelevat sânge la vârsta de un an pentru a determina calciu seric, fosfataza alcalină (analize efectuate instituțional) și nivelul de 25(OH)D (analize efectuate la Paris). În grupurile ce administrau vitamina D trimestrial, prelevarea sângelui a fost efectuată înainte de administrarea dozei de vitamină D la vârsta de un an (la vârsta de 9 luni), la 90 copii din lotul de cercetare și 87 copii din lotul de control (tabelul 3.5 și 3.6).

Tabelul 3.5. Testele biochimice la vârsta de 1 an, aportul vit.D n-a fost specificat.

Indicatorul	Lotul ₁ (n=12)	Lotul ₀ (n=29)	t	p
Ca seric, mmol/l (m±1DS)	2,22±0,06	1,89±0,08	2,36	•••
25(OH)D, ng/ml (m±1DS)	33,0±1,9	30,0±0,55	1,52	•

• $p > 0,05$; ••• $p < 0,001$

Tabelul 3.6. Testele biochimice la vârsta de 1 an, aportul vit.D zilnic sau trimestrial.

Indicatorul	Lotul ₁ (n=38)	Lotul ₀ (n=11)	Lotul ₁ (n=41)	Lotul ₀ (n=49)	χ^2	p
Aportul vit.D	Zilnic		Trimestrial			
Ca seric, mmol/l (m±1DS)	2,1±0,1	2,0±0,16	2,14±0,1	2,02±0,06	2.54	•
25(OH)D ng/ml (m±1DS)	33,2±4,9	33,0±4,8	32,0±2,6	53,0±6,29	12.6	•••

• $p > 0,05$; ••• $p < 0,01$.

Tabelul 3.7. Nivelul 25(OH)D la vârsta de 1 an, aportul vit.D n-a fost specificat.

25(OH)D	Lotul L1 (n ₁ =12)	Lotul L0 (n ₀ =29)	RR	95% ÎÎ
≤ 10 ng/ml	0	3	0	-
11-39 ng/ml	7	21	1,03	0,841-1,184
40-79 ng/ml	3	5	2,5	1,235-3,954
≥ 80 ng/ml	2	0	0	-

Tabelul 3.8. Nivelul 25(OH)D la vârsta de 1 an, aportul vit.D trimestrial.

25(OH)D	Lotul L1 (n ₁ =41)	Lotul L0 (n ₀ =49)	RR	95% ÎÎ
≤ 10 ng/ml	2	1	3,5	2,831-4,106
11-39 ng/ml	20	39	1,43	1,101-2,424
40-79 ng/ml	6	9	1,94	0,804-1,109
≥ 80 ng/ml	13	0	0	-

La copiii care au primit o profilaxie „obișnuită”, recomandată de către OMS/UNICEF, nivelul 25(OH)D era în limitele valorilor 10-40 ng/ml, la majoritatea copiilor din ambele loturi, și cu predilecție la cei ce primeau 1500 UI/zi de vitamina D. O heterogenitate mai mare a fost observată la copiii la care aportul vitaminei D n-a fost specificat, 3 (3%) dintre ei având în total în ambele subloturi, un nivel de 25(OH)D sub pragul de jos specificat (10 ng/ml). Tot în acest grup au fost determinate valori mai joase ale calcemiei. În mod contrar, 13 (32%) din valorile 25(OH)D din lotul I, erau mai mari de 80 ng/ml într-o zonă care ar putea fi considerată cu risc de „supraîncărcare” cu vitamina D, chiar dacă în publicațiile ce descriu semnele clinice și biochimice (hipercalcemie, hipercalcieurie) ale intoxicației cu vitamina D se vorbește despre concentrații de 25(OH)D net superioare (>200ng/ml).

La copiii din lotul de cercetare care au primit vitamina D trimestrial valorile 25(OH)D erau în majoritatea cazurilor în limitele normei, iar valorile medii erau comparabile cu cele determinate la copiii cu profilaxie fracționată utilizată în Republica Moldova. Similar, erau comparabile cu valorile medii ale 25(OH)D determinate în același laborator la alți copii ce au primit un aport trimestrial de vitamina D (de exemplu, 27 ± 12 ng/ml la copiii examinați din Algeria) [32]. Nivelul dat era semnificativ mai înalt la copiii din Ialoveni, ceea ce sugerează că copiii au primit doze mai mari comparativ cu cele trimestriale sau au primit concomitent alte medicamente ce conțineau vitamina D. În acest grup 32% dintre copii aveau valori ale 25(OH)D peste 80 ng/ml, nivel care ca și în lotul martor din Ialoveni, ar putea fi considerat cu risc de „supraîncărcare” cu vitamina D, dar nici într-un mod o eventuală hipervitaminoză pentru care nivelurile serice sunt peste 200 – 300 ng/ml.

3.2. Suplimentarea maternă cu vitamină D, calcemia și creșterea pre- și postnatală. Studiu multicentric internațional.

3.2.1. Descrierea studiului

Fiind încadrat într-o echipă pluridisciplinară în cadrul INSERM Unitatea 561, în baza unui proiect de cercetare finanțat de către Ministerul Afacerilor Externe al Franței, am participat într-un studiu multicentric internațional pe grupuri populaționale mamă-copil, rezultatele obținute fiind comparate în ceea ce privește suplimentarea maternă cu vitamină D și impactul ei asupra fătului, împreună cu determinarea statutului vitaminei D matern și fetal. Cohortele studiate au fost selectate din următoarele regiuni:

- orașul Compiègne, Franța (n=200);
- orașele Călărași și Ialoveni, Republica Moldova (n=200);

- orașul Constantine, Republica Democrată Algeriană (n=200);
- Republica Ingușetia (n=20);
- Martinica (n=63).

Distribuția geografică a țărilor are o importanță deosebită, deoarece sinteza endogenă a vitaminei D în stratul epidermal depinde de energia razelor ultraviolete ale spectrului solar, cu o sinteză semnificativă pe parcursul întregului an pe insulele Caraibe, inclusiv Martinica, pe când în alte regiuni examinate în acest studiu sinteza vitaminei D este semnificativă doar în perioada de vară (mai – octombrie) (Figura 3.1).

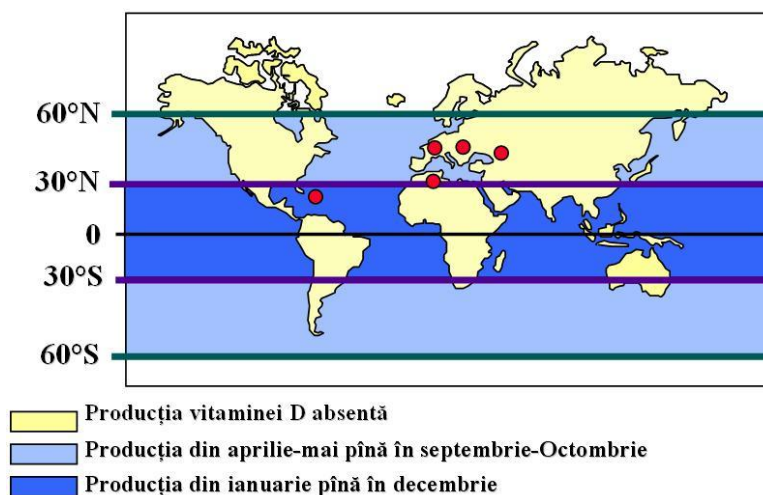


Fig. 3.1. Distribuția geografică a țărilor și sinteza cutanată a vit. D, în funcție de latitudine.

Fiind determinată concentrația serică a 25(OH)D, în momentul nașterii la sfârșitul sezonului de iarnă, la femeile gravide care n-au fost suplimentate cu vitamină D în timpul sarcinii, am constatat că doar în Martinica statutul vitaminei D era satisfăcător și depășea nivelul de 30 ng/ml, în rest, statutul vitaminei D se află sub nivelul de 12 ng/ml, ceea ce denotă faptul că sinteza endogenă a vitaminei D este insuficientă atât în lunile însorite, cât și în cele reci ale anului, justificând o dată în plus necesitatea suplimentării cu vitamină D a femeilor gravide (Figura 3.2).

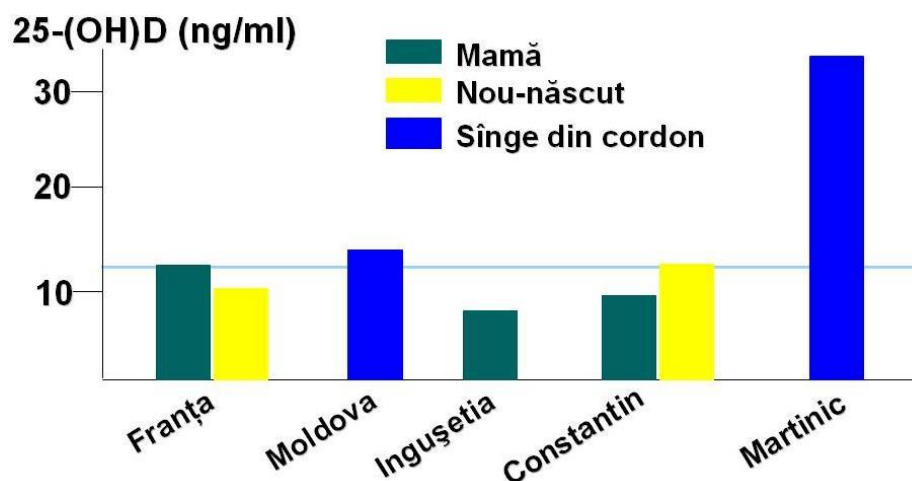


Fig. 3.2. Concentrațiile 25(OH)D la gravidele ce au născut la sfârșitul iernii în absența suplimentării materne cu vitamină D.

Valori mai joase, comparabile cu cele determinate în Ingușetia, au fost înregistrate și în Algeria, deși ea este situată la o latitudine mai joasă (30°N). Chestionarele efectuate în orașul Constantine au evidențiat că nivelurile de 25(OH)D au fost invers asociate cu expunerea la soare și cu numărul de sarcini, sugerând că sarcinile frecvente și alimentările la sân de lungă durată nu au permis repleția rezervelor de vitamină D între gravidități (Figura 3.3).

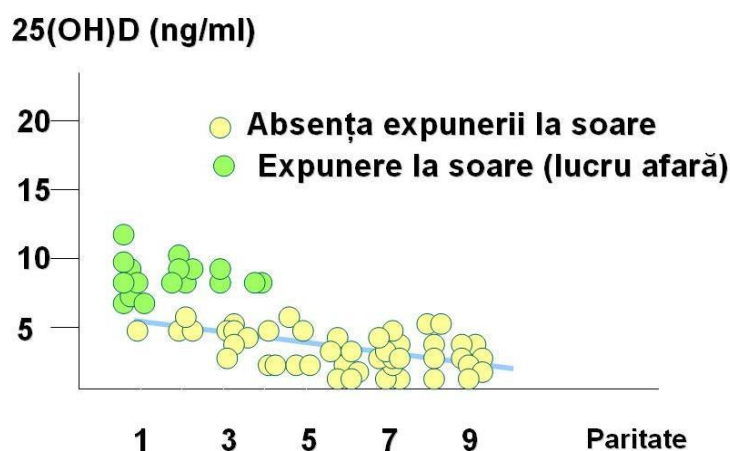


Fig. 3.3. Femeile gravide din Constantine, suplimentate cu vitamină D (la naștere).

În același timp, nivelurile erau semnificativ mai înalte în Martinica, insulă situată la latitudine joasă, unde femeile se expun la acțiunea razelor solare și în pofida pigmentării intense a pielii, care ar putea scădea abilitatea dermei de a produce vitamina D.

Determinarea nivelurilor vitaminei D, calciului și hormonului paratiroidian la 58 nou-născuți francezi, mamele cărora nu au primit vitamină D suplimentar în timpul sarcinii, arată că femeile cu nivelul 25(OH)D mai jos de pragul de 12 ng/ml aveau valori scăzute ale calcemiei și valori înalte ale PTH seric, fapt ce sugerează existența unui hiperparatiroidism secundar, care ar putea agrava resorbția osoasă maternă.

În trei studii dintre cele efectuate (Franța, Moldova, Constantine), datele referitoare la mamele nesuplimentate au fost obținute în cadrul studiului de perspectivă cu control placebo. Al doilea braț al studiului a inclus femeile gravide egalizate după parametri, care au primit 100 000 UI (2,5 mg) de vitamina D într-o singură doză orală la termenul de gestație de 6 luni. Femeile din Constantine, Algeria, au primit 2 doze – la 6 și 8 luni, deoarece studiile preliminare au arătat o deficiență severă a vitaminei D la aceste femei. În cele 3 țări, după suplimentarea cu vitamina D, valorile medii ale 25(OH)D în sângele din cordonul ombilical, la nou-născuți și/sau la mame, erau egale sau mai mari de 20 ng/ml (Figura 3.4) la sfârșitul iernii. Valorile sunt comparabile cu cele obținute la mamele nesuplimentate din Martinica.

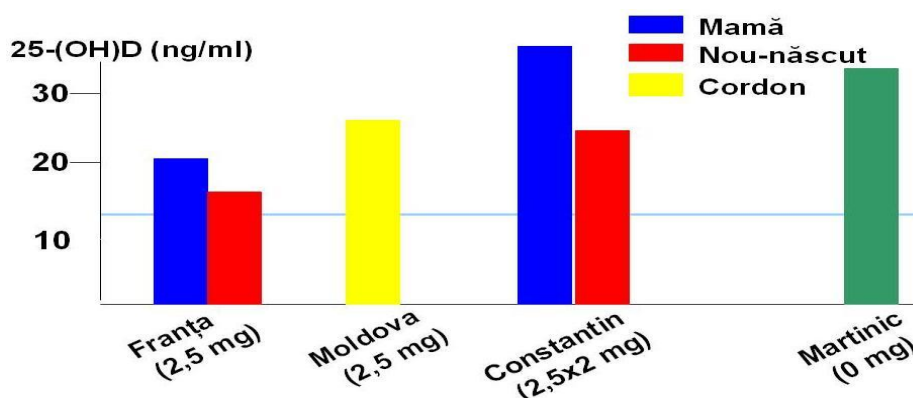


Fig. 3.4. Nivelul de 25(OH)D la naștere, la sfârșitul iernii după suplimentarea maternă cu vit. D.

De menționat, că strategia stoss de profilaxie carențială, cu o doză moderată de vitamina D la femeile gravide și la copii în primul an de viață (administrarea a 2,5 mg de vitamină D₃ la 6 și 7 luni de gestație și în mod trimestrial până la vârsta de 12 luni postnatal), este inclusă în programul național de alimentație al femeilor gravide și al copiilor de toate vârstele în Franța începând cu anul 2001, fapt pozitiv apreciat la nivel național și lipsit de efecte adverse sau caz de hipervitaminoză clinică sau biologică.

Prezentul studiu comparativ al suplimentării femeilor însărcinate cu vitamină D prin aceasta metodă a demonstrat o diferență semnificativă între statutul vitaminei D al femeilor suplimentate la acest termen de gestație și al celor care n-au beneficiat de aceasta suplimentare, în toate cele trei țări. Compararea acestor studii efectuate în Franța, Republica Moldova și Republica Democrată Algeriană evidențiază în toate aceste trei țări o scădere importantă a ratei hipocalcemiei biologice neonatale la sugarii născuți la sfârșitul iernii, în cazul în care mamele lor au primit vitamină D suplimentar (tabelul 3.9).

Tabelul 3.9. Rata nou-născuților cu hipocalcemie în prima săptămână de viață.

Profilaxia carenței materne de vitamina D	NU	DA
Franța (1988-1997)	23%	4%
Moldova (1999-2001)	48%	5%
Algeria (1993-1996)	48%	9%
Martinica (2006)	0%	

Aplicarea strategiei stoss de profilaxie specifică a carenței vitaminei D în a 6 și a 9 lună de gestație la femeile din orașul Constantine, a demonstrat în mod elocvent impactul pozitiv asupra statutului vitaminei D matern și al calciului seric la nou-născuți, față de femeile însărcinate care n-au beneficiat de această profilaxie antenatală (tabelul 3.10).

Tabelul 3.10. Femeile gravide: a 6 și a 9 lună de sarcină (studiul din or. Constantine, n=200).

	Luna a 6-a de sarcină		t	p	Luna a 9-a de sarcină		t	p
	D- X±ES	D+ X±ES			D- X±ES	D+ X±ES		
25-(OH)D (ng/ml)	9,0±0,43	9,8±0,54			7,3±0,51	36,3±1,59		
< 12 ng/ml	87%	77%	1,2	•	88%	12,8%	17,4	
> 40 ng/ml	0%	0%			0%	41%		
Calcemia(mmol/L)	2,04±0,01	2,01±0,02			2,02±0,01	2,26±0,02		
< 2mmol/l	36%	60%	1,4	•	48%	27%	10,9	
> 2,65 mmol/L	0%	0%			0%	6%		

2,5 mg de vitamină D₃ administrată la a 6-a și a 9-a lună de sarcină; • $p > 0,05$; $p < 0,001$

Aceeași situație constatăm și la nou-născuții femeilor suplimentate sau nesuplimentate cu vitamina D în timpul sarcinii la termenul de 6 luni și 9 luni de gestație, nivelul seric al 25(OH)D, calciului și fosfatazei alcaline, fiind semnificativ diferit (tabelul 3.11).

Tabelul 3.11. Nivelul seric de 25(OH)D, calcemia, fosfatemia și fosfataza alcalină la nou-născuții, de la mame suplimentate și nesuplimentate cu vitamina D (studiul din orașul Constantine, n=205)

	D-X±ES	D+X±ES	t	p
25-(0H)D (ng/ml)	11,9±0,72	26,0±1,58	8,1	
< 12 ng/ml	83%	33%		
> 40 ng/ml	0%	23%		
Calcemia (mmol/L)	2,00±0,01	2,29±0,02	13,2	
< 2mmol/L	48%	9%		
> 2,65 mmol/L	0%	5%		
Fosfatemia (mmol/L)	1,68±0,17	1,69±0,01	0,5	•
Fosfataza alcalină (UI/l)	340,0±17,2	163,0±9,2	9,1	

2,5 mg de vitamină D3 administrată la a 6-a și a 9-a lună de sarcină; • p>0,05; p<0,001

Rezultatele obținute ulterior, relevă elocvent diminuarea incidenței rahitismului în orașul Constantine. Acest fapt, însă ar putea fi interpretat ca rezultat al unei supravegheri medicale îmbunătățite sau al ameliorării condițiilor sociale din anul 1985 până în 1995 și nu poate permite afirmarea cu siguranță a impactului suplimentării materne asupra incidenței ulterioare a rahitismului la nou-născut.

Pentru a studia relația între carența maternă a vitaminei D și creșterea fetală, a fost efectuat un studiu similar cu cel din Republica Moldova la 200 nou-născuți, mamele cărora au fost suplimentate sau nu cu vitamină D în timpul sarcinii din orașul Constantine (1993-1996). S-a constatat un impact pozitiv accentuat asupra nou-născuților al acestei profilaxii specifice administrate în a 6-a și a 9-a lună de sarcină (tabelul 3.12).

Tabelul 3.12. Carența vitaminei D și creșterea fetală în or. Constantine (n=200).

Perioada	1993-1994				1995-1996			
Profilaxia carenței de vit. D	NU	DA*	t	p	NU	DA*	t	p
Termenul de sarcină	38,4±0,8	38,8±1,0	0,3	•	38,9±1,1	39,5±1,0	0,4	•
Greutatea (kg)	2,79±0,4	3,44±0,5	1,1	•	2,79±0,4	3,29±0,5	0,8	•
Înălțimea (cm)	49,8±0,4	49,7±0,9	0,1	•	49,3±0,9	50,0±0,6	0,6	•
PC (cm)	34,9±0,1	35,9±1,9	0,5	•	34,6±0,7	35,2±0,6	0,7	•

** 2,5 mg de vitamină D3 la a 6-a și a 9-a lună de sarcină; • p>0,05*

Studiul național sugerează existența unui risc semnificativ de dezvoltare a deficitului de vitamina D la femeile din Republica Moldova care au născut primăvara târziu sau chiar vara. Aceasta ne-a permis să concluzionăm că aportul de 2,5 mg (100 000 UI) de vitamină D la a 6-a lună de sarcină permite normalizarea statutului vitaminei D la nou-născut fără risc de supradozare, cu un impact pozitiv asupra mineralizării bolții craniene și asupra lungimii *in utero*, împreună cu o scădere a incidenței hipocalcemiei în primele zile de viață (tabelul 3.13).

Tabelul 3.13. Carența vitaminei D și creșterea fetală, în Republica Moldova (n=200).

Profilaxia carenței de vitamina D	NU	DA*	t	p
Termenul de sarcină	39,3±0,11	38,9±0,11	2,0	••
Greutatea (kg)	3,2± 0,04	3,3 ± 0,05	1,7	•
Înălțimea (cm)	50 ± 0,1	51,6 ± 0,2	8,0	••••
PC (cm)	35 ± 0,1	34 ± 0,14	5,0	••••
Fontanela anterioară (cm ²)	4,1± 0,31	1,5 ± 0,12	8,7	••••

* 2,5 mg de vitamina D3 în a 6-a și a 8-a lună de sarcină; • $p > 0,05$; •• $p < 0,05$; •••• $p < 0,001$

Datele obținute în cadrul studiului nostru referitor la corelația antropometrie/statut vitamino-calcic la 200 nou-născuți (coeficientul r^2 și F), confirmă existența unei corelații pozitive între nivelurile de 25(OH)D la mame și nou-născuți cu înălțimea, greutatea, IMC și perimetrul cranian (tabelul 3.14).

Tabelul 3.14. Corelația antropometrie/statut vitamino-calcic la 200 nou-născuți (coeficienții r și p).

Indicatori evaluați	Calcemia la mame	Calcemia la nou-născuți	25(OH)D la mame	25(OH)D la nou-născuți
Termen de sarcină	0,22 (0,002)	0,15 (0,040)	0,09 (n.s.)	0,14 (n.s.)
Înălțime	0,18 (0,009)	0,12 (n.s.)	0,35 (0,001)	0,18 (n.s.)
Greutate	0,13 (n.s.)	0,40 (0,001)	0,41 (0,001)	0,27 (0,011)
PC	0,02 (n.s.)	0,27 (0,001)	0,34 (0,001)	0,22 (0,040)
IMC	0,10 (n.s.)	0,39 (0,001)	0,36 (0,001)	0,25 (0,023)
Suprafața corpului	0,16 (0,026)	0,41 (0,001)	0,44 (0,001)	0,29 (0,008)

n.s. – valori p nesemnificative.

3.3. Statutul vitaminei D, consecințele clinice și biologice la copiii și adolescenții din Republica Moldova

Literatura de referință stipulează că, deformările membrelor inferioare atribuite deficienței de vitamină D și/sau de calciu au fost observate și studiate cu predilecție la copiii și adolescenții care locuiesc în Africa, Asia și Orientul Mijlociu [62, 249-255], iar raportarea cazurilor sporadice în Europa, America și Australia, de obicei, se referă la copiii sau descendenții părinților care au imigrat recent în țările regiunilor de mai sus din Asia, Africa sau Orientul Mijlociu [142, 249, 256]. Prevalența acestor schimbări patologice este diminuată la copiii și adolescenții de origine caucaziană [257, 258], însă studiile pot fi insuficiente, iar posibilele intercalări cu aportul de calciu nu au fost luate în considerare, în ciuda dovezilor emergente ale faptului că deficitul de calciu poate reduce pragul sub care statutul vitaminei D devine insuficient pentru a asigura o mineralizare optimă a scheletului în creștere [164, 249].

În cercetarea noastră au fost evaluate deformările membrelor inferioare și markerii biochimici ai metabolismului calciului într-un grup omogen de 226 de copii și adolescenți europeni caucazieni din Republica Moldova, care primesc o dietă pe bază de cereale cu conținut scăzut de lapte/aport înalt de fibre. Totodată, am determinat nivelurile serice ale 25(OH)D utilizând schema internațională externă de evaluare a calității pentru metabolitul vitaminei D (DEQAS), cu scopul de a estima nivelurile optime ale 25(OH)D pentru sănătatea oaselor la copiii de rasă caucaziană cu un aport foarte scăzut de calciu/produse lactate.

3.3.1. Aportul nutrițional

Copiii din Gimnaziul Internat primeau o alimentație conform unui meniu special, diferit, inclusiv în weekend. Ei aveau o dietă bazată pe cereale cu puțin consum de carne, lapte și produse lactate. Aportul alimentar conform meniurilor unei săptămâni din perioada studiului pentru copiii din internat, a fost evaluat în baza tabelului CIQUAL al compoziției nutritive a alimentelor (<http://www.afssa.fr/TableCIQUAL>).

Aporturile medii zilnice au fost proteine totale - 75g ($2,5 \pm 0,4$ g/kg de greutate corporală pe zi pentru copii și $1,8 \pm 0,3$ g/kg greutate corporală pe zi pentru adolescenți), inclusiv proteine de origine animală - 24g; energie - 2842 kcal; fosfați - 921 mg; magneziu - 255 mg. Aportul de calciu pe zi a fost mic (493 mg), inclusiv 69 mg ca lapte și produse lactate. Aportul de vitamină D a fost satisfăcător (2 mg). Informația despre alimentația copiilor din loturile de cercetare este redată în tabelul 3.15.

Tabelul 3.15. Aporturile nutritive medii zilnice în lotul de cercetare și de control.

Parametrii evoluți	Lotul ₀	Lotul ₁	t	p
	X±ES	X±ES		
Proteine totale (copii) pe greutate corporală pe zi (g/kg)	2,5±0,41	2,6±0,12	0.2326	>0.05
Proteine totale (adolescenți) pe greutate corporală pe zi (g/kg)	1,8±0,32	2,3±0,43	0.9259	>0.05
Proteine de origine animală (g)	24.1±0.41	48,6±1.24	18.7023	<0.001
Energie (kcal)	2842.6±46.74	3162.8±52.43	4.5587	<0.001
Fosfați (mg)	0,921 ±0165	1,03±0,22		
Magneziu (mg)	255.9±2.45	273.8±1.12	6.6543	<0.001
Calciu (mg)	493.5±8.47	930.6±12.02	29.7347	<0.001
Inclusive din produse lactate(mg)	69.4±7.66	550.3±14.39	29.5031	<0.001
Vitamină D (mg)	2 ±0,12	2,01±0,05		

Apoturile zilnice ale copiilor din lotul L₁, calculate în funcție de meniul zilnic, au fost proteine totale – 89 g (2,6±0,12 g/kg de greutate corporală pe zi pentru copii și 2,3±0,4 g/kg greutate corporală pe zi pentru adolescenți), inclusiv proteine de origine animalieră 48 g, energie – 3162 kcal, fosfați 1,03 mg, magneziu – 273,8 mg. Aportul de calciu pe zi a fost 930 mg, inclusiv 550 mg ca lapte și produse lactate.

3.3.2. Examinările clinice și datele antropometrice

Lotul de cercetare a inclus 226 de adolescenți. Efectuarea densitometriei osoase nu a fost posibilă, iar radiografia scheletului la copiii din internat nu a fost efectuată din motive etice, însă au fost măsurate distanțele intercondilare (IC) și intermaleolare (IM) în poziție ortostatică, cu atingere reciprocă doar a genunchilor sau a gleznelor: *genu valgum* sau *varum* a fost definit ca distanță IC sau IM >5 cm. Datele despre termenul nașterii, talia și greutatea la naștere au fost obținute din fișele medicale individuale disponibile pentru fiecare copil. Înălțimea și indicele masei corporale (IMC) au fost evaluate atât ca valoare absolută, cât și ca scoruri z, prin comparație cu curbele de referință OMS de creștere cu ajustare după sexul și vârsta copiilor [259]. Au fost evaluate și unele semne clinice, inclusiv prezența durerilor osoase și scoliozei (tabelul 3.16), precum și prin metode coprologice standard a fost determinată prezența

parazitozelor intestinale, în special a *Enterobius vermicularis*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides* și *Trichuris trichiura*.

Tabelul 3.16. Caracteristicile clinice ale celor două cohorte din Moldova ($X \pm ES$ și prevalența).

Lotul	L ₁ (n=226) (Gimnaziul internat)	L ₀ (n=71) (orașul Chișinău)	p
Date generale			
Vârsta (ani)	11,4±1,8	11,1± 2,4	
Prepubertar (%)	52%	46%	
Sexul (% băieți)	57%	52%	
Parametrii la naștere			
Termen (săptămâni)	39,4±0,8	39,2±1,6	
Greutatea la naștere (kg)	3,11±0,42	3,08± 0,56	
Înălțimea (cm)	50,5±2,3	50,4±2,1	
Antropometria			
IMC (scorul z după OMS)	- 0,205±1,041	- 0,471±1,141	
Copii (n)	- 0,325±1,107 (118)	- 0,261±1,228 (33)	
Adolescenți (n)	- 0,440±0,898 (108)	- 0,682±1,023 (38)	
Înălțimea (scorul z după OMS)	- 0,721±1,054	- 0,024±1,051	<0,0001
Copii	- 0,088±0,964	- 0,155±1,101	
Adolescenți	- 1,009±1,126	0,106±1,000	<0,0001
Semne clinice			
<i>Genu varum/valgum</i>	15%	7%	
Scolioză	11%	8%	
Dureri osoase	8%	3%	
Convulsii hipocalcemice	1%	4%	
Afecțiuni dentare	83%	80%	
Carie dentară	10%	11%	
Semne digestive	66%	75%	
Parazitoze intestinale	49%	63%	
<i>Enterobius vermicularis</i>	40%	20%	0,0017
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4 %	14%	0,0104
<i>Trichuris trichiura</i>	2 %	14%	<0,0001
<i>Giardia lamblia</i>	-	15%	
Poliinfestare	3%	-	

Notă : Valorile sunt exprimate ca medie $\pm DS$ sau ca procent de subiecți cu simptome clinice sau parazitoze intestinale în cele două loturi. Comparațiile s-au făcut utilizând testul *t*-student nepereche (valorile medii) sau testul χ^2 (incidență).

Cei 226 de copii din lotul de control și 71 de copii din lotul de cercetare ajustați după vârstă aveau parametrii antropometrici comparabili la naștere și înainte de pubertate (tabelul 3.15). Însă, adolescenții de ambele sexe din lotul L₁ aveau o talie mai mică în comparație cu participanții din lotul de control, precum și conform curbelor de referință de creștere OMS. Cele două cohorte din R. Moldova aveau o sănătate dentară precară și o prevalență crescută a simptomelor gastrointestinale, preponderent multiple, dar în unele cazuri și izolate de greutate (17%) și dureri abdominale izolate (20%). Infestațiile parazitare erau frecvente, cu diferențe semnificative în ceea ce privește paraziții identificați (tabelul 3.15). În ambele loturi, s-a înregistrat o prevalență scăzută a scoliozei și a durerilor osoase (sub 10%), însă *genu varum/genu valgum* au fost înregistrate cu o frecvență mai înaltă la Școala Internat (15%), deși diferența referitoare la incidența observată în cohorta de control (7%) nu a fost semnificativă. Prin comparație cu lotul de control ajustat după vârstă, participanții din Gimnaziul Internat aveau valori mai joase ale calciului, magneziului seric și ale hemoglobinei, și un nivel mediu mai mare al fosfaților în ser (tabelul 3.17). În plus, la copiii din lotul de studiu din internat s-au înregistrat valori mai joase ale creatininei serice înainte de pubertate și o activitate mai înaltă a fosfatazei alcaline în perioada de pubertate comparativ cu grupul de control ajustat după vârstă (tabelul 3.17). Examinarea pentru hepatita B, efectuată cu un an înainte de studiu în Gimnaziul Internat a fost negativă, însă nu putem exclude impactul tranzitoriu asupra ficatului al tratamentului cu mebendazol primit de copii pentru parazitoze cu 2 săptămâni înainte de efectuarea analizei sângelui, complicând astfel interpretarea activității fosfatazei alcaline circulante în această cohortă. Totodată, nu a fost depistată o corelație între activitatea fosfatazei alcaline serice și activitatea aminotransferazelor AST sau ALT nici în lotul de studiu, nici în control înainte sau în timpul pubertății.

Tabelul 3.17. Profilul biochimic al ambelor loturi ($X \pm ES$).

Populația (n)	Lotul de studiu (n=226)	Lotul martor (n=71)	
Copii	118	44	p
Adolescenți	108	37	
Proteina (g/L)	69 $\pm$ 11	69 $\pm$ 8	<0,0001
Hb (g/L)	11,2 $\pm$ 1,1	11,9 $\pm$ 0,4	
Glucosa (mmol/L)	4,2 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 0,7	
Creatinina (μ mol/L)			
copii	41 $\pm$ 12	54 $\pm$ 10	<0,0001
adolescenți	58 $\pm$ 13	60 $\pm$ 11	
Calcium total (mmol/L)	2,14 $\pm$ 0,31	2,29 $\pm$ 0,23	0,0007
Calcium corectat (mmol/L)*	2,22 $\pm$ 0,31	2,36 $\pm$ 0,24	0,0025
Fosfați (mmol/L)	1,36 $\pm$ 0,38	1,22 $\pm$ 0,23	0,0072
Magneziu (mmol/L)	0,70 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,18	<0,0001
FA (UI/L)			
copii	453 $\pm$ 202	407 $\pm$ 123	<0,0001
adolescenți	596 $\pm$ 227	384 $\pm$ 136	
25(OH)D (nmol/L)	44 $\pm$ 16	36 $\pm$ 12	0,0001
25(OH)D (ng/ml)	18 $\pm$ 6	14 $\pm$ 5	0,0001

* Valorile concentrațiilor serice ale calciului total au fost corectate pentru protidemie. Au fost determinate diferențe semnificative între loturile de studiu și martor (testele t-student nepereche și U Mann-Whitney)

3.3.3. Evaluarea statutului vitaminei D și a impactului clinic al acestuia

Rezervele vitaminei D sunt puțin accesibile deoarece sunt localizate preponderent în țesuturile adipoase, ficat și mușchi [28]. Statutul vitaminei D este apreciat în consens mai mult de 30 ani, în baza concentrațiilor circulante ale 25-hidroxivitaminei D care constituie forma de rezervă a vitaminei D. Astfel, vitamina D fiind absorbită în intestin sau produsă de piele, este rapid transformată în ficat în 25(OH)D, apoi în forma sa activă (1,25-dihidroxivitamina D) mai cu seamă în organul țintă – rinichii [28]. Nivelurile circulante ale vitaminei D și ale 1,25(OH)₂D nu reflectă corect rezervele, deoarece primul metabolit se transformă rapid în 25(OH)D, chiar și în cazul administrării unor doze masive de vitamină D, al doilea, odată produs, este supus unui control strict în funcție de necesitățile organismului în calciu și fosfați, având timp de

înjumătățire până la câteva ore. Prin urmare, determinarea concentrației circulante a 25(OH)D constituie cel mai precis indicator biologic în aprecierea statutului vitaminei D, permite stabilirea carenței sau supradozării eventuale a vitaminei D. Durata lungă de viață a 25(OH)D în sânge, permite detectarea vitaminei D peste câteva săptămâni după o singură administrare per os [260-262].

Până în prezent, valorile circulante ale 25(OH)D și, deci, rezervele vitaminei D, au fost apreciate ca valori „satisfăcătoare”, dacă erau situate la o populație adultă în limitele medii ± 1 sau ± 2 deviații standard. Expunerea la soare influențează rezervele vitaminei D, valorile „normale” ale 25-hidroxivitaminei D fiind diferite în funcție de anotimp - vara/toamna sau iarna/primavara, de poziția geografică a țării, precum și de politica sa de îmbogățire a alimentelor cu vitamină D. Implementarea unei profilaxii adaptate a contribuit la reducerea spectaculoasă a incidenței de carență severă a vitaminei D în toate țările occidentale, cu excepția persoanelor în vârstă, studiile clinice fiind centrate asupra efectelor de lungă durată a deficitului moderat. Din aceste considerente, conceptul „*valori normale*” ale 25(OH)D a fost progresiv înlocuit cu termenul de „*valori solicitate*” și cu noțiunea de „prag”, mai jos de care pot surveni modificări patologice de durată medie sau lungă la indivizii aparent sănătoși. De menționat, că în definirea valorii nivelului respectiv se ține cont de consecințele clinice al acestei limite, însă, până în prezent, nu există un consens referitor la acest nivel. Totodată, cu aspect practic, este util de precizat:

- Nivelul de „*carență*” sub care riscul carenței patologice în termen scurt este semnificativ și impune corecție imediată. Multiplele dozări ale 25(OH)D efectuate la nou-născuți, sugari și copiii care prezentau semne clinice de rahitism carențial (deformări scheletice și/sau semne neurologice, ca rezultat al unei hipocalcemii) demonstrează în mod elocvent corelația strânsă a acestor semne cu valorile sub 10-12 ng/ml (25-30 nmol/l) ale 25(OH)D [263];
- Nivelul de „*insuficiență*” a statutului vitaminei D mai sub care apare riscul de dezvoltare a modificărilor pe termen lung și poate implica o profilaxie specifică cu vitamină D. Valorile pragului de „*insuficiență*” variază la diferiți autori de la 20 până la 52 ng/ml (50 – 130 nmol/l). De menționat că, la baza stabilirii acestui nivel, au stat rezultatele studiilor asocierii dintre nivelul 25(OH)D, riscul fracturilor și cel de agravare a pierderilor osoase la femei după vârsta de 55 ani precum și la bărbații după 65 de ani, riscul apariției cancerului, în special de sân și de colon, riscul maladiilor autoimune (mai ales al diabetului) sau a patologiilor cardio-vasculare [39, 43, 78, 84].

Copiii și adolescenții examinați în lotul de control în perioada ianuarie-aprilie au avut o valoare medie $\pm$ DS a 25(OH)D seric de 44 ± 16 nmol/l, respectiv cu o prevalență a valorilor nivelului 25(OH)D ≤ 30 , ≤ 50 și ≤ 75 nmol/l, respectiv egală cu 21, 53 și 26% (tabelul 3.18). Acest statut al vitaminei D era mai înalt decât cel măsurat la copiii și adolescenții din lotul de cercetare, din mun. Chișinău, fie la bloc ($35,6 \pm 1,8$ nmol/l), fie la sol ($37,0 \pm 2,3$ nmol/l). El nu a fost influențat de maturizarea pubertară, însă varia în funcție de sex: fetele din lotul de control aveau valori medii ale 25(OH)D mai mici decât băieții ($40,2 \pm 14,8$ față de $46,5 \pm 16,0$ nmol/l, $p=0,0031$).

Tabelul 3.18. Caracteristicile clinice în lotul de control în funcție de nivelul de 25(OH)D ($X \pm ES$, frecvența)

25(OH)D	≤ 30 nmol/L (n=47)	31-40 nmol/L (n=67)	41-50 nmol/L (n=53)	51-82 nmol/L (n=59)
25(OH)D (nmol/L)	$26,5 \pm 3,5$	$35,6 \pm 2,8$	$45,9 \pm 2,7$	$65,2 \pm 12,0$
25 (OH)D (ng/ml)	$10,6 \pm 1,4$	$14,2 \pm 1,1$	$18,4 \pm 1,1$	$26,0 \pm 4,8$
Vârsta (ani)	$11,8 \pm 1,9$	$11,5 \pm 1,6$	$11,3 \pm 2,0$	$11,2 \pm 1,7$
copii (n)	$9,9 \pm 1,1$ (20)	$10,2 \pm 0,9$ (33)	$9,7 \pm 1,2$ (29)	$10,2 \pm 1,1$ (36)
adolescenți (n)	$13,2 \pm 1,0$ (27)	$12,7 \pm 1,0$ (34)	$13,1 \pm 1,1$ (24)	$12,9 \pm 0,9$ (23)
IMC (scorul z):				
copii	$-0,10 \pm 0,83$	$-0,24 \pm 1,00$	$-0,07 \pm 1,08$	$0,07 \pm 0,88$
adolescenți	$-0,18 \pm 1,04$	$-0,44 \pm 1,30$	$-0,083 \pm 0,95$	$-0,64 \pm 1,05$
Înălțime (scorul z):				
copii	$-0,20 \pm 0,91$	$-0,62 \pm 0,86$	$-0,50 \pm 0,97$	$-0,42 \pm 0,87$
adolescenți	$-0,74 \pm 1,10$	$-1,04 \pm 1,04$	$-0,92 \pm 1,46$	$-1,36 \pm 0,88$
Prevalența:				
Genu valgum	36%	9 % ^{0,0007}	11% ^{0,0042}	7% ^{0,0002}
copii	40%	18%	21%	8%
adolescenți	33%	0%	0%	4%
fete	36%	3%	11%	5%
băieți	37%	11%	11%	7%
Convulsii hipocalcemice	0%	4%	0%	0%
Afecțiuni respiratorii	8%	4%	2%	8%
Dureri osoase	8%	6%	6%	13%
Scolioză	16%	7%	11%	12%
Carie dentară	8%	9%	13%	8%
Afecțiuni dentare	85%	83%	79%	83%
Afecțiuni digestive	71%	64%	68%	46%
Parazitoze	55%	43%	53%	47%

S-au constatat diferențe semnificative în comparație cu valorile prevalenței observate la un nivel seric de 25(OH)D ≤ 30 nmol/L. Au fost aplicate testele statistice χ^2 pentru prevalență și testul t-

student nepereche și teste U Mann-Whitney pentru vârstă și antropometrie. Subgrupurile în funcție de apartenența sexuală și maturizarea pubertară au fost prea mici (mai puțin de 30 de persoane) pentru analize χ^2 de prevalență.

3.3.4. Statutul vitaminei D și deformările osoase ale gambelor

Pentru a evalua asocierile între statutul vitaminei D și caracteristicile clinice sau biochimice participanții din lotul de studiu au fost divizați în baza nivelurilor serice ale 25(OH)D, folosind valorile de prag de ≤ 30 , 31 – 40, și 41 - 50 sî peste 50 nmol/l. La participanții cu valori ale 25(OH)D ≤ 30 nmol/l s-a înregistrat o prevalență ridicată a deformării gambelor (36%), comparativ cu cei cu niveluri 25(OH)D între 31 și 40 nmol/l (9%) și între 41 și 50 nmol/l (11%), sau peste 50 nmol/l (7%).

Prevalența *genu varum/valgum* dependentă de valorile 25(OH)D nu a fost influențată de statutul de pubertate și de apartenența de gen (tabelul 3.18). Prevalența deformărilor gambelor era prea mică în lotul de control (5 copii sau 7% din cohortă) și dimensiunea cohorței era prea mică pentru a permite efectuarea studiilor de asociere, folosind pragurile de 25(OH)D. Totodată, la niciun copil din cei 28 din lotul de control cu nivelul 25(OH)D ≤ 30 nmol/l nu au fost depistate deformări ale membrelor inferioare. Valorile joase ale 25(OH)D (mai mici sau egale cu 30 nmol/l) au fost, de asemenea, asociate cu o activitate mai înaltă a fosfatazei alcaline la copiii din internat de vârstă prepubertară (tabelul 3.19). O astfel de asociere nu a fost depistată în timpul pubertății, valorile fosfatazei alcaline fiind semnificativ înalte în subgrupul de adolescenți din Gimnaziul Internat, indiferent de nivelurile lor de 25(OH)D (tabelul 3.19).

În final, în lotul de studiu nivelurile serice ale 25(OH)D au fost asociate în mod pozitiv cu nivelul de calciu seric ($r=0,202$, $p=0,0024$). La participanții cu valori ale 25(OH)D ≤ 30 nmol/l și chiar la cei cu valori intermediare (30-50 nmol/l) nivelul calciului seric era mai mic decât la cei cu nivelul 25(OH)D > 50 nmol/l (tabelul 3.19). În caz contrar, calciu seric nu a fost asociat cu nivelul de 25(OH)D în cohorta de control, iar participanții din lotul de studiu aveau valori semnificative mai mici ale calciului seric, decât cei din grupul de control, atunci când nivelul lor de 25(OH)D a fost ≤ 30 nmol/l ($2,15 \pm 0,28$ față de $2,41 \pm 0,16$ mmol/l, $P < 0,0001$), însă nu în cazul când valorile 25(OH)D au fost mai mari de 50 nmol/l ($2,32 \pm 0,35$ față de $2,50 \pm 0,12$ mmol/l).

Tabelul 3.19. Indicii biochimici în funcție de nivelul 25(OH)D în lotul de control ($X \pm ES$).

25(OH)D (nmol/L)	≤ 30 nmol/L (n=47)	31-40 nmol/L (n=67)	41-50 nmol/L (n=53)	51-82 nmol/L (n=59)
Proteina (g/l)	70 $\pm$ 10	67 $\pm$ 10	71 $\pm$ 10	69 $\pm$ 12
Hb (g/l)	11,0 $\pm$ 1,1	11,4 $\pm$ 1,0	11,4 $\pm$ 1,0	11,2 $\pm$ 1,1
Glucosa (mmol/L)	4,2 $\pm$ 0,8	4,0 $\pm$ 0,8	4,2 $\pm$ 0,8	4,2 $\pm$ 0,8
Creatinina (μmol/L)				
Copii (n)	44 $\pm$ 14 (20)	40 $\pm$ 12 (33)	41 $\pm$ 12 (29)	41 $\pm$ 9 (36)
Adolescenți (n)	60 $\pm$ 14 (27)	56 $\pm$ 13 (34)	59 $\pm$ 12 (24)	61 $\pm$ 14 (23)
Calciu total (mmol/L)	2,10 $\pm$ 0,26 ^{0,0205}	2,12 $\pm$ 0,30 ^{0,0340}	2,11 $\pm$ 0,33 ^{0,0259}	2,24 $\pm$ 0,32
Calciu corijat(mmol/L)	2,15 $\pm$ 0,28 ^{0,0083}	2,22 $\pm$ 0,31	2,16 $\pm$ 0,35 ^{0,0100}	2,32 $\pm$ 0,35
Fosfați (mmol/L)	1,33 $\pm$ 0,34	1,35 $\pm$ 0,41	1,37 $\pm$ 0,38	1,39 $\pm$ 0,37
Magneziu (mmol/L)	0,70 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,12	0,71 $\pm$ 0,14	0,72 $\pm$ 0,15
FA (UI/l)				
Copii	534 $\pm$ 148 ^{0,0138}	439 $\pm$ 231	432 $\pm$ 187	437 $\pm$ 211
Adolescenți	596 $\pm$ 228	593 $\pm$ 219	633 $\pm$ 244	573 $\pm$ 228

Sunt observate valori semnificativ diferite de cele observate în caz de valori ale 25(OH)D mai mari de 50 nmol/l (utilizând testul *t*-student în perechi și nepereche și testele *U* Mann-Whitney).

Referindu-ne la unele discuții asupra acestui subiect, putem spune că deformările moderate în arc ale oaselor gambelor pot fi considerate fiziologice la copiii mici - la o vârstă <2-5 ani la început o deformare tip varus, urmată de o angulare valgus la nivelul articulației genunchilor [264]. Însă, această caracteristică este tranzitorie la copiii de rasă caucaziană din America de Nord [257], Nigeria [265] și Asia [266, 267], deformările fiind considerate patologice după vârsta de 7-8 ani. Într-un studiu efectuat de Heath C. et al., 2,5% copii albi din America de Nord cu vârsta de la 6 luni până la 11 ani aveau o deformare valgum a gambelor cu distanța IM mai mare de 8 cm [257]. Un studiu european asemănător efectuat într-o cohortă de 427 de adolescenți cu vârsta cuprinsă între 10-16 ani aveau o medie a distanței IM egală cu 0-2 cm, cu o prevalență mai mică de 2,5% a distanței IC mai mari de 4-5cm și a celei IM mai mari de 4 cm la băieți și 8cm la fete [258]. Rezultatele acestor studii contravin rezultatelor noastre care

au arătat o prevalență înaltă (15%) a deformărilor *genu varum/genu valgum* (distanța IC sau IM mai mare de 5cm) într-o cohortă omogenă de 226 de copii și adolescenți de rasă caucaziană care locuiesc într-o școală internat din Moldova.

Deformările oaselor gambelor în arc pot fi rezultatul unor maladii rare, cum ar fi rahitismul ereditar, osteogeneza imperfectă sau acondroplazia, însă cel mai frecvent patogeneza lor este multifactorială, care implică, eventual, unii factori genetici și mai mulți factori ai mediului înconjurător, care sunt adesea asociați: pigmentarea intensă a pielii, expunerea insuficientă la soare, poluarea atmosferică, conținutul ridicat de fluor din apa potabilă, aportul scăzut de lapte și produse lactate și/sau deficitul de calciu și consumul înalt de fibre alimentare și/sau scăzut de carne [62, 249-251, 253-255].

Nivelul diminuat al vitaminei D a contribuit, probabil, la geneza deformărilor membrelor inferioare în cohorta noastră, având în vedere că gambe în *varum* sau *valgum* au fost observate la 36% dintre participanții din Gimnaziul Internat examinați în perioada de iarnă-primăvară, cu nivelul $25(\text{OH})\text{D} \leq 30 \text{ nmol/l}$, indiferent de sexul sau maturizarea pubertară a acestora, doar la 9% dintre cei cu nivelul $25(\text{OH})\text{D}$ intermediar de 30-50 nmol/l și la 7% dintre cei cu un nivel mai înalt de $25(\text{OH})\text{D}$.

Statutul vitaminei D, de asemenea, a fost asociat cu markerii metabolismului calciului și osos, și anume, cu calciu seric și activitatea fosfatazei alcaline. La copii, la vârsta prepubertară, cu valori ale $25(\text{OH})\text{D} \leq 30 \text{ nmol/l}$, a fost înregistrată o activitate crescută a fosfatazei alcaline, fără o creștere simultană a activității aminotransferazelor, sugerând, astfel, existența rahitismului, chiar dacă acest lucru nu a putut fi confirmat, deoarece radiografia scheletului nu a fost efectuată din motive etice. La adolescenții din Gimnaziul Internat o astfel de asociere nu a fost observată, însă trebuie marcat faptul că activitatea fosfatazei alcaline serice la ei, indiferent de nivelul $25(\text{OH})\text{D}$, era în limitele caracteristice pentru copiii de vârstă prepubertară, adică valorile ei erau mai înalte decât cele înregistrate în lotul de control ajustat după vârstă. Lipsa asocierii cu activitatea aminotransferazelor sugerează că activitatea înaltă a fosfatazei alcaline depistată la copiii din lotul de studiu, în perioada pubertății, reflectă un turnover crescut al țesutului osos al lor, posibil, din cauza deficienței de calciu. Însă, determinarea PTH, markerilor de resorbție și/sau efectuarea densitometriei osoase sunt, în mod evident, necesare pentru a testa această ipoteză.

În cele din urmă, nivelul $25(\text{OH})\text{D}$ a fost pozitiv asociat cu nivelul calciului seric, cu valori optime ale $25(\text{OH})\text{D}$ mai mari de 50 nmol/l. Nu a fost stabilită nicio asociere a nivelului vitaminei D cu simptomele clinice calciu-dependente, în special cu cele hipocalcemice, probabil

din cauză că participanții din lotul de studiu erau la o vârstă mai mare și/sau din cauză că nivelul lor de hipocalcemie și deficit de vitamină D erau moderate, comparativ cu cazurile raportate anterior în literatură [256, 268]. Statutul vitaminei D variază în funcție de sezon în țările cu climă temperată, fiind mai mic în timpul iernii-primăverii, când energia ultravioletă din spectrul solar devine insuficientă pentru producerea vitaminei D în piele. Studiul de asociere în cauză demască un risc posibil mai înalt de dezvoltare al unui statut insuficient al vitaminei D la fete și demonstrează că un nivel scăzut al 25(OH)D, fie numai în perioada de iarnă-primăvară, agravează în mod clar prevalența deformărilor membrelor inferioare și a nivelului scăzut al calciului în ser la copiii și adolescenții de origine europeană. În același timp, nivelul scăzut al vitaminei D nu este singurul determinant al prevalenței înalte a deformărilor membrelor inferioare și al valorilor joase ale calciului seric observate în Gimnaziul Internat. În primul rând, copiii și adolescenții din lotul de studiu care trăiesc într-un mediu rural au avut un statut al vitaminei D mai mare în perioada ianuarie-aprilie, decât copiii din grupul de control care locuiau în orașul Chișinău. În al doilea rând, incidența de 22% a valorilor 25(OH)D ≤ 30 nmol/l, înregistrată în perioada iarnă-primăvară în Școala Internat a fost comparabilă cu cea raportată în alte țări europene (17-35%), situate la latitudini similare (46° - 51°N), și anume în Franța, Germania și Elveția [164, 269, 270].

În al treilea rând, prevalența deformărilor membrelor inferioare la copiii din internatul din Orhei care aveau valori ale 25(OH)D ≤ 30 nmol/l era semnificativ mai înaltă (36 față de 0%), iar nivelurile calciului seric erau semnificativ mai joase decât în lotul de control cu un statut similar al 25(OH)D (tabelul 3.20).

Tabelul 3.20. Nivelul 25(OH)D circulante în loturile de cercetare.

	Lotul de cercetare			Lotul de control		
25(OH)D (nmol/l)	<30	30-50	51 >	<30	35-50	51 >
25(OH)D (ng/ml)	<12	12-20	21 >	<12	14-20	21 >
media 25(OH)D (ng/ml)	10,7 $\pm$ 0,3	15,5 $\pm$ 0,4	23,1 $\pm$ 0,8	11,1 $\pm$ 0,3	16,3 $\pm$ 0,3	26,6 $\pm$ 1,4

Dereglările digestive sau infestațiile parazitare, posibil, au agravat riscul de dezvoltare al deformărilor membrelor inferioare, însă prevalența lor similară în ambele cohorte nu poate explica anomaliile observate în Gimnaziul Internat. Intoxicația cu fluoride nu a fost evaluată, însă nu poate fi exclusă ca factor determinant suplimentar, după cum sugerează studiile din literatură despre copiii cu deformări osoase similare celor rahitismale din regiunile cu fluoroză endemică [249, 250, 253] și studiile observaționale efectuate în unele raioane ale Republicii Moldova cu

conținut înalt de fluor în apa potabilă [271]. Un rol major, însă, a avut, probabil, dieta bazată pe cereale cu acces limitat la produsele din carne, lapte, produse lactate – o dietă neobișnuită pentru copiii din Republica Moldova, inclusiv pentru cei din lotul de control din regiunea urbană, care teoretic primesc un aport adecvat de calciu/lapte [272, 273]. În concordanță cu această ipoteză, este faptul că aportul scăzut de calciu/lapte a fost asociat cu rahitism, chiar și în lipsa unui deficit sever de vitamină D în unele regiuni din Nigeria și Bangladesh [62, 249], iar consumul scăzut de carne și înalt de fibre alimentare a fost asociat cu un risc relativ crescut de rahitism și osteomalacie în Regatul Unit [274].

3.3.5. Helminthiazele, statutul vitaminei D, parametrii antropometrici, biochimici și manifestările clinice

Comparând frecvența helmintiazelor din ambele cohorte, am constatat o frecvență echivalentă (60% în lotul de cercetare și 52% în lotul de control), deși ponderea acestora diferă în funcție de parazitul depistat (tabelul 3.21). S-a constatat că, ascaridioza, trihocefaloza și giardiaza au predominat la copii din Chișinău, însă giardiaza se întâlnește mai des în colectivități, internate etc., iar enterobioza a dominat la copii de la Orhei (tabelul 3.21). N-am conturat nici o asociere între nivelul 25(OH)D și prezența sau absența parazitozelor intestinale sau tipul de parazitoză la ei.

Tabelul 3.21. Frecvența parazitozelor în loturile de cercetare.

Tipul parazitoei	Nivelul 25(OH)D											
	<30				30-50				51 >			
	Lotul de cercetare n=37	Lotul de control n=46	t	p	Lotul de cercetare n=25	Lotul de control n=112	t	p	Lotul de cercetare n=9	Lotul de control n=68	t	p
	P±ES, %	P±ES, %			P±ES, %	P±ES, %			P±ES, %	P±ES, %		
1.Ascaridoza	10,0±2,91	43,0±3,25	7,5	••	6,0±2,31	5,0±1,43	0,4	•	6,0±2,31	3,0±1,12	1,2	•
2.Enterobioza	24,0±4,15	44,0±3,26	3,8	••	43,0±4,8 1	38,0±3,19	0,9	•	29,0±4,41	40,0±3,22	2,0	••
3.Giardiaza	15,0±3,47	-	4,3	••	-	-			18,0±3,73	-	4,8	••
4.Trihocefaloza	12,0±3,16	4,0±1,29	2,4	••	1,0±0,97	1,0±0,65	0	•	12,0±3,16	1,0±0,65	3,4	••

• $p > 0,05$; •• $p < 0,05$; ••• $p < 0,001$

Totodată, efectuând o analiză mai amplă a posibilei asocieri între infestația cu paraziți intestinali și statutul vitaminei D, precum și nivelul calciului, magneziului seric și al activității fosfatazei alcaline, am observat o diferență semnificativă a unor indici biochimici (tabelul 3.22).

Tabelul 3.22. Statutul vitaminei D și metabolismul calciului în relație cu parazitozile intestinale.

Parazitoza	Vârsta, ani	Calciu corijat, mmol/l	Fosfați, mmol/l	Magneziu, mmol/l	Fosfataza alcalină, UI/l	25(OH)D, ng/ml
Absentă (161)	10,8±2,9	2,25±0,31	1,33±0,34	0,74±0,16	506±208	18,5±6,3 (86)
Enterobioza (114)	10,6±2,4	2,21±0,35	1,32±0,38	0,71±0,15	497±221	18,0±5,3 (70)
Ascaridoza (19)	11,1±2,2	2,39±0,25	1,37±0,25	0,71±0,12	471±257	16,1±6,5 (9)
Trichuroza (18)	11,1±3,3	2,31±0,27	1,26±0,20	0,75±0,16	458±146	15,1±4,2 (13)
Giardiaza (13)	10,4±4,0	2,51±0,15 (0,007)	1,32±0,18	0,94±0,23 (p<0,0001)	390±128	15,0±8,0 (6)
Poliinvazie (7)	11,5±2,0	2,23±0,32	1,34±0,49	0,77±0,11	376±165	18,0±4,7 (4)

Valorile reprezintă media±ES. Determinarea nivelului de 25(OH)D nu a fost posibilă la toți copiii. Numărul de probe la care s-a determinat 25(OH)D este notat în paranteze. Valorile cu diferență semnificativă de cele observate la copiii neinfestați sunt notate prin indicarea valorii p.

Tabelul 3.23. Date antropometrice și teste biochimice, în funcție de infestația cu parazitozile intestinale (X±ES).

	Masa (X±ES)	Talia (X±ES)	IMC (kg/m ²)	Proteina (X±ES)	Glucoza (X±ES)	Creatinina (X±ES)	Hb (X±ES)
Lipsa parazitoei (n=161)	-0,12±1,16	-0,12±1,34	16,9±2,4	69,2±9,5	4,17±0,87	54,2±14,2	118,2±9,0
Enterobioza (n=114)	-0,09±1,13	-0,30±1,28	17,1±2,2	69,2±11,3	4,33±0,79	46,1±13,1 (p<0,0001)	111,8±9,1 (p<0,0001)
Ascaridioza (n=19)	0,00±1,24	0,26±1,35	17,2±2,8	66,4±8,6	4,32±0,66	54,2±15,5	108,6±10,8 (p<0,0001)
Trichuroza (n=18)	-0,09±1,32	0,54±1,09 (p=0,04)	16,6±2,6	69,6±8,4	4,04±0,85	56,5±11,6	113,6±13,6 (p=0,047)
Giardiaza (n=13)	-0,46±1,27	0,18±1,22	16,7±2,6	72,3±6,8	4,28±0,67	61,1±12,3	117,5±2,5
Poliinvazie (n=7)	-0,21±1,44	-1,18±1,17 (p=0,036)	18,1±2,1	68,4±10,2	4,29±0,77	47,1±8,6	105,1±7,7 (p=0,0003)

Valorile indicate în medie±ES. Valorile semnificativ diferite de cele depistate la copiii neinfestați sunt notate (testul ANOVA).

Parazitozele intestinale nu influențează masa corporală, talia sau IMC (tabelul 3.22). Șapte copii cu poliinvazie aveau o înălțime mai mică, dar numărul lor a fost prea mic pentru a valida datele. În contrast, concentrații mai mici ale hemoglobinei au fost determinate la copiii cu toate tipurile de parazitoze, cu excepția giardiozei. Celelalte teste biochimice n-au semnalat diferențe statistice, cu mici excepții:

- valori mai joase ale creatininei au fost înregistrate la copiii cu enterobioză;
- valori mai înalte ale calciului și magneziului au fost evidențiate la 13 copii infestați cu giardia.

Aceste constatări rămân inexplicabile și ar necesita studii suplimentare pentru confirmare. La copiii cu parazitoze, indiferent de tipul acesteia, au predominat manifestările digestive (tabelul 3.24). Însă, frecvența afecțiunilor pulmonare, hepatobiliare, dentare și a deformărilor osoase nu a fost influențată de prezența sau absența parazitozelor intestinale.

Tabelul 3.24. Prevalența manifestărilor digestive și a altor semne clinice, în funcție de prezența parazitozelor intestinale.

	Absent	Enterobioză	Ascaridoză	Trihiuroză	Giardioză	Poliinvazie
	n=172	n=118	n=21	n=20	n=14	n=7
Semne digestive						
Grețuri	21 (12%)	10 (8%)	0	4	0	0
Dureri	24 (14%)	9 (8%)	1	1	0	1
Câteva semne	25 (14%)	89 (76%)	18	14	14	6
Hepatice	8 (5%)	7 (6%)	2	0	0	0
Respiratorii	56 (32%)	29 (24%)	12	16	14	0
Alterații dentare	125 (73%)	103 (87%)	18	18	14	7
Deformări osoase	67 (39%)	53 (45%)	14	9	4	4

Procentul de copii a fost calculat în populațiile de peste 100 de persoane (copii infestați și neinfestați cu enterobioză).

În pofida, ponderei avansate la nivel mondial a infestațiilor parazitare, puține cercetări sunt consacrate interrelației dintre statutul vitaminei D și parazitozele intestinale, inclusiv și în Republica Moldova. Totuși, un studiu [40] efectuat într-o școală din zona rurală din Mexico asupra unui eșantion de 284 copii ($8 \pm 1,6$ ani), cercetând impactul unei invazii cu *Ascaris lumbricoides* și *E. colli* asupra statutului micronutrițional prin metode rapide de diagnostic, a

stabilit că 20% din elevii implicați în studiu dat erau infectați cu *E. coli* și 16% cu *Ascaris lumbricoides*. Frecvența deficienței în vitamina D a fost de 28% și de zinc 18%. Probabil că condițiile sanitar-igienice precare în care locuiesc copiii din metropola dată a făcut să se depisteze o astfel de prevalență. În una din publicațiile relativ recente [41], se menționează că deficitul de vitamin D are o prevalență înaltă printre elevi în toată lumea. Efectele deficienței include alterarea răspunsului imun și creșterea riscului la diferite infecții, evidența cărora este joasă sau absentă [1].

Conform unor studii de anvergură efectuate în Panama, s-a scos în evidență o digestie scăzută a lactozei și a intoleranței la glucide la copiii de vârstă preșcolară infestați cu *Ascaris lumbricoides*, care duc la rândul lor, la accelerarea tranzitului intestinal [42] și probabil la o absorbție mai scăzută a vitaminei D și calciului, care în viziunea noastră, a contribuit la asimilarea defectuoasă a micronutrienților la copiii din ambele loturi implicați în studiul nostru cu compromiterea biodisponibilității calciului din dieta și așa săracă în lapte/produse lactate și bogată în fibre cu preponderență la copiii lotul de cercetare și lotul de control.

Unii autori, menționează că în caz de giardiază, cu afectarea intestinului subțire, paraziții lezează enterociții, cauzând malabsorbție, inclusiv și a vitaminei D. S-ar putea de presupus că una din cauzele anemiilor la copiii incluși în studiul nostru din ambele loturi, ar putea fi și carența în vitamina D. Unii autori înaintează ipoteză precum că carența de fier cauzează malabsorbția grăsimilor și vitaminei D ca moleculă liposolubilă în caz de giardiază, sau invers, inducția anemiei ca consecință a proceselor inflamatorii intense din intestin și mielofibrozei măduvei osoase asociate deficitului de vitamina D [43, 44]. Rezultatele obținute impun o confruntare analitică cu cele raportate în diferite colțuri ale lumii, pentru a încerca de a găsi o explicație a ponderii foarte înalte a anemiilor, carenței de micronutrienți, inclusiv și a vitaminei D.

În literatura de specialitate se relatează că în caz de giardiază, malabsorbția intestinală este prezentă în 90% de cazuri la copil și în 30% la adult, caracterizându-se printr-o pierdere în greutate și malabsorbție selectivă, în special a grăsimilor (steatoree), glucidelor (D-xiloza), acidului folic și vitaminelor A și B12, însoțită de atrofie vilozitară (totală, parțială sau subtotală) și de o anemie megaloblastică prin defect de absorbție a acidului folic și al vitaminei B12 [45].

S-ar putea de presupus că infestarea cu *Trichuris trichiuria*, care colonizează preponderent colonul, evoluează acclinic, și de rînd cu alți factori cauzali, ar putea sta la originea anemiei la copiii și adolescenții din ambele loturi. Prin urmare, anemia la acești subiecți poate fi explicată prin faptul că parazitul adult penetrează mucoasa intestinală antrenând o inflamație cu

infiltrație limfoplasmocitară și eozinofilică. S-a estimat că un singur vierme poate să consume aproximativ 0,005 ml de sânge în zi, iar o invazie cu helminți a unui individ, poate număra în mediu peste 1000 de vermi [46]. Carența în fier este cea mai frecventă cauză a anemiei, însă carența în micronutrienți este la fel implicată (acidul folic, Vitamina B12, vitamina A). Oricare n-ar fi inflamațiile acute sau cronice, parazitozele intestinale sunt implicate în egală măsură în instalarea anemiilor [47].

În cercetarea actuală, frecvența anemiilor este de 100%, ce depășește pragul de 40% definit de către OMS pentru o endemie severă de anemie într-un grup populațional [48]. Ea nu reflectă, de fapt, prevalența anemiilor în populația generală și conturează, că studiul efectuat în mediu spitalicesc de copii și într-o instituție școlară unde sunt factori favorizanți specifici (infecția respiratorie acută la copiii spitalizați în SCMC nr.1, igiena de bază și alimentația precară, de rând cu un grad înalt de infestare cu helminți în ambele loturi de studiu).

În toată lumea de pe glob, copiii sunt foarte sensibili la infestația cu *Enterobius vermicularis*. Se pare, totuși că maladia este mult mai prezentă în regiunile temperate și țările înalt dezvoltate decât în regiunile tropicale și subtropicale [49]. Se atestă că *E. vermicularis* este singurul parazit care este cel mai frecvent întâlnit în țările dezvoltate. Totuși, acest vermișor este resimțit de către populație ca o maladie „rușinoasă”, constituind un stigmat social în societățile prospere și înalt dezvoltate [2]. Studiul nostru nu a constatat o corelație puternică dintre nivelul deficitului de vitamina D și infestația cu helminți și vice versa, însă am constatat că giardiaza, ascaridoza, trichuroza și enterobioza sunt cele mai răspândite parazitoze intestinale întâlnite la copiii și adolescenții din centrul Moldovei, cel puțin la subiecții antrenați în studiu, din ambele instituții. Parazitozele intestinale nu influențează masa corporală, talia sau indicele masei corporale (IMC).

3.4. Exteriorizarea genelor Klotho, VDR și LCT (lactază), în dependență de nivelul calciului alimentar, statutul vitaminei D și haplotipurile de la nivelul promotorului genei VDR

În tabelul 3.25 au fost studiate variantele polimorfismelor genelor mai frecvent întâlnite:

- 3 variante studiate în regiunea promotorului genei codante a receptorului vitaminei D, dintre care două strâns cuplate, ce demonstau absența sau prezența de la 0 până la 2 exemplare ale haplotipului I, absența haplotipului în cauză fiind asociată cu o capacitate mai scăzută a transactivării genei codante pentru receptorul vitaminei D [275];
- o variantă (-13910 LCT) asociată cu activitate diferită a lactazei intestinale;

- altă variantă a genei Klotho, noi am reușit să demonstrăm influența ei asupra dezvoltării pubertare a adolescenților sănătoși [276].

Inițial, noi am constatat că distribuirea variantelor în ambele cohorte din Chișinău și Orhei nu se deosebeau esențial de cele depistate la adolescenții din Franța (cohorta ISOS).

Tabelul 3.25. Frecvența polimorfismelor -13910 Lactază, Klotho și a promotorului VDR.

	-13910 LCT		Klotho A749A		VDRp		
	CC	CT+TT	CC	CT+TT	0 Hap1	1 Hap1	2 Hap1
L1	44%	56%	71%	29%	23%	62%	15%
L0	26%	74%	72%	28%	35%	44%	21%
ISOS	32%	68%	78%	21%	27%	54%	20%

3.4.1. Statutul vitaminei D, metabolismul calcic și genotipul depistat

Cercetările efectuate anterior au demonstrat prezența unei corelații puternice între statutul vitaminic D la adolescenții sănătoși și genotipurile depistate [275]. Această corelație n-a fost depistată în loturile de studiu (tabelul 3.26).

Tabelul 3.26. Interrelația dintre 25(OH)D (ng/ml) și polimorfismele -13910 LCT, Klotho, VDRp.

	Lotul de cercetare		Lotul de control	
	<12 ani	12-16 ani	<12 ani	12-16 ani
-13 910 LCT:				
CC	13,9±0,9 (n=16)	13,3±0,8 (n=13)	21*	16,3±1,1 (n=36)
CT+TT	15,5±0,8 (n=26)	15,7±1,4 (n=16)	18,9±0,6 (n=75)	18,7±1,3 (n=45)
Klotho A749A:				
CC	15,2±0,8 (n=34)	13,4±0,8 (n=19)	17,6±0,7 (n=72)	16,7±0,8 (n=57)
CC+TT	13,9±0,8 (n=11)	17,9±2,0 (n=7)	18,7±0,9 (n=30)	17,5±1,7 (n=20)
VDR :				
0 hap1	15,2±1,3 (n=11)	12,9±1,8 (n=3)	19,4±0,9 (n=43)	17,3±1,3 (n=33)
1 hap1	15,1±0,7 (n=23)	15,1±1,0 (n=21)	17,6±0,8 (n=56)	17,6±1,2 (n=39)
2 hap1	14,0±1,4 (n=12)	10,0*	16,7±0,9 ¹ (n=26)	17,3±1,3 (n=18)

Valorile reprezintă media ± DS.

Diferențele semnificative sunt calculate între genotipurile din fiecare grup.

*: doar un copil mai mic de 12 ani a fost purtător de genotip CC pentru gena lactazei, iar un alt copil era purtător de genotip 2 Hap1 în Chișinău.

Totuși, o tendință ($p = 0,05$) a fost observată în cohortele copiilor de vârstă mai mică, în special la cei din Orhei. N-am constatat nici o corelație între statutul vitaminei D, polimorfismul asociat activității lactazei sau varianta genei Klotho. În cele din urmă, noi am analizat influența posibilă a genotipurilor nominalizate asupra calcemiei pentru un nivel dat al 25(OH)D (tabelul 3.27).

Tabelul 3.27. Calcemia corijată (nmol/l) în raport cu polimorfismele -13910 LCT, Klotho, VDRp și 25(OH)D circulantă (ng/ml).

	Lotul de cercetare			Lotul de control		
25(OH)D (ng/ml)	≤ 12	12,1-19,9	≥ 20	≤ 12	12,1-19,9	≥ 20
25(OH)D(nmol/l)	≤ 30	30,1-49,9	≥ 50	≤ 30	35-50	≥ 50
-13 910 LCT:						
CC	98,1 $\pm$ 1,0	94,1 $\pm$ 2,9	83,7 $\pm$ 12,8	91,9 $\pm$ 2,8	86,3 $\pm$ 3,8	95,4 $\pm$ 4,4
CT+TT	95,7 $\pm$ 3,2	96,1 $\pm$ 2,1	95,9 $\pm$ 2,3	85,1 $\pm$ 2,4	89,4 $\pm$ 3,8	91,6 $\pm$ 2,1 ²
Klotho A749A:						
CC	96,1 $\pm$ 1,6	95,2 $\pm$ 1,9	94,1 $\pm$ 4,2	85,2 $\pm$ 2,0	89,1 $\pm$ 1,6	92,2 $\pm$ 2,4 ¹
CC+TT	101,0 $\pm$ 3,2	94,6 $\pm$ 4,3	91,3 $\pm$ 5,3	89,4 $\pm$ 2,9	90,3 $\pm$ 3,4	96,1 $\pm$ 2,3
VDR:						
0 hap1	97,2 $\pm$ 1,0	93,6 $\pm$ 2,9	97,5 $\pm$ 4,5	85,7 $\pm$ 2,4	90,2 $\pm$ 2,1	94,9 $\pm$ 2,3 ^{1, a}
1 hap1	97,8 $\pm$ 2,1	94,4 $\pm$ 2,3	91,3 $\pm$ 4,7	87,8 $\pm$ 2,2	87,1 $\pm$ 2,2	93,7 $\pm$ 2,7 ^a
2 hap1	95,1 $\pm$ 4,4	98,5 $\pm$ 1,5	94,4	84,9 $\pm$ 4,0	85,8 $\pm$ 2,7	83,5 $\pm$ 3,1

Valorile reprezintă media $\pm$ DS. Analiza variației ANOVA a fost efectuată utilizând programul Statview 5.0. Diferențele semnificative sunt calculate cu grupul cu valorile 25(OH)D $\leq$ 12 ng/mL.

¹: $p < 0.05$; ²: $p < 0.01$.

^a: $p < 0.05$ (calculată între 0 hap1 și 1 și 2 hap1).

Dorim să menționăm, că nu s-a observat nici o corelație între calcemie și genotipul Klotho la copiii din cohorta din Chișinău. Din contră, devine clar că normalizarea calcemiei la acești copii este influențată de nivelurile diferite ale 25(OH)D în funcție de genotipul VDR. S-a constatat clar, că pentru normalizarea calcemiei la acești copii, era necesar doze diferite de 25(OH)D în funcție de genotipul VDR. Astfel, o calcemie medie de 90 mg/l este atinsă la un nivel al 25(OH)D mai mare de 12 ng/ml la copiii ce nu sunt purtători de haplotip Hap1, la un nivel mai mare de 20 ng/ml la heterozigoți, și, în general, nu este atinsă chiar când 25(OH)D este în cuartila superioară la copiii ce poartă 2 alele ale Hap1, asociată cu o expresie minimă a receptorului de vitamină D.

3.5. Concluzii la capitolul 3

1. Studiu intervențional efectuat într-o cohortă mare de mame și nou-născuți până la vârsta de un an, demonstrează clar necesitatea obligatorie a suplimentării materne cu vitamina D, a gravidelor la sfârșitul iernii, precum și în perioada primului an de viață, fie în doze zilnice (700-1500 UI/zi), fie în doze intermitente (ca de exemplu 2,5 mg la fiecare 3 luni) de vitamină D₃.
2. S-a constatat o incidență înaltă (27%) a nivelului diminuat de vitamină D la nou-născuții de la mamele cărora nu li s-a administrat vitamină D în timpul sarcinii și care au născut fie la sfârșitul primăverii, fie chiar la sfârșitul verii.
3. A fost stabilită o asocieră între rezervele joase de vitamină D și:
 - retard intrauterin;
 - mineralizarea diminuată a bolții craniene;
 - riscul înalt a manifestărilor clinice de hipocalcemie în perioada neonatală;
 - risc înalt de dezvoltare a rahitismului și/sau a fracturilor în primul trimestru al vieții.
4. A fost argumentată metoda de prevenire a carenței vitaminei D, ce presupune administrarea trimestrială a vitaminei D prin doze stoss și care o poate înlocui pe cea frecționată, recomandată în prezent de către Ministerul Sănătății al Republicii Moldova în comun cu UNICEF.
5. Perfecționarea strategiei profilaxiei specifice de prevenire a carenței vitaminei D în practică, în perioada pre- și postnatală, va contribui la eficientizarea strategiei primare a osteoporozei la vârsta de adult.
6. Deformările membrelor inferioare și nivelurile joase ale calciului seric sunt frecvente și în subgrupurile de copii și adolescenți de rasă caucaziană, confirmând impactul major al deficitului combinat de calciu/lapte și vitamină D asupra mineralizării oaselor în timpul creșterii prepubertare și pubertare.
7. Nivelul optim al 25(OH)D pentru dezvoltarea normală a scheletului și metabolismul calciului în cantitate ≥ 30 ng/ml (≥ 75 nmol/L) pentru copiii supuși factorilor de risc, cum ar fi aportul scăzut de calciu/lapte, eventual agravate de malabsorbția intestinală și parazitoze, recomandat de către Organizația Internațională de Medicină (2011), Consiliul Suprem de Sănătate din Belgia, în scopul asigurării masei osoase optime în perioada de creștere a scheletului.
8. Nivelului diminuat al 25(OH)D (≤ 30 nmol/L) și a calciului/produselor lactate stabilit în cohortele din mun. Chișinău și or. Orhei, precum și a celor din Franța, impune elaborarea

unor strategii de fortificare a produselor alimentare cu vitamina D, în special în perioada de iarnă pentru copiii și adolescenții europeni.

9. A fost confirmată corelația dintre statutul vitaminei D, calcemie și activitatea fosfatazei alcaline.
10. A fost stabilită predominarea deformărilor osoase, cu divergențe în funcție de vârstă, la copii din Gimnaziul internat, or. Orhei, cauzată de nutriția precară (retard de creștere în înălțime, nivel diminuat al calciului și magneziului), în comparație cu copiii din mun. Chișinău.
11. A fost determinat că, 25% de copii, înainte de pubertate, aveau nivelurile 25(OH)D mai joase de 12 ng/ml (30 nmol/L), fiind asociate cu un risc sporit de dezvoltare a deformărilor osoase de tip *genu varum/valgum*, a hipocalcemiei și activității crescute a fosfatazei alcaline, iar valorile intermediare ale 25(OH)D (12 – 20 ng/ml) corelează cu persistența riscului moderat de dezvoltare a *genu varum/valgum*, însă fără hipocalcemie sau activitate crescută a fosfatazei alcaline.
12. La 25% de adolescenți din or. Orhei, valorile 25(OH)D de 12 ng/ml (30 nmol/L), erau asociate cu un risc crescut a *genu varum/valgum*, iar normalizarea calcemiei și magneziemiei era direct corelată cu nivelurile 25(OH)D mai mari sau egale de 20 ng/ml, pragul de carență al vitaminei D, fiind considerat mai mic de 12 ng/ml și al insuficienței, mai mic de 21 ng/ml.
13. Compararea rezultatelor obținute în ambele cohorte arată că efectele clinico-biologice depind și de statutul nutrițional al copiilor și adolescenților, luând în considerație că un prag mai înalt al vitaminei D este necesar în cazul când se constată un deficit de aport de calciu și un polimorfism al VDR concomitent cu o creștere mai intensă a organismului.

4. CORELĂRILE STATUTULUI VITAMINEI D, APORTULUI DE CALCIU, GENOTIPULUI VDR ȘI KLOTHO LA COPII ȘI ADOLESCENȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA ȘI FRANȚA.

4.1. Statutul vitaminei D, aportul de calciu și impactul genotipului VDR

Impactul factorilor genetici este indiscutabil în creșterea, mineralizarea matricei osoase și dereglărilor lor. Studiul în cauză, scoate în evidență rolul major al genotipului pentru receptorul vitaminei D, care ar permite copilului să atingă un statut calcic satisfăcător. În această cohortă, similar datelor obținute la studierea anterioară a cohortelor europene, 20% dintre copii purtau genotipul Hap1 pe ambele alele. Astfel, acești copii au un risc mult mai mare de a dezvolta hipocalcemia dacă dieta lor nu este optimă. Similar procedurii implementate în analiza rezultatelor etapei I a studiului, am comparat rezultatele obținute referitoare la statutul vitaminei D, aportul de calciu și impactul genotipului VDR în etapa a II- a a studiului cu datele similare ale savanților francezi din echipa ghidată de Profesoara Michele Garabedian.

Valorile 25(OH)D în perioada de creștere ar putea fi influențate de polimorfismele genomice care modulează acțiunile vitaminei D, în special cele localizate în gena receptorului pentru vitamina D (VDR). În susținerea ipotezei date, a fost demonstrat că absorbția intestinală a calciului și densitatea minerală osoasă la copii și adolescenți, precum și impactul aportului zilnic de calciu/produse lactate asupra acumulării minerale în vertebrele lombare [278], sunt asociate cu variațiile obișnuite ale genei VDR și cu o variantă (rs4516035) în regiunea ei promotoare (VDRp). Din cele expuse putem reitera, că, în pofida existenței unui șir de valori de prag ale nivelului de 25(OH)D pentru definirea deficienței vitaminei D, până în prezent, nu a fost atins un consens în privința nivelurilor necesare pentru a asigura o stare optimă a osului în timpul creșterii.

În lucrarea actuală, ne-am propus de-a cerceta asocierea între 25(OH)D și markerii metabolismului calcic, osos, deformările membrului inferior și mineralizarea vertebrelor folosind trei valori de prag (30, 50, 70 nmol/l) și am determinat nivelul 25(OH)D folosind Schema Internațională de Evaluare Externă a Calității pentru metabolitul vitaminei D (DEQAS) și, ulterior, prevalența insuficienței de vitamină D pentru fiecare nivel de prag la 629 copii și adolescenți (4-18 ani) aparent sănătoși din Republica Moldova și Franța – două țări situate la o latitudine medie în Europa (47-49°N), dar cu un diferit stil de viață, obișnuințe alimentare și variante genotipice în promotorul genei receptorului vitaminei D (VDRp). Prevalența valorilor 25(OH)D mai joase de cele trei praguri propuse de 30, 50, și 70 nmol/l, a fost estimată și

comparată cu prevalența înregistrată în alte țări. În plus, analiza riscurilor și beneficiilor a fost efectuată pentru fiecare valoare de prag a 25(OH)D luând în considerație aportul de calciu/lapte și genotipul VDRp la copii, împreună cu semnele clinice și de laborator caracteristice deficienței de vitamină D și semnele de laborator caracteristice supradozării vitaminei D.

4.1.1. Caracteristicile nutriției

În cohorta franceză un nutriționist cu experiență a estimat particularitățile de alimentare ale participanților la studiu prin chestionare referitoare la consumul alimentar în ultimele 7 zile, inclusiv mesele regulate și gustările și a calculat aportul de proteine (în medie: 72 g/zi, inclusiv 49 g/zi proteină de origine animală), energie (1985 kcal/zi), fosfați (1122 mg/zi), magneziu (232 mg/zi), calciu (878 mg/zi, inclusiv lapte 210 mg/zi și alte produse lactate - 254 mg/zi) și de vitamină D (1,72 micrograme/zi), folosind tabelul computerizat al componenței produselor alimentare franceze (Bilnut 4.0. S.C.D.A Nutrisoft, 1995). Trebuie menționat, că fortificarea laptelui și a produselor alimentare cu vitamină D, la momentul efectuării studiului, nu a fost autorizată în Franța.

Calculul meniului cotidian și săptămânal în cohorta din mun. Chișinău și or. Orhei au fost diferite și reflectate în capitolul material și metode, iar rezultatele sunt redată în tabelul 4.1. Astfel, meniul copiilor și adolescenților din Gimnaziul Internat din or. Orhei, unde subiecții se aflau permanent, inclusiv în zilele de odihnă, era unic la fiecare masă. Aportul total de proteine (în medie: 75 g/zi, inclusiv 24 g/zi proteină de origine animală), energie (2842 kcal/zi), fosfați (921 mg/zi), magneziu (255 mg/zi), calciu (493 mg/zi, inclusiv 55 mg/zi sub formă de lapte și 13 cu produse lactate) și de vitamină D (1,23 micrograme/zi) au fost evaluate în baza meniurilor folosind tabelul CIQUAL al componenței nutritive.

Meniul copiilor din Spitalul Clinic Municipal de Copii nr. 1 a fost calculat zilnic de către asistenta superioară a blocului alimentar, media zilnică în decurs de o săptămână este următoarea:- proteine totale – 89 g ($2,6 \pm 0,12$ g/kg de greutate corporală pe zi pentru copii și $2,3 \pm 0,4$ g/kg greutate corporală pe zi pentru adolescenți), inclusiv proteine de origine animală 48 g, energie – 3162 kcal, fosfați 1,03 mg, magneziu – 273,8 mg. Aportul de calciu pe zi a fost 930 mg, inclusiv 400 mg ca lapte și 150 ca alte produse lactate, Vitamina D 1,8 mcg/zi.

Tabelul 4.1. Aporturile nutritive și energetice medii zilnice în ambele loturi din Republica Moldova ($M \pm ES$).

	Lotul de studiu	Lotul martor	t	p
Proteine totale (copii) (g/kg)	2,5 $\pm$ 0,41	2,6 $\pm$ 0,12	0,2326	>0,05
Proteine totale (adolescenți) (g/kg)	1,8 $\pm$ 0,32	2,3 $\pm$ 0,43	0,9259	>0,05
Proteine de origine animală (g)	24,1 $\pm$ 0.41	48,6 $\pm$ 1.24	18,7023	<0,001
Energie (kcal)	2842,6 $\pm$ 46.74	3162.8 $\pm$ 52.43	4,5587	<0,001
Fosfați (mg)	0,921 $\pm$ 0165	1,03 $\pm$ 0,22	-	-
Magneziu (mg)	255,9 $\pm$ 2.45	273,8 $\pm$ 1.12	6,6543	<0,001
Calciu / zi(mg)	493,5 $\pm$ 8.47	930,6 $\pm$ 12.02	29,7347	<0,001
Inclusiv din produse lactate(mg)	69,4 $\pm$ 7.66	550,3 $\pm$ 14.39	29,5031	<0,001
Vitamina D (mg)	2 $\pm$ 0.121	1,98 $\pm$ 0,037	-	-

4.1.2. Statutul 25-hidroxivitaminei D la fetele adolescente din Caen

În această cohortă fetele cu vârsta cuprinsă între 11-17,9 ani aveau o valoare medie $\pm$ DS a 25(OH)D seric de 54,3 $\pm$ 15,1 nmol/l, în perioada de toamnă (diapazonul total: 22-95 nmol/l, n=44) și 44,3 $\pm$ 19,6 nmol/l, în perioada de iarnă-primăvară (diapazonul: 7-115 nmol/l, n=258). Prevalența nivelului de 25(OH)D $\leq$ 30 nmol/l (12 ng/ml) a variat în funcție de sezon (5% toamna, față de 29% iarnă-primăvară), fetele examinate în martie-mai având cea mai înaltă prevalență (39%, n=153). Prevalența valorilor de 25(OH)D mai mici de 50 nmol/l (20 ng/ml) și mai mici de 70 nmol/l (30 ng/ml) erau 63%, respectiv 91%, fără variații sezoniere. Nivelurile de 25(OH)D nu erau asociate cu aportul de vitamină D (media: 1,9 micrograme/zi, diapazonul: 0,3-9,1), chiar și în subgrupul de fete examinat la sfârșitul iernii (martie-mai).

Indicii clinici și biologici au fost analizați în funcție de cele trei valori de prag ale 25(OH)D: 30 nmol/l, 50 nmol/l, și 70 nmol/l. Datele antropometrice și mineralizarea vertebrelor lombare nu erau asociate cu 25(OH)D, chiar și luând în considerare perioada de menarhă, nici în funcție de aportul de calciu sau lapte – doi factori care influențează mineralizarea vertebrelor lombare (tabelul 4.2, Figura 4.1).

Pe de altă parte, analizele multiple de regresie ale CMO au demonstrat asocieri semnificative cu masa corporală, $p < 0,0001$, aria vertebrală, $p < 0,0001$ și calciul din lapte, $p = 0,0057$, dar nicio asociere cu nivelurile serice ale 25(OH)D, $p = 0,1288$ (n=177, R^2 ajustat: 0,84).

Tabelul 4.2. Antropometria și mineralizarea spinală lombară, în funcție de nivelul 25(OH)D și ciclul menstrual, la cohorta franceză.

	Înainte de ciclul menstrual				După ciclul menstrual			
25(OH)D (nmol/L)	31-49	31-49	50-60	≥70	31-49	31-49	50-60	≥70
Media de 25(OH)D (nmol/L)	39.6±0.6	41,2±0.8	57.6±0.8	85.0±2,8	22,8.6±0.8	39.6±0.6	57.2±0.8	94,2±12.7
n	20	30	43	19	59	64	54	9
Vârsta (ani)	12.8±0.3	12.3±0.2	12.3±0.2	12.5±0.2	14.9±0.2	14.9±0.2	15.3±0.2	14.9±0.5
Înălțimea (DS)	0.416±0.221	0.632±0.208	0.603±0.145	0.887±0.181	0.320±0.135	0.719±0.133	0.526±0.123	0.455±0.391
Indice corporal BMI (kg/m²)	18.5±0.6	18.0±0.4	17.9±0.4	17.6±0.3	20.0±0.3	20.6±0.3	20.4±0.3	20.6±0.6
Vertebrele lombare L2-L4								
Înălțimea (cm)	8.67±0.12	8.59±0.13	8.63±0.08	8.75±0.14	9.82±0.06	9.80±0.06	9.72±0.07	10.1±0.1
Lungimea (cm)	3.68±0.07	3.69±0.05	3.1±0.04	3.65±0.06	3.85±0.03	3.89±0.02	3.90±0.03	3.82±0.07
Suprafața (cm²)	32.0±0.9	31.8±0.8	31.2±0.5	32.0±1.0	37.9±0.5	38.1±0.4	38.0±0.4	38.5±0.8
CMO (g)	25.6±1.1	24.0±1.0	23.4±0.7	25.4±1.4	38.4±0.8	39.9±0.7	38.9±0.9	38.8±1.5
DMO (g/cm²)	0.795±0.019	0.747±0.016	0.748±0.016	0.786±0.026	1.012±0.015	1.044±0.013	1.022±0.017	1.006±0.028
DMO(scorul Z)	-0.002±0.144	-0.236±0.122	-0.221±0.124	0.150±0.209	0.133±0.136	0.343±0.119	0.092±0.161	0.012±0.321
Consumul de calciu (mg/zi):								
Total	156±41	182±24	175±22	214±38	149±21	189±23	171±33	171±36
Lapte	868±74	831±53	815±41	955±80	839±34	964±43	931±51	862±84
Produse lactate, cu excepția laptelui	187±49	218±29	210±27	257±45	179±25	227±28	205±39	205±43
Alte alimente	236±28	233±31	220±18	267±23	270±27	292±24	253±22	229±40
	445±47	379±33	385±28	470±49	391±21	444±35	473±34	427±41

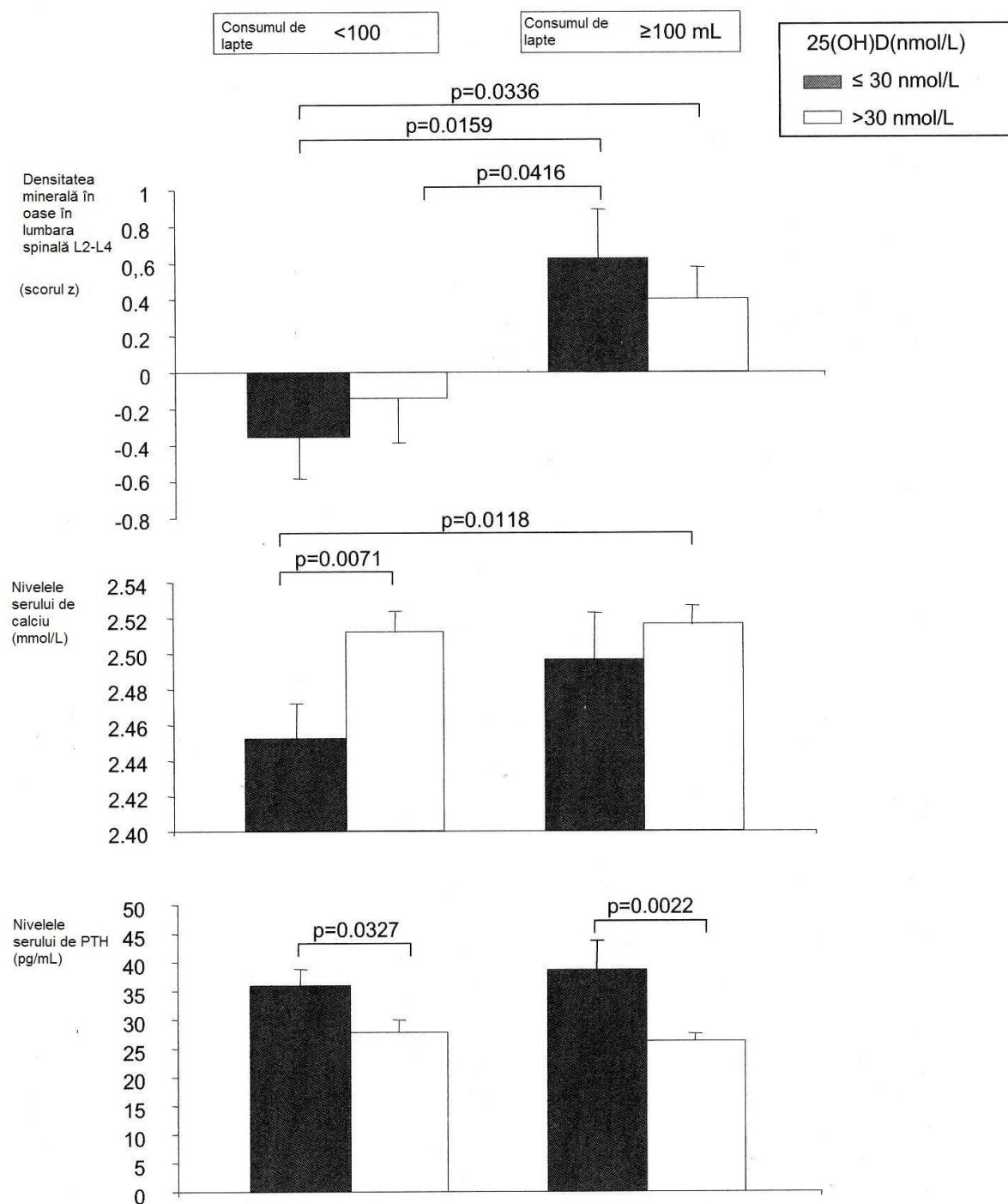


Fig. 4.1. Concentrația serică a calciului, PTH, densitatea minerală osoasă lombară, în dependență de statutul vitaminei D și aportul de calciu/produse lactate.

Indicatorii de laborator evaluați nu s-au remarcat prin veridicitate statistică, la fetele mai mari de 15 ani. Însă, asocieri semnificative au fost observate între statutul vitaminei D și markerii de laborator ai calciului și metabolismului osos la fete, în timpul creșterii rapide între 11 și 15 ani: fetele cu nivelul $25(\text{OH})\text{D} \leq 30 \text{ nmol/l}$ aveau valori mai înalte ale PTH, mai mici ale calciului seric și mai mici ale activității fosfatazei alcaline, în comparație cu fetele cu valori ale $25(\text{OH})\text{D} \geq 50 \text{ nmol/l}$. Fetele cu valori aflate sub pragul de 30 nmol/l , de asemenea, aveau

niveluri diminuate ale osteocalcinei, însă analiza de regresie multiplă a demonstrat asocierea nivelului de osteocalcină cu vârsta ($p < 0,0001$), dar nu cu nivelul 25(OH)D ($p = 0,9156$). De menționat, că fetele cu valori ale 25(OH)D sub pragul de 30 nmol/l consumau mai puțin lapte în comparație cu fetele cu concentrații mai înalte ale 25(OH)D. Luând în considerare consumul de lapte, s-a confirmat interrelația între statutul vitaminei D și acest consum asupra calciului seric, deoarece statutul insuficient al vitaminei D influențează negativ calcemia, doar în cazul când, paralel consumul de lapte este în percentila de jos, mai mic de 100 ml/zi și un aport zilnic mediu de calciu fiind de 716 ± 199 mg/zi. Nici-un efect aditiv al consumului de lapte asupra altor indici biochimici sau biologici nu a fost observat, în special asupra nivelului de PTH sau a activității fosfatazei alcaline. Analizele de regresie multiplă au confirmat acest fapt:

- a) PTH a fost negativ asociat cu nivelul de 25(OH)D ($p = 0,0260$) și luna de colectare a probei de sânge ($p = 0,0266$), însă nu cu vârsta sau consumul de lapte;
- b) activitatea fosfatazei alcaline a fost pozitiv asociată cu vârsta ($p < 0,0001$) și nivelul de 25(OH)D ($p = 0,0076$), însă nu cu luna de colectare a probei de sânge sau cu consumul de lapte.

Fetele cu nivelul de 25(OH)D între 31 și 49 nmol/l nu au înregistrat diferențe față de fetele cu valori mai mari sau egale cu 50 nmol/l, cu excepția activității fosfatazei alcaline, care era mai joasă. Fetele cu valori ale 25(OH)D între 50 și 69 nmol/l nu au manifestat diferențe față de cele cu nivelul vitaminei D mai mare de pragul de 70 nmol/l.

În această cohortă nu a fost depistat nici-un semn de supraîncărcare cu vitamina D. În perioada de creștere accelerată, prevalența calciului seric mai mare de a 90-a percentilă (2,59 mmol/l) a crescut paralel cu valorile 25(OH)D, până la 20% la fetele cu valori ale 25(OH)D ce depășeau pragul de 50 nmol/l. Însă, doar 2,4% fete cu nivelul 25(OH)D peste 50 nmol/l aveau hipercalcemie (raportul calciu/creatinină mai mare de 0,5 mmol/mmol). La fetele mai mari de 15 ani nu a fost depistată nici hipercalcemie, nici hipercalcemie.

4.1.3. Statutul 25-hidroxitaminei D la copiii la vârsta pre-pubertară și pubertară din municipiul Chișinău

Datele antropometrice, semnele clinice caracteristice deficienței de vitamină D și indicii de laborator au fost analizate în perioada de iarnă-primăvară la 33(48%) fete și 38(52%) băieți între 4 și 15 ani. Talia și masa corporală erau comparabile cu valorile ajustate după vârsta copiilor francezi sănătoși, iar fetele adolescente erau comparabile cu cele din cohorta franceză. Semnele clinice caracteristice deficienței de vitamină D, cu predilecție tetania hipocalcemică,

durerile osoase, deformațiile membrelor inferioare și scolioza, au fost observate la 2%, 4%, 6%, respectiv 9% dintre copii.

Valorile medii ale 25(OH)D constituiau $36,2 \pm 11,7$ nmol/l (diapazonul: 17-67 nmol/l), fără diferențe în funcție de statutul pubertar, gen sau locul de reședință ($36,5 \pm 1,5$ nmol/l, n=38), pentru copiii ce locuiau la bloc $35,7 \pm 2,0$ nmol/l, n=33, pentru cei ce locuiau la casă. Prevalența nivelurilor de 25(OH)D ≤ 30 nmol/l și ≤ 50 nmol/l erau 41%, și respectiv 83%.

Niciunul dintre semnele clinice și de laborator determinate la acești copii nu a fost asociat cu statutul 25(OH)D, în special calciul seric, deformațiile membrelor inferioare, scolioza și durerile osoase. În această cohortă, doar 2% dintre copii aveau un nivel al calciului seric mai mic de a 10-a percentilă determinată pentru populația din Moldova (1,81 mmol/l), iar 10% dintre copii aveau valori ale calciului seric mai mari de a 90-a percentilă (2,67 mmol/l), indiferent de statutul lor 25(OH)D (tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Antropometria, variabilele de laborator, semne clinice privind statutul 25(OH)D, la cohorta din mun. Chișinău.

Parametrii evaluați	Valorile obținute	Valorile obținute	Valorile obținute	Valorile obținute	Valorile obținute	Valorile obținute
Nr.	19	17	10	7	11	7
Vârsta (ani)	6.8 ± 0.5	7.4 ± 0.4	7.0 ± 0.7	13.2 ± 0.3	13.5 ± 0.2	12.9 ± 0.5
Înălțimea (DS)	0.153 ± 0.287	0.625 ± 0.216	0.811 ± 0.429	0.523 ± 0.184	0.264 ± 0.330	-0.033 ± 0.519
Greutatea (DS)	-0.287 ± 0.316	0.121 ± 0.202	0.044 ± 0.367	0.100 ± 0.260	-0.507 ± 0.217	-0.483 ± 0.140
IMC (kg/cm ²)	15.0 ± 0.3	15.6 ± 0.3	14.8 ± 0.4	17.8 ± 0.6	17.5 ± 0.5	16.8 ± 0.5
Ca seric (mmol/L)	2.29 ± 0.05	2.29 ± 0.05	2.27 ± 0.1	2.42 ± 0.05	2.25 ± 0.07	2.44 ± 0.07
Ca seric corijat (mmol/L)	2.40 ± 0.05	2.42 ± 0.04	2.32 ± 0.11	2.49 ± 0.03	2.27 ± 0.08	2.37 ± 0.08
P seric (mmol/L)	1.26 ± 0.06	1.29 ± 0.04	1.16 ± 0.07	1.27 ± 0.11	1.19 ± 0.05	1.36 ± 0.09
Mg seric (mg/L)	0.81 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.84 ± 0.04	0.86 ± 0.05	0.85 ± 0.06	0.96 ± 0.08
Proteine (mg/L)	66.8 ± 1.7	65.6 ± 1.5	70.7 ± 1.7	69.4 ± 2.7	72.1 ± 2.3	76.1 ± 2.9
Creatinina (mmol/L)	53.1 ± 2.2	56.1 ± 2.5	49.7 ± 3.1	62.6 ± 2.8	58.3 ± 3.0	58.8 ± 2.8
Hemoglobina (g/L)	119.4 ± 1.4	119.9 ± 0.9	120.7 ± 1.4	118.2 ± 1.2	117.1 ± 1.6	119.0 ± 0.5
Fosfataza alcalină (UI/L)	403 ± 25	385 ± 27	470 ± 44	433 ± 33	382 ± 44	296 ± 23

Valorile sunt prezentate sub forma $\pm SE$. Diferențe semnificative nu au fost remarcate între grupul 25 (OH) D ≥ 50 nmol/L la copii de vârsta pubertății (Analiza a fost efectuată folosind testul U non-parametric Man and Whitney cu Statview 5.0 de rețea)

4.1.4. Statutul 25-hidroxivitaminei D la copiii la vârsta pre-pubertară și pubertară din Gimnaziul Internat din or. Orhei

Datele antropometrice, semnele clinice caracteristice deficienței de vitamina D și indicii de laborator au fost analizați în perioada de iarnă-primăvară la 97 (43%) fete și 129 (57%) băieți cu vârsta între 7 și 16 ani (tabelul 4.4). Valorile medii $\pm$ DS ale 25(OH)D serice erau egale cu $43,7\pm 15,7$ nmol/l (diapazonul: 17-107 nmol/l), fără impact asupra statutului pubertar, dar cu valori mai mici la fete în comparație cu băieții ($40,2\pm 14,7$ nmol/l față de $46,5\pm 16$ nmol/l, $p=0,0031$). La băieți, prevalența nivelului de 25(OH)D ≤ 30 nmol/l, ≤ 50 nmol/l, și ≤ 70 nmol/l era de 15%, 65%, respectiv 91%. La fete, aceste prevalențe erau de 28%, 57% și 93%, similar datelor înregistrate în cohorta franceză.

Fiind comparați cu copiii ajustați după vârstă din mun. Chișinău, copiii și adolescenții ce locuiau în Gimnaziul Internat erau de statură mai mică ($-0,6$ DS, $p<0,0001$), aveau o frecvență mai înaltă a deformărilor membrelor inferioare (15% față de 7%) și, mai frecvent, sufereau de dureri osoase (8% față de 4%), însă aveau o frecvență practic similară a scoliozei (11% față de 9%) și a convulsiilor hipocalcemice (0,4% față de 2%). Ei aveau niveluri mai joase ale calciului seric ($p<0,001$) și ale magneziului ($p<0,001$), însă valori mai mari ale fosfaților ($p=0,0050$) și 25(OH)D ($p<0,001$). Ei, de asemenea, aveau concentrații mai scăzute ale creatininei serice ($p=0,0002$), și ale hemoglobinei ($p<0,0001$) și un procent mai mare al hipoproteinemiei (22% față de 10% mai mic de 60 g/l, $p<0,0001$). În comparație cu copiii din Franța ajustați după vârstă, copiii din Gimnaziul Internat din or. Orhei aveau o statură mai mică cu -1 DS ($p<0,0001$), dar un IMC similar.

În mod surprinzător, 36% dintre copii aveau deformări ale membrelor inferioare, în cazul când nivelul lor de 25(OH)D era ≤ 30 nmol/l. Această prevalență a fost semnificativ mai înaltă decât cea determinată în caz de valori mai înalte ale 25(OH)D, pe când prevalența scoliozei și a durerilor osoase nu a fost influențată de statutul vitaminei D. Deformările membrelor inferioare asociate cu un nivel scăzut de 25(OH)D au fost depistate înainte (57%) și în timpul (30%) pubertății, atât la fete cât și la băieți. Analiza indicilor biochimici la copii, înainte de pubertate, a arătat o activitate crescută a fosfatazei alcaline și o tendință spre valori scăzute ale calciului seric la copiii cu valori ale 25(OH)D ≤ 30 nmol/l. În timpul perioadei de pubertate activitatea fosfatazei alcaline nu era asociată cu statutul vitaminei D, însă valori medii mai joase ale calciului seric au fost observate la adolescenții cu un nivel al 25(OH)D mai mic de pragul de 30 nmol/l. Copiii cu valori intermediare ale 25(OH)D (între 31 și 49 nmol/l) și cei cu concentrații

mai înalte ale 25(OH)D erau practic similari înainte de pubertate, însă valorile calciului seric rămâneau scăzute la adolescenții cu statutul vitaminei D mai mic de pragul de 50 nmol/l.

De menționat, că prevalența calciului seric mai mare de a 90-a percentilă a crescut până la 25%, în perioada pubertară, la copiii cu valori ale 25(OH)D mai mari de 50nmol/L, similar datelor înregistrate în cohorta franceză.

Tabelul 4.4. Antropometria, indicii de laborator, semnele clinice, privind statutul 25(OH)D la elevii Gimnaziului Internat din orașul Orhei.

	8,0 – 10,9 ani			11,0 – 15,0 ani		
25(OH)D (nmol/L)	≤ 30	31-49	≥50	≤ 30	31-49	≥50
Media 25 (OH)D (nmol/L)	25.3±0.5	38.5±0.6	56.4±1.2	26.5±0.5	39.3±0.5	63.2±1.5
Nr.	16	47	32	30	65	36
Vârsta (ani)	9.5±0.3	9.6±0.1	9.6±0.2	12.9±0.2	12.5±0.1	12.6±0.2
Înălțimea (DS)	0.043±0.249	- 0.172±0.152	0.473±0.338	- 0.221±0.175 ¹	- 0.545±0.121	- 0.903±0.136
Greutatea (DS)	- 0.071±0.183	- 0.035±0.137	0.004±0.174	- 0.021±0.175 ³	- 0.293±0.120	- 0.566±0.124
Indicele de masă corporală (kg/cm ²)	16.3±0.4	16.5±0.2	16.5±0.3	18.4±0.4	17.6±0.3	17.4±0.4
Ca seric (mmol/L)	2.00±0.05	2.17±0.05	2.16±0.06	2.11±0.05 ¹	2.09±0.04 ¹	2.26±0.05
Ca seric corijat (mmol/L)	2.03±0.07	2.26±0.05	2.24±0.07	2.20±0.05	2.17±0.04 ³	2.37±0.05
% Ca seric ≤10 percentile (≤ 1.82 mmol/L)	31.3%	10.8%	19.4%	6.7%	16.9% ²	0
% Ca seric ≤90 percentile (≤ 2.67 mmol/L)	0	15.2%	16.1%	0 ²	4.6% ²	25.0%
P seric (mmol/L)	1.35±0.07	1.40±0.07	1.42±0.07	1.29±0.07	1.37±0.04	1.34±0.06
Mg seric (mg/L)	0.70±0.03	0.69±0.02	0.67±0.03	0.71±0.03	0.68±0.02 ⁴	0.77±0.2
Proteine serice (mg/L)	71.9±2.2	68.2±1.6	69.9±2.5	68.7±1.9	70.0±1.7	67.9±1.9
Creatinina (mmol/L)	56.4±1.9	57.0±1.8 ¹	53.1±2.4	59.3±2.7	55.4±1.7	58.3±2.3
Hemoglobina (g/L)	108.6±3.0	114.9±1.1	110.4±2.2	111.1±1.9	113±1.5	112.5±1.6
Fosfataza alcalină (UI/L)	547±41 ¹	440±30	410±33	588±39	571±29	576±41

Valorile sunt prezentate sub forma $\pm SE$. Diferențe semnificative sunt remarcate comparativ cu grupul cu serul 25 (OH) D ≥ 50 nmol/L: 1: $p \leq 0.05$; 2: $p < 0.01$, 3: $p < 0.005$, 4: $p < 0.0005$ (folosind testul *t* impar, confirmat de Testul U Mann și Whitney, pentru grupul ≤ 30 nmol/L în grupul de 8-10.9 ani cu Statview 5.0 în rețea).

4.1.5. Statutul 25(OH)D și genotipul promotorului VDR

Distribuția genotipurilor în locusul -1012 al promotorului VDR a fost similar celui raportat anterior de alți savanți în cohortele europene. În Caen, Chișinău și în Gimnaziul Internat din or.Orhei: - 31%, 23% și 35% dintre copii purtau varianta A/A; - 51%, 63% și 44% dintre copii purtau varianta A/G; - respectiv 18%, 14%, și 21% dintre copii purtau varianta G/G (tabelul 4.5).

În cohorta franceză, impactul statutului scăzut al 25(OH)D asupra nivelului de PTH nu a fost influențat de genotipul VDRp. Însă, o asociere pozitivă între nivelul seric al 25(OH)D și al calciului a fost observată doar la fetele purtătoare de una sau două alele G, asocierea nefiind înregistrată la fetele cu genotipul A/A. În mod contrar, nicio asociere a 25(OH)D cu nivelul calcemiei sau cu prevalența deformațiilor membrelor inferioare nu a fost influențată de genotipul VDRp la copiii din Gimnaziul Internat din Orhei.

Tabelul 4.5. Influența genotipului VDR asupra ambelor cohorte.

	Cohorta franceză 11.0 – 17.9 ani			Cohorta Gimnaziului Internat din or. Orhei 11.0 – 15.0 ani		
25(OH)D (nmol/L)	≤ 30	30-50	≥ 50	≤ 30	35-50	≥ 50
Ser Calciu * (mmol/L)						
VDRp A/A	2.51 $\pm$ 0.02 (n=13)	2.48 $\pm$ 0.03 (n=11)	2.51 $\pm$ 0.02 (n=23)	2.14 $\pm$ 0.06 ¹ (n=15)	2.25 $\pm$ 0.06 (n=34)	2.37 $\pm$ 0.06 (n=26)
VDRp A/G + G/G	2.45 $\pm$ 0.02 ¹ (n=30)	2.51 $\pm$ 0.01 (n=32)	2.51 $\pm$ 0.01 (n=48)	2.18 $\pm$ 0.06 (n=26)	2.17 $\pm$ 0.04 (n=71)	2.28 $\pm$ 0.06 (n=41)
%Ca s ≥ 90 prcentile *						
VDRp A/A	10%	21%	20%	0	5.9 %	23.1 %
VDRp A/G+G/G	6%	11%	22%	0 ¹	11.3 %	19.5 %
PTH (pg/mL)**						
VDRp AA	36.8 $\pm$ 7.1 ¹ (n=6)	28.4 $\pm$ 3.2 (n=9)	24.9 $\pm$ 2.8 (n=18)	- -	- -	- -
VDRp A/G+G/G	37.5 $\pm$ 3.2 ¹ (n=20)	22.8 $\pm$ 1.3 (n=21)	28.3 $\pm$ 2.0 (n=36)			
% deformații osoase						
VDRp A/A	-	-	-	40%	8%	4%
VDRp A/G+G/G	-	-	-	38%	13%	7%

Valorile sunt prezentate sub forma $\pm SE$. Testul “*t*” parametric impar a fost efectuat, folosind Statview 5.0 (rezultate confirmate de testul non-parametric Mann and Whitney). Diferențe semnificative sunt remarcate în grupul cu ser 25 (OH) D ≥ 50 nmol/L: $p < 0.05$.

* Calciul seric corectat a fost folosit pentru Gimnaziul Internat din Orhei.

** Analizele au fost efectuate numai în grupul de fete (11.0-15.0 ani)

4.2. Studiul polimorfismului genei Klotho și corelarea statutului vitaminei D, mineralizarea osoasă, dezvoltarea fizică și pubertară la copiii și adolescenți de rasă caucaziană

Kuro et al. (2010) în procesul de dezvoltare al modelului murin transgenic hipertensiv, au obținut și identificat un nou șoarece – mutant, numit ulterior Klotho, în cinstea zeiței eline care deapănă fusul vieții, datorită asemănării impresionante a fenotipului cu îmbătrânirea prematură a oamenilor. Șoarecii, care erau homozigoți pentru transgenă, au demonstrat un șir de caracteristici ale sindromului de îmbătrânire prematură, inclusiv arterioscleroză, osteoporoză, atrofie senilă a pielii [280]. De asemenea, la ei a fost depistat emfizemul pulmonar, calcifieri ectopice în diferite țesuturi moi, maturizare defectuoasă a celulelor gonadice, atrofie a organelor genitale, anomalii ale glandei pituitare și degenerescență neuronală [280, 281]. De menționat, că acești șoareci nu diferă de cei de tip sălbatic sau heterozigoți până la vârsta de 3 – 4 săptămâni, după care rata de creștere încetinește și șoarecii mor la o vârstă între 8 și 15 săptămâni. În mod contrar, expresia excesivă a genei Klotho extinde durata de viață a șoarecilor.

Gena Klotho, responsabilă pentru sindromul de îmbătrânire prematură, codează o proteină cu o trecere membranară unică de tip I, care constă dintr-o secvență terminală N de semnal, un domen extracelular mare (-130 kD) compus din două repetări interne (KL1 și KL2) omologe b-glucozidazelor (enzime cehidrolizează legăturile glicozidice terminale în zaharuri, glicoproteine și glicolipide) și poate fi supus clivării, un domen transmembranar unic, și un domen intracelular scurt (10 aminoacizi) [280, 282]. Gena Klotho este exprimată predominant în celulele tuburilor contorți distali ai rinichilor, în plexul coroid al creierului, în glanda pituitară, în organele endocrine, inclusiv glandele paratiroide și organele reproductive, precum și în adipocitele cultivate [280, 283-285].

În baza analizei ADN, s-a stabilit că proteina secretată adițional, codată de gena Klotho, este lipsită de KL2, domeniurile transmembranice și intracelulare în rezultatul clivării (splicing-ului) ARN-ului alternativ. Astfel, proteina Klotho poate activa și ca factor umoral [280, 286]. Ca urmare a clivării domeniului extracelular, ultimul este eliberat în spațiul extracelular și este detectabil în sânge, urină, și lichidul cefalorahidian. Astfel, proteina Klotho există în două forme: membranară și secretată. Dovezi în plus ale acestei ipoteze constituie nedetectarea mARN Klotho în multe organe în care survin schimbări severe la șoarecii mutanți Klotho. Mai mult ca atât, expresia transgenică a genei Klotho la nivelul creierului și testiculelor este suficientă pentru a păstra caracteristicile macroscopice observate la șoarecii Klotho [280]. Cu toate acestea, mecanismul de funcționare al genei Klotho rămâne neclar. Studiile recente au determinat implicarea genei Klotho în facilitarea activării receptorului FGF de către FGF 23 [287, 288]. Este

posibil și impactul ei asupra homeostazei calcice, fapt demonstrat prin rezultatele obținute *in vitro* referitoare la influența genei asupra 1-alfa-hidroxi-lazei 25-hidroxitamini D, asupra activității TRPV5 în tubii renali contorți distali și asupra secreției PTH [289-291].

Aminoacizii Klotho umani sunt în proporție de 86% identici celor determinați în proteina murină și este codată de o genă care se întinde pe parcursul a 50 kb în cromozomul 13q12 [286]. În momentul actual niciun sindrom de îmbătrânire prematură nu a fost legat de această regiune. Similar genei Klotho la șoareci, gena Klotho umană codează atât formele legate de membrană, cât și cele secretate. Totodată, la oameni forma secretată predomină. Pentru a determina implicarea posibilă a genei Klotho în îmbătrânirea omului, au fost efectuate și raportate studii asupra asocierii polimorfismelor nucleotidice unice ale Klotho cu supraviețuirea umană și patofiziologia dereglărilor legate de vârstă. Au fost studiate mai mult de 10 mutații sau polimorfisme nucleotidice unice în gena Klotho umană. Printre ele a fost descrisă o variantă funcțională numită KL-VS, localizată în exonul 2. În această regiune, au fost descrise șase variante secvenționale cu un total dezechilibru de legături, două dintre ele având ca rezultat substituiri ale aminoacizilor F352V și C370S [292]. Au fost studiate și alte polimorfisme, unul în regiunea promotoare (G-395A), două în exonul 4 (C1818T/H589H, C2298T/A749A) și un polimorfism microsatelit la 10 kb mai jos de exonul 5 [293-295]. S-a demonstrat asocierea acestor polimorfisme cu durata vieții umane [292], cu osteoporoza [296] sau cu maladiile coronariene și accidentele cerebrovasculare [297, 298].

Bazându-ne pe efectele mutației genei Klotho asupra șoarecilor care au dezvoltat defecte de creștere după înțârcare și defecte ale maturării organelor genitale, noi am pornit de la ipoteza că genotipul Klotho poate constitui un factor determinant în dezvoltarea fiziologică a omului, și în special a nou-născutului, în copilărie și în perioada de pubertate. Pentru a pune în aplicare această ipoteză, noi am efectuat analize ale genotipului și studii de asociere în secțiune și longitudinale folosind mai multe polimorfisme nucleotidice unice ale genei Klotho (G395A, F352V, C1818T/H589H și C2298T/A749A) împărțite în patru cohorte mari cuprinzând un număr total de 779 copii sănătoși de rasă caucaziană, cu vârsta cuprinsă între perioada neonatală și adolescență.

4.2.1. Rezultatele genotipării polimorfismelor nucleotidice unice Klotho la fetele adolescente sănătoase

În I-a cohortă au fost studiate patru polimorfisme nucleotidice unice în gena Klotho (tabelul 4.5) ce-a inclus 221 de fete sănătoase din Franța cu vârsta între 11 și 23 de ani, cu o perioadă de 4 ani de supraveghere a creșterii, dezvoltării pubertare și achiziției masei minerale

osoase. Un polimorfism este localizat în regiunea promotoare (G-395A), iar celelalte trei în secvența codantă: una în exonul 2, care induce schimbări în structura aminoacizilor (F352V) și se află în legătură strânsă cu un alt polimorfism nucleotidic unic din exonul 2 C370S. Ultimele două polimorfisme sunt localizate în exonul 4 și nu cauzează substituția aminoacizilor (H589H, și A749A). Frecvențele alelice ale alelelor minore pentru aceste patru polimorfisme au fost următoarele: 0,148 pentru alela A la -395, 0,156 pentru alela G în locusul exonului 2 (F352V), 0,372 pentru alela C la +1818 (H589H), și 0,117 pentru alela T la +2298 (A749A). Acestea erau similare celor descrise de alți savanți în populațiile de rasă caucaziană (tabelul 4.5).

În toată cohorta au fost analizate asociațiile posibile între fiecare din aceste patru polimorfisme și trei particularități fenotipice ale dezvoltării pubertare: indicele masei corporale, un parametru antropometric ce joacă un rol critic în cronologia pubertății la om, vârsta la menarhă și vârsta la momentul opririi creșterii. Nu a fost identificată nicio asociere între aceste trăsături fenotipice și polimorfismele F352V și H589H, doar între IMC și polimorfismul G-395A a fost observată o asociere slabă. O corelație puternică a fost determinată între polimorfismul A749A și IMC, pe de o parte, și vârsta la menarhă sau vârsta la momentul opririi creșterii, pe de altă parte. Fetele purtătoare a alelei T minore aveau un IMC mai mic ($18,64 \pm 0,32$ față de $19,87 \pm 0,18$ kg/m²) la o vârstă medie de 15 ani. De asemenea, aveau o întârziere, în medie de 6 luni, a vârstei menarhei ($13,73 \pm 0,16$ ani față de $13,08 \pm 0,09$) și mai mult de un an întârziere a vârstei de oprire a creșterii ($16,11 \pm 0,30$ ani față de $14,94 \pm 0,13$ ani). Trebuie menționat că vârsta menarhei și cea de oprire a creșterii erau strâns corelate (R^2 ajustat: 0,360, $p < 0,0001$), însă polimorfismul A749A nu a influențat această corelație și nici durata perioadei de timp între menarhă și oprirea creșterii ($1,95 \pm 0,11$ și $2,10 \pm 0,24$ ani la fetele CC și CT+TT, respectiv).

Aceste rezultate ne-au sugerat necesitatea cercetării în studiile următoare a polimorfismului A749A și precizării impactului potențial al acestui polimorfism asupra creșterii și dezvoltării pubertare. În acest scop, am împărțit întreaga cohortă în 4 grupuri de vârstă: vârsta mai mică de 12 ani, 12-14 ani, 14-16 ani și mai mare de 16 ani (Figura 4.2). Între 12 și 16 ani, fetele cu alela T aveau valori semnificativ mai joase ale masei corporale (IMC) și o întârziere în dezvoltarea sânilor și a creșterii părului pubian, în comparație cu fetele cu genotipul CC. O astfel de asociere fenotipică nu a fost depistată la fetele mai mici de 12 ani sau mai mari de 16 ani. Maturizarea osoasă întârziată (vârsta scheletală minus vârsta cronologică) a fost depistată la fetele cu genotipul CT+TT în perioada de vârstă de 14-16 ani ($-1,13 \pm 0,34$ ani față de $-0,24 \pm 0,15$ ani, $p < 0,037$). Analizele de regresie au arătat corelații strânse între BMI la fetele între 12-14 ani și vârsta menarhăi (R^2 ajustat: 0,225, $p < 0,0001$), însă o corelație slabă sau absența ei între IMC

și maturizarea osoasă (R^2 ajustat: 0,092, $p < 0,015$), fie vârsta opririi creșterii (R^2 ajustat: 0,016, $p = 0,1752$).

Studiul de asociere între polimorfismul A749A și indicii biochimici a demonstrat lipsa asocierii cu markerii metabolismului calcic și statutul vitaminei D, cum ar fi valorile medii ale calciului seric, excreția calciului prin urină/creatinină, PTH seric și 25(OH)D seric. În mod similar, nu a fost depistată nici o asociere cu nivelul seric al osteocalcinei, IGF-1 seric sau activitate serică a fosfatazei alcaline. Însă, fetele cu genotipul CT+TT aveau întârziere semnificativă a încetinirii fosfatazei serice, precum și o creștere întârziată a creatininei serice în perioada pubertății, în comparație cu fetele cu genotipul C (Figura 4.2, tabelul 4.6).

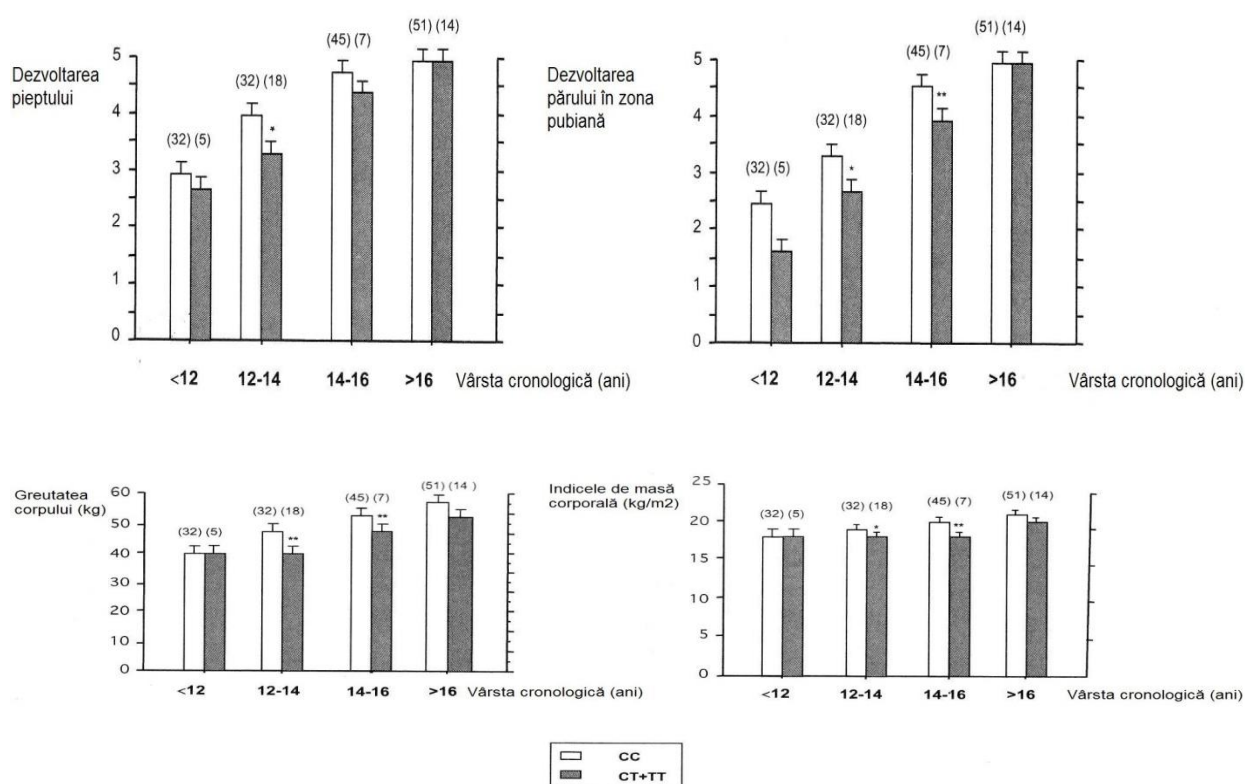


Fig. 4.2. Asociațiile posibile între fiecare din aceste patru polimorfisme. Datele sunt menționate în $\pm DS$ *, $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ față de aceeași vârstă a fetelor care poartă genotipul CC. (), numărul de fete în fiecare grupă.

Tabelul 4.6. Frecvența polimorfismelor Klotho și asocierea cu indicele de masă corporală la vârsta ciclului menstrual și la sfârșitul creșterii la adolescenții caucazieni.

Varianta Klotho		G-395A		F352V		H589H		A749A
Genotipul	GG	GA+AA	TT	TG+GG	CC	CT+TT	CC	CT+TT
Nr.	140	48	157	60	56	97	174	47
Vârsta (ani)	14.76±0.23	15.23±0.46 p>0.3329	14.94±0.22	15.15±0.36 p> 0.6149	14.39±0.37	14.49±0.29	15.04±0.21	14.95±0.42 p> 0.8502
Indicele de masă corporală (kg/m2)	19.24±0.19	20.01±0.37 p>0.051	19.63±0.19	19.56±0.31 p>0.606	19.28±0.35	19.43±0.42 p> 0.726	19.87±0.18	18.64±0.32 p> 0.0015
Vârsta la ciclul menstrual (ani)	13.26±0.09	13.25±0.18 p> 0.9425	13.25±0.09	13.09±0.15 p>0.3867	13.43±0.15	13.26±0.12 p>0.4103	13.08±0.09	13.73±0.16 p>0.0008
Vârsta la sfârșit de creștere (anul)	15.15±0.16 (n=65)	15.02±0.28 (n=18) p>0.7043	15.04±0.14 (n=70)	15.56±0.28 (n=21) p>0.0889	15.33±0.22 (n=28)	14.94±0.17 (n=49) p>0.1639	14.94±0.13 (n=72)	16.11±0.30 (n=20) p>0.0008

Tabelul 4.7. Asociația dintre polimorfismul Klotho A749A și datele biologice la adolescenții caucazieni.

	< 12 ani		12-14 ani		14-16 ani		>16 ani	
Genotipul Klotho n	CC 31	CT+TT 3	CC 34	CT+TT	CC	CT+TT	CC	CT+TT
	140	48	157	60	56	97	174	47
Ca seric (mmol/l)	2.51 $\pm$ 0.02	2.55 $\pm$ 0.03	2.53 $\pm$ 0.01	2.50 $\pm$ 0.01	2.50 $\pm$ 0.01	2.48 $\pm$ 0.02	2.45 $\pm$ 0.01	2.45 $\pm$ 0.02
P seric (mmol/l)	1.46 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.09	1.35 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.03**	1.26 $\pm$ 0.02	1.30 $\pm$ 0.07	1.22 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.03
Creatinina (mmol/l)	58.09 $\pm$ 1.52	57.33 $\pm$ 4.33	61.36 $\pm$ 1.25	54.16 $\pm$ 1.39**	67.35 $\pm$ 1.30	62.29 $\pm$ 2.99	73.95 $\pm$ 1.15	72.28 $\pm$ 2.02
25-(OH)D (ng/ml)	20.44 $\pm$ 1.74	20.67 $\pm$ 1.76	19.79 $\pm$ 1.31	23.94 $\pm$ 2.12	15.46 $\pm$ 0.99	17.83 $\pm$ 5.10	21.17 $\pm$ 1.48	19.73 $\pm$ 1.92
PTH (pg/ml)	26.85 $\pm$ 2.19	16.67 $\pm$ 3.18	27.27 $\pm$ 1.94	31.47 $\pm$ 3.15	31.47 $\pm$ 2.01	24.67 $\pm$ 3.95	23.08 $\pm$ 1.24	25.53 $\pm$ 2.25
ALP serică (U/ml)	368.45 $\pm$ 20.50	396.33 $\pm$ 37.1	341.58 $\pm$ 21.87	359.95 $\pm$ 20.06	183.51 $\pm$ 12.80	241.71 $\pm$ 32.35	87.94 $\pm$ 2.85	81.67 $\pm$ 6.90
Osteocalcin	140.81 $\pm$ 7.54	108.20 $\pm$ 19.55	116.57 $\pm$ 7.15	124.77 $\pm$ 7.88	71.24 $\pm$ 3.97	98.53 $\pm$ 7.23	39.92 $\pm$ 1.80	38.48 $\pm$ 3.12
IGFI (ng/ml)	431.2 $\pm$ 23.4	373.6 $\pm$ 38.3	521.7 $\pm$ 28.5	501.7 $\pm$ 26.6	512 $\pm$ 13.7	427.2 $\pm$ 37.5	424.6 $\pm$ 15.1	404.1 $\pm$ 26.7
Ca n/Creatinine n (mmol/mmol)	0.16 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.04

Supravegherea longitudinală a cohorței timp de 4 ani a confirmat datele despre asocierea între genotipul Klotho și datele antropometrice în timpul pubertății (Figura 4.3). Într-adevăr, cele 30 de fete cu vârsta mai mică de 16 ani (vârsta medie: 13 ani), purtătoare ale genotipului CT+TT, aveau un IMC mai mic decât cele 115 fete cu genotipul CC, ajustate după vârstă (Figura 4.4. A). Această diferență a rămas semnificativă și peste doi ani (la o vârstă medie de 15 ani), însă progresiv mai slabă. Supravegherea fetelor mai mari (vârsta peste 16 ani la începutul studiului) a demonstrat tendințe similare, însă nesemnificative, sugerând că IMC adult a fost atins la vârsta de 17 ani la fetele cu genotipul CC și mai târziu la cele cu genotipul CT+TT (Figura 4.4.B).

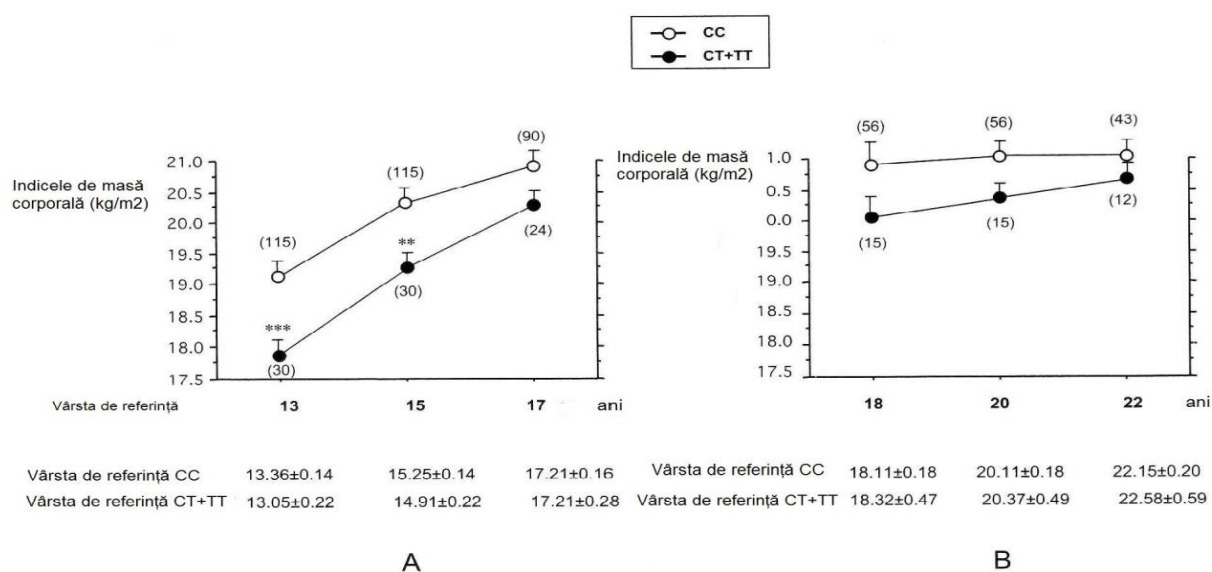


Fig. 4.3. Asocierea între genotipul Klotho și datele antropometrice în timpul pubertății.

A: Valorile de indice ale masei corporale au fost analizate potrivit genotipului Klotho la 145 fete la vârsta pubertății (12-16 ani) la T₁, T₁+2 ani și T₁+4 ani.

B: Valorile de indice al masei corporale au fost analizate potrivit genotipului Klotho la 71 fete la vârsta post-pubertății (peste 16 ani) și T₁, T₁+2 ani, T₁+4 ani. (), numărul subiecților pentru fiecare punct.

Sunt remarcate diferențe semnificative.

, $p < 0.02$; *, $p < 0.004$ în rezultatul comparației cu fetele purtătoare a genotipului CC de aceeași categorie de vârstă, folosind ANOVA (vederea 5.0).

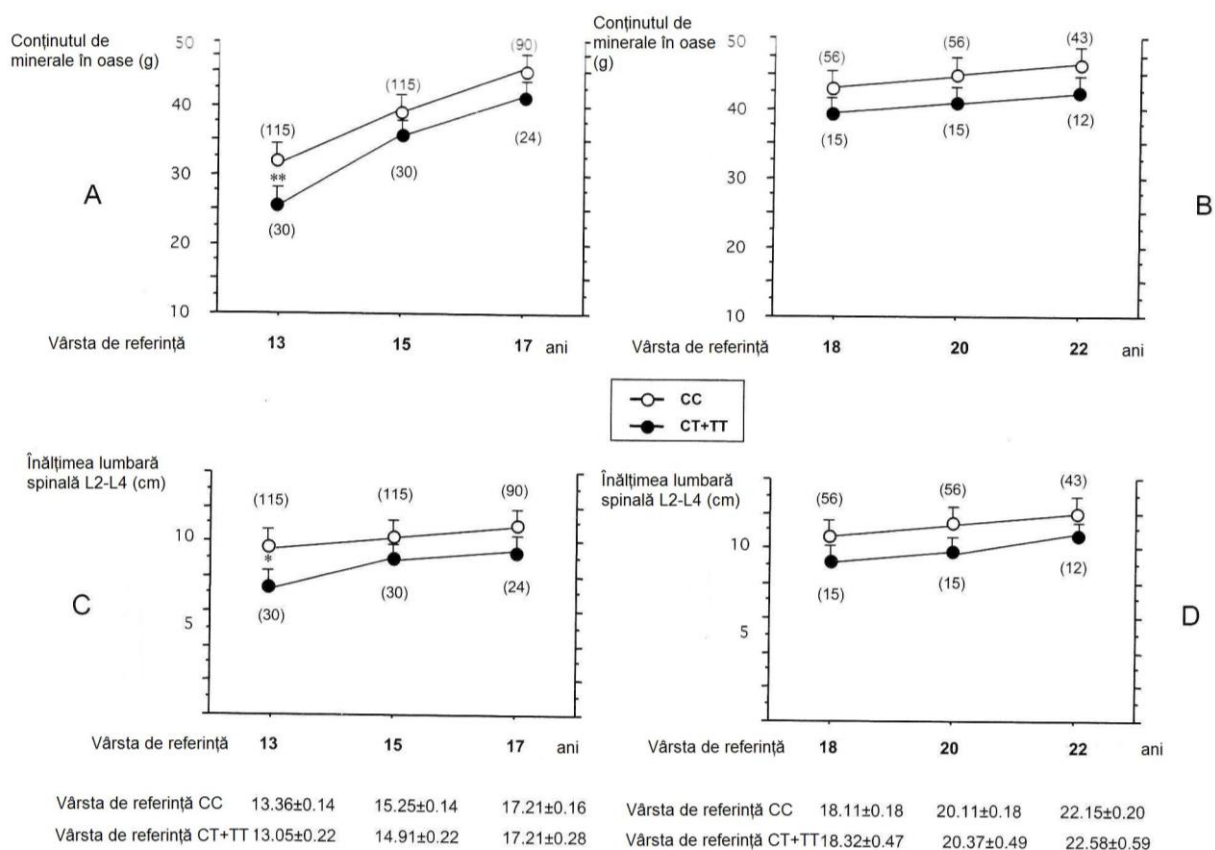


Fig. 4.4. Studiu de cercetare de patru ani a conținutului de minerale în oase și înălțimea lumbară spinală potrivit genotipului Klotho la fetele adolescente.

Valorile conținutului de minerale în oase și valorile înălțimii lombare spinale L2-L4 au fost analizate potrivit genotipului Klotho la 145 fete la vârsta pubertății (12-16 ani) (A, C), și la 71 fete la vârsta post-pubertății (peste 16 ani) (B, D) la T1, T1+2 ani și T1+4 ani.

Sunt remarcate diferențe semnificative.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.02$ pentru conținutului de minerale în oase sau înălțimea lumbară spinală, în rezultatul comparației cu fetele, purtătoare a genotipului CC de aceeași categorie de vârstă, folosind ANOVA (vederea 5.0).

Reieșind din importanța acumulării masei minerale osoase în perioada pubertății, conținutul mineral osos al vertebrelor lombare a fost analizat pe parcursul a 4 ani de supraveghere în legătură cu genotipul Klotho (Figura 4.4). Similar indicelui IMC, și alte trăsături ale pubertății precum conținutul mineral osos (CMO), înălțimea și aria suprafeței vertebrelor lombare L2-L4 și nu lățimea porțiunii lombare a coloanei vertebrale, au fost semnificativ mai mici la fetele purtătoare ale alelei T la o vârstă medie de 13 ani. Această diferență nu a fost observată mai târziu, pe parcursul supravegherii de 4 ani.

4.2.2. Genotiparea KL A749A în perioada de nou-născut, sugar și copilul mai mare.

Pentru a testa asocierea variantei KL A749A cu creșterea intrauterină a fătului, am analizat asocierea între polimorfismul A749A și datele antropometrice determinate și înregistrate la naștere în alte trei cohorte, care cuprindeau 558 de nou-născuți. În tabelul 10.3 nu s-a constatat o asociere semnificativă între genotip și termenul nașterii, greutatea corpului, înălțimea și IMC la nou-născuții la termen din toate cohortele studiate.

Luând în considerare faptul că rata creșterii este maximă în primii doi ani de viață, această perioadă a prezentat un interes particular pentru testarea ipotezei că A749A poate constitui un factor determinant al variabilității fiziologice a creșterii. Din acest motiv, am genotipat polimorfismul A749A în cohorta 2, care cuprindea 136 de copii sănătoși examinați la Centre des Bilans de Santé de l'Enfant (Paris, Franța), în cadrul examinării sistemice fizice și biochimice la vârsta de 10 luni sau la 2 ani. Frecvențele alelelor polimorfismului A749A, la subpopulația de origine nord-americană sau mixtă, au fost puțin diferite de cele înregistrate la copiii cu bunici europeni (CC 68,3%, CT 23,2%, TT 8,5%, față de CC 63,7%, CT 34,2%, TT 2,1%). Totodată, datele antropometrice la subiecții divizați în funcție de origine n-au fost diferite de cele înregistrate în întreaga cohortă (tabelul 4.5). Nu a fost depistată nicio asociere între genotipul Klotho și masa corporală, înălțimea, IMC la vârsta de 10 luni sau de 2 ani.

Cei 297 de copii și adolescenți recrutați din Republica Moldova (mun. Chișinău și or. Orhei) au fost genotipați pentru polimorfismul A749A. Distribuția genotipului în această cohortă a fost puțin diferită de cea observată la populația europeană, arătând o prevalență mai mare a alelei T (CC 72,6%, CT 21,9%, TT 5,5%). Nu a fost depistată nicio asociere între polimorfismul A749A și masa corporală, IMC sau înălțimea (tabelul 4.5). Aceste rezultate confirmă absența asocierii între genotipul Klotho și fenotip, depistată la fetele din prima cohortă - mai mici de 12 ani.

Tabelul 4.8. Antropometrie și polimorfismul Klotho A749A la nou-născuți, copii de vârstă primilor doi ani de viață și de vârstă mai mare.

Genotipul Nou-născuți:	Băieți		Fete	
	CC	CT+TT	CC	CT+TT
Termenul (săptămâna)				
cohorta 2	36.69±0.14 (n=54)	39.19±0.20 (n=19)	39.52±0.13 (n=50)	39.34±0.34 (n=13)
cohorta 3	39.52±0.08(n=107)	39.31±0.11 (n=45)	39.59±0.08 (n=90)	39.26±0.17 (n=31)
cohorta 4	39.85±0.14 (n=53)	39.81±0.28 (n=16)	39.64±0.13 (n=53)	39.81±0.23 (n=27)
Greutatea corpului (kg)				
cohorta 2	3.36±0.05	3.44±0.08	3.20±0.04	3.20±0.11
cohorta 3	3.52±0.64	3.14±1.12	3.27±0.95	3.06±1.27
cohorta 4	3.52±0.06	3.30±0.10	3.30±0.06	3.32±0.08
Înălțimea (cm)				
cohorta 2	50.42±0.20	50.00±0.39	49.37±0.25	49.31±0.63
cohorta 3	50.74±0.24	49.92±0.18	51.07±0.25	50.18±0.18
cohorta 4	50.08±0.24	49.40±0.48	49.28±0.30	49.77±0.39
IMC (kg/m2)				
cohorta 2	13.21±0.16	13.73±0.20	13.17±0.14	13.24±0.27
cohorta 3	12.08±0.11	12.13±0.19	12.25±0.15	12.02±0.20
cohorta 4	13.93±0.16	13.51±0.30	13.47±0.16	13.38±0.20
10 luni:				
Vârsta (luni)				
Greutatea corpului (kg)	9.94±0.08 (n=54)	9.96±0.11 (n=19)	10.09±0.08 (n=50)	9.95±0.20 (n=13)
Înălțimea (cm)	9.57±0.13	9.58±0.26	8.91±0.11	8.99±0.24
- IMC (kg/m2)	73.29±0.29	73.05±0.38	71.72±0.32	71.85±0.45
	17.79±0.20	17.92±0.40	17.31±0.16	17.39±0.39
24 luni:				
Vârsta (luni)				
Greutatea corpului (kg)	22.74±0.13 (n=49)	22.94±0.25 (n=20)	23.15±0.14 (n=41)	23.53±0.31 (n=12)
Înălțimea (cm)	12.78±0.22	12.68±0.37	11.94±0.17	12.02±0.43
IMC (kg/m2)	87.51±0.46	86.60±0.62	85.97±0.45	85.58±0.97
	16.65±0.20	16.86±0.36	16.17±0.22	16.36±0.39
4-9 ani:				
Vârsta (luni)				
Greutatea corpului (kg)	6.9±0.3(n=20)	7.0±0.4 (n=6)	7.2±0.4(n=17)	6.3±0.6 (n=8)
Înălțimea (cm)	22.30±0.93	23.91±1.59	22.10±1.10	21.40±1.82
- IMC (kg/m2)	119.41±1.91	120.00±2.61	123.26±2.90	116.75±3.56
	15.50±0.36	16.37±0.54	14.47±0.47	15.51±0.72
9-12 ani:				
Vârsta (luni)				
Greutatea corpului (kg)	10.5±0.1 (n=44)	10.7±0.2 (n=17)	10.6±0.1 (n=33)	10.7±0.3 (n=17)
Înălțimea (cm)	32.79±0.76	31.65±1.5	33.87±1.32	30.87±1.66
- IMC (kg/m2)	138.1±0.9	137.6±1.9	141.5±1.7	138.7±3.0
	17.13±0.30	16.68±0.59	16.75±0.38	15.97±0.59

Datele sunt menționate în ±DS. (), numărul de subiecte în fiecare grup.

4.3. Concluzii la capitolul 4

1. Studiul transversal ce-a inclus copiii și adolescenți europeni, care locuiesc la aceeași latitudine geografică (47 - 49°N), dar cu mod de viață și alimentar diferit, a remarcat că semnele clinice și biologice ale carenței vitaminei D pot fi observate la copiii și adolescenții aparent sănătoși, odată ce nivelul 25(OH)D este inferior sau egal cu 30 nmol/L și mai cu seamă când nivelul 25(OH)D este asociat cu aport insuficient de calciu/lapte.
2. Variantele specific caucaziene ale VDRp (- 1012A/G sau G/G) avansează riscul de apariție sau cel puțin riscul de hipocalcemie în cazul deficitului moderat de calciu/lapte (aportul mediu total de calciu la adolescent, de exemplu, fiind de 712mg/zi). Totuși, acest genotip nu pare să influențeze impactul negativ al concentrațiilor joase ale 25 – OHD, când aporturile calcice sunt foarte mici, ca în cazul copiilor din Gimnaziul Internat din or. Orhei (media de 400mg/zi).
3. Nivelurile serice ale 25(OH)D de 30 și 50 mmol/L evocă semne sugestive non-clasice pentru carența vitaminei D, doar o singură activitate scăzută a fosfatazei alcaline a putut fi scoasă în evidență la adolescentele franceze în raport cu adolescenții ce aveau valori ale 25(OH)D superior de 50mmol/L. În același timp, atunci când valorile 25 – OHD se află între 30 și 50 mmol/L comparat cu cel al copiilor ce aveau niveluri mai înalte, copiii și adolescenții din Gimnaziul Internat din Orhei n-aveau o incidență a diformităților osoase mai înaltă și doar un singur copil, în perioada de pubertate din această instituție, păstra o calcemie mai joasă.
4. Ponderea înaltă a valorilor joase ale 25(OH)D (mai jos de 30 nmol/L) și asocierea lor cu un risc sporit de a dezvolta semne carențiale ale vitaminei D, în cazul aporturilor scăzute de calciu, constituie o problemă de sănătate publică în Europa.
5. Valorile joase ale 25(OH)D (< 30 nmol/L) în perioada de iarnă – primăvară în Franța și Republica Moldova la copiii aparent sănătoși (20% - 41%) sunt similare cu cele observate la copiii ce locuiesc în alte regiuni ale Europei 16 – 51% (Danemarca, Finlanda, Polonia, Rusia, Grecia, Germania și Suedia. Astfel, putem constata că elaborarea și implementarea unei strategii naționale de îmbogățire a alimentelor sau suplimentarea cu vitamina D este inevitabilă, în perioada de creștere, în special în sânul populațiilor caucaziene.
6. Contrar publicațiilor existente, în studiul nostru nu au fost evidențiate asocieri semnificative între polimorfismul genei și înălțime, greutatea corpului și indicele masei corporale la nou-născuți, sugari, copiii mici și copii în perioada prepubertară.
7. Polimorfismul KL A749A poate influența acumularea masei corporale la fetele adolescente în perioada pubertară (12-16 ani), deoarece fetele adolescente cu genotipul CT+TT prezintă

o scădere a masei corporale, indicelui masei corporale și creatininei, care este un produs final al metabolismului fosfo-creatinic și reflectă masa musculară la subiecții cu o funcție renală normală.

8. Polimorfismul A749A cu IGF-1 circulant corelează doar retardul de creștere cu o greutate mai mică, fapt observat doar după înțârcare și la șoarecii homozigoți cu mutație a genei Klotho, dar nu s-au remarcat asocieri cu talia înainte, în timpul sau după perioada de pubertate.
9. Asocierile polimorfismului KL A749A cu masa corporală deficitară, în timpul pubertății, sunt simultane cu cele observate între acest polimorfism și indicatorii dezvoltării pubertare, a semnelor sexuale secundare (vârsta menarhăi, dezvoltarea sânilor și creșterea părului pubian). În acest context, atrofia organelor sexuale și infertilitatea au fost raportate la șoarecii cu defect Klotho, sugerând rolul ei în dezvoltarea și/sau diferențierea organelor reproductive la șoareci.
10. Admitem ca ipoteză influența genei Klotho asupra dezvoltării pubertare prin efectul său asupra diferențierii adipocitelor și acumularea masei corporale, deoarece este pe deplin acceptat faptul că un nivel minim al masei corporale grase este necesar înainte de a începe pubertatea feminină și pentru că vârsta menarhăi a fost strâns legată de IMC la fetele între 12 și 14 ani în acest studiu.
11. Polimorfismul KL A749A a fost, de asemenea, asociat cu creșterea particulară a scheletului în perioada de pubertate, în special cu conținutul mineral osos, maturizarea osului și vârsta de oprire a creșterii.
12. Deficitul masei minerale osoase la fetele adolescente în perioada de pubertate purtătoare ale genotipului CT+TT a fost înregistrată paralel cu valori scăzute ale înălțimii și suprafeței vertebrelor lombare.
13. Nu a fost determinată nicio asociere a genotipului cu markerii metabolismului osos (osteocalcina și activitatea fosfatazei alcaline) și nici cu markerii metabolismului calcic. Acest fapt denotă, că gena Klotho nu influențează procesul de mineralizare osoasă, dar are impact asupra proceselor de creștere și maturizare osoasă. Această influență nu este rezultatul acțiunii directe asupra celulelor responsabile pentru creșterea osoasă (condrociții și osteoblaștii din lamela de creștere), deoarece maturizarea osoasă și vârsta de oprire a creșterii sunt strâns corelate cu vârsta menarhăi, iar polimorfismul Klotho nu a modificat această relație. Aceste date corespund rezultatelor studiilor precedente care nu au demonstrat expresia genei Klotho (Klotho) în celulele osoase.

14. Datele însumate ale acestui studiu, confirmă rolul genei *Klotho* în dezvoltarea pubertară a fetelor sănătoase. Reglarea hormonală a perioadei de pubertate este deosebit de complexă deoarece ea presupune interacțiune între secreția steroizilor sexuali (estradiol, testosteron), secreția pulsatilă hipotalamică a hormonului eliberator a gonadotropinei (GnRH) și a gonadotropinelor pituitare FSH și LH. Un șir de date științifice pun în discuție interacțiunea potențială a genei *Klotho* cu hormonii modulatori ai dezvoltării pubertare. Astfel, deficiența mutația genei *Klotho* la șoareci duce la atrofia organelor reproductive prin dereglarea axului hipotalamo-hipofizar, cu scăderea producerii atât a FSH, cât și a LH de către glanda pituitară. Deasemenea, *Klotho* poate influența direct metabolismul hormonilor sexuali prin intermediul β -glucuronidazei capabile de a hidroliza β -glucuronidele steroide cum ar fi β -estradiolul, estronul 3β și estriolul 3β -D-glucuronidele. Totuși, mecanismul prin care *Klotho* interacționează cu hormonii sexuali, hipotalamici și hipofizari rămâne a fi necunoscut.
15. Acest studiu reflectă și faptul, că dintre cele patru polimorfisme *Klotho* analizate, în acest studiu, doar polimorfismul A749A a fost asociat cu dezvoltarea sexuală și creșterea fetelor adolescente. Acest polimorfism nucleotidic unic silențios a fost identificat în exonul 4, localizat în a doua repetare internă a domeniului extracelular al genei *Klotho* și este absent în forma predominantă secretată la oameni, în care lipsește repetarea secundară internă. Aceasta înseamnă că asocierea genotipului cu dezvoltarea pubertară observată în acest studiu ar putea fi rezultatul interacțiunii între forma membranară a genei *Klotho* și hormonii reglatori ai pubertății în țesuturile cu expresie a genei *Klotho*. Pe parcursul deceniilor mutațiile silențioase erau considerate lipsite de efect asupra funcției proteinelor rezultante, deoarece ele nu influențau ordinea aminoacizilor în proteine. Descoperirile recente arată, că polimorfismele silențioase pot afecta structurarea proteinelor în conformații tridimensionale, ceea ce, la rândul său, afectează funcția lor. De exemplu, o mutație silențioasă a genei polirezistenței la medicamente (MDR1 – multidrug resistance gene 1) poate modifica abilitatea proteinei de a lega anumite medicamente. De asemenea, mutațiile silențioase pot afecta procesul de control al splicingului sau a transcripției, după cum a fost raportat de către Fernandez-Cadenas și colaboratorii, prin intermediul unui polimorfism silențios în gena miofosforilazei [311].
16. Sunt necesare investigații suplimentare în scopul elucidării consecințelor polimorfismului silențios A749A asupra conformării tridimensionale a proteinei *Klotho* și a funcției sale.

5. ROLUL POLIMORFIZMULUI GENETIC AL LACTAZEI ÎN DEZVOLTAREA INTOLERANȚEI COPIILOR LA LACTOZĂ

5.1. Particularitățile genei Lactazice (LCT)

Copilăria și adolescența sunt perioade cruciale în sănătatea osoasă. Interesul produselor lactate și al statutului vitaminei D ($25(\text{OH})\text{D}_3$) constă în acțiunea lor fortifiantă și protectivă asupra masei și densității osoase. Existența variațiilor genetice asociate cu hipolactazie (-13910 pb a genei Lactazice – LCT) ar putea influența consumul de lapte și mineralizarea osoasă.

În general, este acceptat faptul că laptele și produsele lactate, ca urmare a conținutului ridicat de calciu și contribuția la creșterea și mineralizarea scheletului la copii, constituie principala sursă de calciu în alimentație. Situația se complică atunci când subiecții sunt intoleranți la lactoză.

Persistența lactazică este definită de către savanți ca o continuare a activității enzimei lactazice la adult. Pînă în prezent este cunoscut că lactaza are o singură funcție și anume cea de a digera lactoza din laptele mamiferelor consumat. La majoritatea speciilor de mamifere, activitatea enzimei este dramatic redusă odată cu înaintarea în vârstă (1). Totuși la unele populații umane s-a constatat o persistență a lactazei (2) ca rezultat al consumului zilnic al laptelui/produselor lactate și adaptării organismului în timpul copilăriei. Majoritatea popoarelor rămîn lactaz non persistente (1) și ca urmare se constată diferite variații ale gradului de intoleranță a lactozei la adult. Doar o parte din ei sunt genetic intoleranți la lactoză cu alelele respective. Multiplele studii efectuate pînă în prezent, indică că persistența a două fenotipuri: „lactaz persistent” și „lactaz non persistent” (hipolactazia) sunt genetic programate, iar persistența ei, pare a nu fi necesară la adult după o anumită vârstă (3,4). Fenotipul lactaz persistent presupune o înaltă expresie a ARNm, o activitate mărită a lactazei și o abilitate sporită a organismului de a digera lactoza. Pe de altă parte, fenotipul lactaz non persistent presupune o expresie micșorată a ARNm și o activitate scăzută a lactazei (5). În capitolul respectiv am familiarizat cititorul cu locul unde este situată gena, polimorfismul ei genetic și structura genetică a genei lactazice (LCT). Prin urmare, enzima lactazică este exprimată de către gena LCT (3). De menționat că hipolactazia este autosom recisivă, caz în care subiecții cu fenotipul non – persistent sunt homozigoți și moștenesc două copii ale genei lactazice de la ambii părinți, care la rîndul lor pot fi homozigoți sau heterozigoți (3). Astfel, doar o genă activă a lactazei este suspectă de a fi lactaz persistentă, deoarece lactaz persistența este dominantă asupra hipolactaziei (3,4). Este cert că lactaz persistența are trăsături dominante deoarece știința a dovedit că doar

jumătate din nivelul activității lactazei este suficient de a digera lactoza (1). Transcripția silențioasă Cis-acting a genei lactazice este responsabilă de fenotipul hipolactaziei (3,4). Mai mult decât atât, cercetările au demonstrat că în 8 cazuri supuse unui studiu, în care par cei ai căror părinți erau în copilărie lactaz persistenți, nu s-a găsit nici o dovadă de modificare/adaptare ca răspuns la consumul de lactoză (1). În prezent sunt cunoscute două fenotipuri distincte ale hipolactaziei: fenotipul I, care se caracterizează prin reducerea sintezei de precursor LPH în timp ce mecanismul de activitate a lactazei este scăzut și fenotipul II care este asociat cu sinteza amplă a precursorului, dar care are o conversie redusă a proteinei pentru forma moleculară matură a ei (6). Enzima lactazică are două zone active: prima este Glu1273 iar a doua este Glu1749, care scindează separat lactoza în două tipuri distincte de molecule (1). Completând informația expusă despre polimorfismul genetic al LCT, dorim să menționăm repetat că până în prezent sunt cunoscute două mutații ale SNP (polimorfism singur nucleotide) și care s-au dovedit a fi asociate cu expresia lactazei. S-a constatat că C-13910 (C la poziția -13910 în amonte de gena LCT) și G-22018 (G în poziția -22018) sunt legate de lactază fără persistență ei în timp ce T13910 și A-22018 sunt legate de persistența lactazei (3). Studiile au demonstrat că gena lactazică are o expresie mai sporită atunci când T-13910 și A-22018 sunt prezente și o exprimare mai redusă atunci când C-13910 și G22018 sunt prezente. [313] T-13910 este un stimulent mai mare decât C-13910, astfel încât se crede că această mutație este responsabilă pentru diferențele de exprimare a lactazei (7), deși nu există suficiente dovezi pentru a demonstra că persistența de lactază este cauzată doar de T -13910. [313] Într-un studiu care a implicat un grup finlandez, a fost găsit un SNP CT la -14 kb la toate persoanele lactaz persistente și absent la toate persoanele cu hipolactazie. Joel Hirschorn [314] de la Școala Medicală de Sănătate Publică din Harvard a descoperit că persistența lactazică se datorează prezenței unui haplotip compus din mai mult de 1 milion de perechi de baze nucleotidice. Prezența acestei gene cauzează persistența lactazei. Astăzi, acest haplotip poate fi găsit la 80% dintre europeni și americani de origine europeană. Pe de altă parte, procentul de populație persistent la lactază în Africa sud-sahariană și Asia de Sud-Est este foarte scăzut. Haplotipul în cauză s-a dovedit a fi absent la poporul bantu din Africa de Sud și la mai multe etnii din China [314]. Aceste distribuții geografice corelează puternic cu răspândirea de bovine domestice de către popoarele lumii. Geneticienii au constatat că în urmă cu aproximativ 5.000 - 10.000 de ani [9] acest haplotip a intrat sub presiune selectivă foarte puternică. De fapt, această perioadă coincide cu creșterea consumului de lapte/produse lactate. Deoarece produsele lactate își au originea în Europa, europenii au fost primii care au fost expuși la creșterea nivelului de lactoză în nutriție furnizat de către produsele lactate. Fapt ce a dus la o selecție naturală pozitivă [315], foarte importantă pentru supraviețuirea istorică a popoarelor din

Europa. Prin urmare, aprovizionarea cu lapte proaspăt duce la favorizarea lactaz persistenței. Odată cu extinderea și dezvoltarea intensă a agriculturii pe tot globul pământesc, după separarea populațiilor Europei derivate din populațiile asiatice și africane, și după colonizarea Europei, [316], a avut loc o selecție puternic pozitivă ducând la răspândirea globală a persistenței lactazice. Și totuși, apare întrebarea: în cazul în care expresia LCT nu mai este necesară după copilărie, de ce la unii indivizi ea totuși a persistat? Științii au demonstrat că expresia de persistență a lactazei se datorează în mare măsură selecției naturale iar aceasta, la rândul său, este o componentă a evoluției unde o trăsătură afectează șansele de supraviețuire a organismelor, și, în consecință, trăsătura devine mai răspândită de-a lungul timpului în sânul populației. În Europa, în special, polimorfismul genetic -13910 varianta T a fost puternic asociat cu persistența lactazică și a fost favorizată de selecția naturală din ultimii 10.000 de ani. [317] Într-adevăr, consumul de lactoză scade cu vârsta la adult. În 2009 British Heart și Health Study [315] a investigat impactul alelelor ce codifică persistența lactazei asupra sănătății femeilor. În cazul în care alela C, indicator de lactază nonpersistență și alela T indicator de lactază persistență, răspunsul asupra sănătății era distinct. Astfel, s-a constatat că femeile care au fost homozigote pentru alela C aveau o sănătate mai slabă decât femeile cu alelele C și o alelă T și mai ales decât cele ce posedau două alele T. Femeile raportate cu prezența alelelor CC au suferit multe fracturi de șold și de mână cauzate de osteoporoză precum și de mai multe cataracte decât în cazul celorlalte grupuri populaționale de femei [318]. De asemenea, la ele s-a constatat o talie mai joasă în medie cu 4-6 cm decât la celelalte femei, precum și o greutate corporală mai mică [13] În plus, factori cum ar fi trăsăturile metabolice, statutul socio-economic, stilul de viață și de fertilitate s-au dovedit a nu avea legătură cu constatările sus-menționate. Prin urmare, se poate concluziona că persistența lactazei are efect benefic asupra sănătății acestor femei. Dovezi că lactază persistența a fost favorizată de selecția naturală au fost aduse într-un studiu din 2006. [319] Procesul de analiză a constatat dezechilibrul de legătură a alelelor MF ancestral extinse. Cercetătorii au concluzionat că aceasta reflectă de fapt selecția pozitivă a persistenței lactazei. S-a raportat de asemenea că persistența lactazei prezintă presiune de selecție mai puternică decât orice altă genă umană cunoscută [313]. Malabsorbția lactozei este tipică pentru mamiferele adulte, iar lactază persistența este un fenomen probabil legat de interacțiunile umane cu laptele. Cele mai multe mamifere pierd capacitatea de a digera lactoza odată ce acestea sunt de un timp îndelungat în căutarea propriei surse de hrană, fiind departe de mamele lor. [320] După înțârcare și trecerea la consumul altor tipuri de alimente, subiecții își pierd capacitatea de a produce lactază, ultima diminuând progresiv, deoarece nu mai este necesară. Într-un studiu efectuat la Universitatea din Statul Ohio, de exemplu, s-a constatat că purceii de vârstă cuprinsă între cinci

și optsprezece zile, au pierdut 67% din capacitatea lor de a digera lactoza [321]. În timp ce aproape toți oamenii pot digera lactoza în mod normal în primii 5 - 7 ani de viață, [320]. Foarte multe mamifere nu mai produc lactaza mult mai devreme. Vițeii pot fi înțărcați, de exemplu, începând cu vârsta de 6 sau 12 luni de viață [322]. Mieii sunt înțărcați în mod regulat, la o vârstă de aproximativ 16 săptămâni [323]. Aceste exemple sugerează că persistența lactazei este un fenomen unic doar la ființa umană. În prezent știința nu dispune de date fiabile și suficiente referitor la particularitățile poporului mongol în această privință, dar se estimează că persistența lactazei la ei este foarte frecventă, fiind cunoscut faptul că este un popor nomad, alimentația de bază constituind-o laptele și produsele lactate. Mai mult decât atât, chiar băuturile alcoolice la ei sunt fabricate din laptele de iapă (cumâsul). Nivelurile de intoleranță la lactoză, de asemenea, cresc odată cu vârsta. La vârsta de 2-3 ani, 6 ani, și 9-10 ani, ponderea de intoleranță la lactoză este, respectiv: - de la 6% până la 15% la americanii de culoare albă și nord-europeni; - de la 18%, până la 30% - 47% la americanii mexicani; - de la 25%, până la 45%, - 60% la negrii din Africa de Sud; - aproximativ 10%, 20%, și 25% la chinezi și japonezi; - 30-55%, 90%, și > 90% la metișii din Peru [324, 325]. Populația chineză și japoneză pierde de obicei între 20 și 30 la sută din capacitatea lor de a digera lactoza în termen de trei până la patru ani după înțarcare. Unele studii au constatat că un număr mare de japoneze pot consuma 200 ml de lapte neprocesat, fără a manifesta simptome severe de intoleranță la lactoză (Swagerty et al., 2002). [326]. Evreii Ashkenazi pot menține 20-30 la sută din capacitatea lor de a digera lactoza timp de mai mulți ani. [327, 328, 324]. Până la 10% din populația Europei de Nord, care dezvoltă intoleranță la lactoză au un proces gradual răspândit de mai mult de 20 de ani [329]. Capacitatea de a digera lactoza la maturitate (persistența lactazică) ar fi fost utilă pentru oameni numai după ce s-au ocupat cu creșterea animalelor și domesticirea speciilor de animale care să le ofere o sursă consistentă de proteine animaliere. Populațiile de vânători, trăitori înainte de revoluția neolitică, au fost extrem de intoleranți la lactoză [330, 331]. Studiile genetice sugerează că cele mai vechi mutații asociate cu persistența lactazică a atins doar un nivel apreciabil în populațiile umane din ultimii zece mii de ani. [331] Prin urmare, persistența de lactază este adesea citată ca un exemplu de evoluție umană recentă [332, 54] și, în calitate de lactaz persistență care este, fără îndoială, trăsătura genetică favorizată de domesticirea și creșterea animalelor. O trăsătură culturală, deci, de coexistență și simbioză om-animal inițiată odată cu apariția agriculturii [334]. Au fost identificați mai mulți markeri genetici pentru lactaz persistență, care arată la rândul lor, că alela are mai multe origini în diferite părți ale lumii (adică este un exemplu de evoluție convergentă) [335]. Varianta alelei mai comună printre europeni a apărut cu aproximativ 7500 de ani în urmă în centrul Balcanic și al Europei Centrale, de unde, cel mai probabil, că s-a răspândit spre est

până în India. Una dintre cele patru alele asociate cu persistența de lactază a populației din Africa, este probabil, la fel, de origine europeană [335]. Din Nordul Africii, popoarele care prezintă această variantă, alele date, s-au răspândit în Orientul Apropiat. Cei mai vechi fermieri nu au avut o activitate înaltă a lactaz persistenței și, ulterior, nu au consumat cantități semnificative de lapte neprocesat [336]. Persistența lactazei, mai devreme sau mai târziu s-a răspândit în Africa sub-sahariană dar care au avut aproape la sigur o origine separată, probabil, mai mult de una, [337] și posibil că a existat o origine separată asociată cu domesticirea cămilelor arabe. [338] Nici una dintre mutațiile identificate până în prezent nu s-au dovedit a fi cauza pentru alela de lactaz- persistență și cert este că rămâne încă mult de descoperit în această privință [339]. Procesele evolutive de răspândire rapidă a persistenței lactazice în sânul unor populații anumite nu sunt încă cunoscute [335]. În unele grupuri etnice din Africa de Est lactaz - persistența a trecut de la o incidență neglijabilă, la frecvențe mai mari, sugerând o presiune selectivă foarte puternică [333]. Unii autori români au constatat că populațiile din nordul Europei, în special din Marea Britanie și Germania, au consumat foarte mulți ani lapte neprocesat. Acest lucru corelează foarte strâns cu distribuirile europene moderne a intoleranței la lactoză. Anume din aceste considerente, populația din Marea Britanie, Germania, Scandinavia și alte țări, au o toleranță înaltă în timp ce cele din sudul Europei, în special Italia, au o toleranță mai mică [812]. În reviuul literaturii, noi am menționat că Enattah și colaboratorii săi [12] au studiat gena LCT situată în apropierea locus-ului 2q21 la mai multe generații din 9 familii finlandeze (haplotipii și dezechilibrul de legătură). Ca rezultat, savanții au identificat două variante polimorfice în cadrul a doi introni (13 și 9) a genei MCM6 care precede gena LCT. Aceste variante sunt situate în – 13 910 (C/T) și – 22018 (G/A) în raport cu gena de lactază. Variantele din – 13 910 au fost asociate cu o persistență (T/T sau C/T) sau fără aceasta (C/C) a activității lactazice evaluate cu ajutorul LTTE (lactose tolerance test with ethanol). Asocierea a fost confirmată la mai mulți pacienți ce depășeau vârsta de 20 ani prin măsurarea activității disaharidazei (lactazei/ invertazei) în biopsiile de jejun. Această asociere de genotip/fenotip a fost mai apoi confirmată prin măsurarea activității diferitelor enzime, în special a lactazelor, zaharazei și maltazei, în biopsiile intestinale recoltate de la 329 copii consultați în una din secțiile de gastroenterologie [340, 341]. Astfel a fost observată o corelație directă dintre genotipul – 13 910 C/C și o activitate redusă a lactazei (< 10 U/g de proteine) la populația europeană și africană. În plus, s-a observat o corelație strânsă dintre genotip/răspuns la testul de expulzie a hidrogenului la 123 de copii, inclusiv 30% dintre care aveau genotipul C/C. Bunăoară, 97% de copii C/C și doar 14% de copii C/T sau T/T avuseră răspuns pozitiv la testul H2 [378, 379]. Variantele asociate unei persistențe a lactazei în – 13 910 (T/T și C/T) și în – 22018 (A/A

și A/G) a genei pentru lactază fac în esență parte din haplotipul imens de mai mult de 1 Mb care a fost găsit la 77% din populația europeană, sugerând o selecție recentă (5.000 până la 10.000 ani) a populației tolerante la lactoză [342, 343, 344, 345]. Dimpotrivă, genotipul favorabil (mai ales alela T din – 13910) se întâlnește rar la populația africană, inclusiv și la cei care nu suferă de malabsorbția gravă a lactozei [342, 345]. Existența unui alt polimorfism (–13915 T/G) în sânul acestor populații ar putea explica această discordanță, deoarece o asociere dintre un SNP în–13915 de rând cu persistența lactazei a fost observată la populația africană cunoscută ca lipsită de problema malabsorbției lactozei [342, 343, 346]. În definitiv, pare evident că analiza polimorfismului în poziția – 13910 poate fi utilizată ca marker a deficienței lactazice. Totuși este important de a nu considera sigure aceste rezultate, întrucât în aceste studii n-a fost implicată populația Europei de Nord [63]. La tema abordată am găsit doar 3 surse, dintre care una publicată în 2007, la care noi am avut acces doar la rezumat [64]. În două studii efectuate asupra 234 de bărbați cu vârsta cuprinsă între 18 și 20 ani din Finlanda [65] și 239 bărbați în vârstă de 61 ± 9 ani din Austria [64], nu a fost găsită vreo asociație între genotip și semnele osoase (densitatea minerală osoasă și markerii biologici de resorbție). Echipa austriacă emite ipoteza cum că bărbații beau mai puțin lapte și sunt prin urmare mai puțin sensibili la prezența sau absența genotipului C/C și, deci, și la un deficit sau nu de lactază [64]. Ipoteza n-a fost confirmată în studiul finlandez referitor la bărbații tineri, deoarece singurul aport de calciu sub formă de băuturi este de 400 mg/zi la bărbații C/C și de 800 mg/zi la bărbații cu C/T și T/T. În această cohortă, aportul total de calciu depășește 800 mg/zi chiar și la subiecții considerați că au „malabsorbție” deoarece sunt purtători ai genotipului C/C [65].

Referitor la simptomele clinice ale intoleranței lactozei am inclus într-un studiu aceiași copii și adolescenți din orașul Chișinău (71 elevi) și cei din Gimnaziul Internat din Orhei (226 elevi). În baza chestionarului întocmit, am evaluat 4 simptome (dureri/crampe abdominale, vome, flatulență, episoade de diaree), anamneza personală și familială. Am constatat că cele mai frecvente simptome le prezentau copiii și adolescenții din Gimnaziul Internat din Orhei și anume: episoadele de diaree erau semnificativ mult mai frecvente la subiecții din Orhei (21,68%), vomele (26,68%) și 4,22% la cei din Chișinău, inclusiv 2-3 episoade diareice/ an la 7,96% la elevii din Orhei și doar 1,40% la cei din Chișinău. Totodată, am constatat că voma legată direct de consumul de lapte integral de vacă la copiii din Gimnaziul Internat din Orhei constituia 4,86% și doar 1,40% la cei din Chișinău. Cel mai frecvent simptom, flatulența 40,84% la copiii din Chișinău și respectiv 53,53% la cei din Orhei, inclusiv la 34,07% de elevi din Orhei. Flatulența s-a dovedit legată direct de consumul de lapte integral de vacă (29,57% la cei din

Chișinău). Apariția flatulenței după consumul altor produse lactate decât laptele, era mai frecventă la copiii din Chișinău (11,26%) față de cei din Orhei (9,73%).

Referindu-ne la anamneza personală, am constatat că ea e mult mai agravată la copiii din orașul Chișinău care au fost spitalizați în SCMC nr.1 în legătură cu diferite boli acute ale aparatului respirator. Deci, am constatat că 4,22% din ei sufereau de astm, 18,30% de diferite alergoze respiratorii cum ar fi rinita alergică, laringita alergică etc. La copiii din Gimnaziul Internat din Orhei aceste afecțiuni erau mult mai rar întâlnite (alergoza respiratorie – 0,44%, urticariile recidivante, fiind la ei mai frecvente – 14,60%), dar mai rare decât la cei din Chișinău – 29,57%). Intoleranța laptelui de vacă și alte bovine la copiii din Chișinău s-a constatat în total în 9 cazuri (12,67%), pe când la rudele elevilor din Gimnaziul Internat din Orhei această cifră era de 19 (8,40%). Nu este exclus ca această cifră să fie mai înaltă la cei din Orhei, însă majoritatea acestor copii proveneau din familii vulnerabile social, incomplete. În aceste cazuri anamneza este dificil de stabilit și chiar imprecisă. Mai mult, unii părinți sufereau de diferite boli psihice cronice (alcoolism, stări maniacal - depressive...) nefiind capabili să ne furnizeze informația solicitată. Bineînțeles că aceste manifestări digestive puteau fi cauzate de infestațiile cu helminți, frecvent întâlnite la ei, predominant la copiii din Gimnaziul Internat din Orhei, dar totuși, apariția lor în unele cazuri după consumul laptelui și/sau produselor lactate și anamneza personală ca și cea familială, ar putea pleda în favoarea intoleranței lactozei (tabelul 5.1.).

Tabelul 5.1. Ponderea simptomelor clinice la copiii din IMSP SCMC nr. 1 din Chișinău și Gimnaziul Internat din Orhei referitoare la intoleranța lactozei

Nº D/O	Manifestările clinice evaluate	Eșantionul I din Chișinău n = 71	Ponderea %	Eșantionul II din Orhei n = 226	Ponderea %
1.	Dureri abdominale:	3	4,22	9	3,98
1.1.	- rare (o dată în lună)	2	2,81	1	0,44
1.2.	- recidivante	2	2,81	5	2,21
1.3.	- zilnic	0	0	1	0,44
1.4.	- o dată în săptămână	1	1,40	1	0,44
1.5.	- o dată în lună	1	1,40	1	0,44
1.6.	- matinale	1	1,40	0	0
1.7.	- postprandiale	1	1,40	2	0,88
1.8.	- după consumul de lapte Integral	1	1,40	6	2,65

1.9.	- după consumul de produse lactate (biscuiți din lapte, ciocolată cu lapte, smântână, brânză/cașcaval...)	0	0	3	1,32
2.	Diaree	3	4,22	49	21,68
2.1.	- un episod în an	1	1,40	26	11,50
2.2.	- 2-3 episoade/an	1	1,40	18	7,96
2.3.	- 4-5 episoade /an	1	1,40	3	1,32
2.4.	- mai frecvent de 5 episoade/an	0	0	2	0,88
2.5.	- după consumul de lapte Integral	1	1,40	11	4,86
2.6.	- după consumul de produse lactate (biscuiți din lapte, ciocolată cu lapte, smântână, brânză, unt)	1	1,40	7	3,09
3.	Vome	4	5,63	14	6,19
3.1.	- după consumul de lapte Integral	3	4,22	7	3,09
3.2.	- după consumul de produse lactate (biscuiți din lapte, ciocolată cu lapte, smântână, brânză, unt)	0	0	2	0,88
3.3.	- necauzate de consumul de lapte/produse lactate	1	1,40	5	2,21
4.	Flatulență	29	40,84	121	53,53
4.1.	- după consumul de lapte Integral	21	29,57	77	34,07
4.2.	- după consumul de produse lactate (biscuiți din lapte, ciocolată cu lapte, smântână, brânză, unt)	8	11,26	22	9,73
5.	Anamneza personală				
5.1.	- Astm	3	4,22	0	0
5.2.	- Alergoză respiratorie	13	18,30	1	0,44
5.3.	- Urticarii recidivante	21	29,57	33	14,60
5.4.	- Intervenții chirurgicale la intestin	1	1,40	2	0,88
6.	Anamneza familială				

6.1.	- Intoleranța laptelui la Mamă	2	2,80	11	4,86
6.2.	- Intoleranța laptelui la tată	1	1,40	2	0,88
6.3.	- Intoleranța laptelui la frați/surori	2	2,80	5	2,21
6.4.	- Intoleranța laptelui la bunici	1	1,40	1	0,44
6.5	- Intoleranța laptelui la alte rude (a specifica)	1	1,40	0	0

5.2. Polimorfismele genetice ale LCT

Investigațiile genetice ce vizau cunoașterea frecvenței polimorfismelor genetice LCT, corelând rezultatele obținute cu nivelul calciului corijat, polimorfismul genei Klotho și VDR a cohortelor de referință franceză, unde sunt ilustrate și unele rezultate referitor la creșterea și mineralizarea osoasă a 128 adolescenți, supravegheați pe parcursul a 4 ani, care prezentau sau nu marker asociați unei deficiențe în lactază. Pentru a studia mai profund situația în rezultatele obținute cu nivelul calciului corijat, cauză, am efectuat investigațiile genetice polimorfismul genei Klotho și nivelurile serice ce vizau cunoașterea frecvenței statutului scăzut al 25-(OH) D (tabelul 5.2.).

Tabelul 5.2. Frecvența polimorfismelor la nivel de promotor al lactazei -13910, cloto și VDR

Cohortele	-13910 LCT		Klotho A749A		VD Rp		
	C C	CT+TT	C C	CT+TT	0 Hap1	1 hap1	2 hap 1
Chișinău	44%	56%	71%	29%	23%	62%	15%
Orhei	26%	74%	72%	28%	35%	44%	21%
ISOS (cohorta franceză)	32%	68%	78%	21%	27%	54%	20%

Prin urmare, din tabelul de mai sus reiese că varianta CC a polimorfismului lactazei este nesemnificativ diferit în toate cele 3 cohorte studiate, fiind mai jos în Orhei și mai înalt la copiii din Cișinău, aceasta fiind posibil din cauza unui număr relativ al participanților la studiu. Aceeași situație constatăm la celelalte gene studiate.

Totuși, putem spune că nivelurile serice ale 25-(OH)D3 sunt stabil, nesemnificativ leger scăzute la subiecții CC pentru lactază. În același timp, există o situație de frecvență inexplicabilă pentru noi la copiii mai mici de 12 ani din Gimnaziul Internat din Orhei unde stabilim că există doar un CC pentru 75 CT-TT. Totodată, nu constatăm nici un efect al genei cloto și al VDR în cazurile cohortelor studiate.

Calcemia corijată, regroupînd copiii după nivelurile serice ale 25-(OH)D3: copiii cu deficiență a vitaminei D (<12ng/ml), cu niveluri insuficiente (12-20 ng/ml) și nivel seric suficient (≥ 20 ng/ml). Deci, elevii din Gimnaziul Internat din Orhei au avut un aport nutrițional slab în calciu, deoarece calciul corijat este semnificativ mult mai jos, anume acolo unde nivelul 25-(OH)D3 este cel mai mic. Mai precis, acest efect se manifestă la indivizii care prezintă polimorfismele CT+TT ale lactazei, polimorfismele CC ale genei cloto și haplotipul 0 al VDR. Aceste rezultate arată că polimorfismele în cauză au un impact asupra metabolismului fosfocalcic și pot avea un impact asupra calcemiei atunci când aporturile calcice alimentare sunt insuficiente și depind în mare măsură de nivelul vitaminei D din sânge. Printre altele, calcemia este semnificativ mai joasă în care au avut un aport slab de calciu în nutriție. În cohorta elevilor din Orhei la cei ce posedă acest caz e posibil ca polimorfismul VDR să se haplotipul 2 al VDR și care au un nivel suficient manifeste dacă există o cantitate suficientă de de vitamina D în singe (tab.5.3. și 5.4.).

Tabelul 5.3. 25(OH)D (ng/mL) și corelația cu polimorfismele -13910 LCT, cloto și VDRp

	Chișinău		Orhei	
	<12 ani	12-16 ani	<12 ans	12-16 ans
<u>-13910 LCT :</u>				
CC	13.9 $\pm$ 0.9 (n=26)	13.3 $\pm$ 0.8 (n=13)	21*	16.3 $\pm$ 1.1 (n=36)
CT+TT	15.5 $\pm$ 0.8 (n=36)	15.7 $\pm$ 1.4 (n=16)	18.9 $\pm$ 0.6 (n=75)	18.7 $\pm$ 1.3 (n=45)
<u>Cloto A749A :</u>				
CC	15.2 $\pm$ 0.8 (n=44)	13.4 $\pm$ 0.8 (n=21)	17.6 $\pm$ 0.7 (n=72)	16.7 $\pm$ 0.8 (n=57)
CC+TT	13.9 $\pm$ 0.8 (n=18)	17.9 $\pm$ 2.0 (n=8)	18.7 $\pm$ 0.9 (n=30)	17.5 $\pm$ 1.7 (n=20)

<u>VDR :</u>				
0 hap1	15.2±1.3 (n=18)	12.9±1.8 (n=3)	19.4±0.9 (n=43)	17.3±1.3 (n=33)
1 hap1	15.1±0.7 (n=33)	15.1±1.0 (n=25)	17.6±0.8 (n=56)	17.6±1.2 (n=39)
2 hap1	14.0±1.4 (n=12)	10.0*	16.7±0.9 ¹ (n=26)	17.3±1.3 (n=18)

Valorile medii±DS. Diferențele semnificative sunt calculate între genotipurile fiecărei grupe: $p < 0.05$

* :un singur copil mai mic de 12 ani din Orhei era purtător al genotipului CC pentru gena lactazei și altul din Chișinău era purtător al genotipului 2 haplotipul 1.

Tabelul 5.4. Calcemia corijată (nmol/L) în raport cu polimorfismele -13910 LCT, cloto și VDRp precum și a nivelului seric al 25(OH)D(ng/mL)

		Chișinău			Orhei	
25(OH)D (ng/mL)	±12	12.1-19.9	±20	±12	12.1-19.9	±20
25(OH)D (nmol/L)	±30	30.1-49.9	±50	±30	35-50	±50
<u>-13 910 LCT :</u>						
CC	98.1±1.0	94.1±2.9	83.7±12.8	91.9±2.8	86.3±3.8	95.4±4.4
CT+TT	95.7±3.2	96.1±2.1	95.9±2.3	85.1±2.4	89.4±3.8	91.6±2.1 ²
<u>Cloto A749A :</u>						
CC	96.1±1.6	95.2±1.9	94.1±4.2	85.2±2.0	89.1±1.6	92.2±2.4 ¹
CC+TT	101.0±3.2	94.6±4.3	91.3±5.3	89.4±2.9	90.3±3.4	96.1±2.3
<u>VDR :</u>						
0 hap1	97.2±1.0	93.6±2.9	97.5±4.5	85.7±2.4	90.2±2.1	94.9±2.3 ^{1,a}
1 hap1	97.8±2.1	94.4±2.3	91.3±4.7	87.8±2.2	87.1±2.2	93.7±2.7 ^a
2 hap1	95.1±4.4	98.5±1.5	94.4	84.9±4.0	85.8±2.7	83.5±3.1

Valorile medii ±DS ANOVA au fost calculate cu ajutorul programei Statiew 5.0. Diferențe semnificative dintre grupele cu nivelurile serice ale 25-(OH)D □ 12 ng/mL. ¹: $p < 0.05$; ²: $p < 0.01$.
^a: $p < 0.05$ (calculate dintre 0 haplotipul 1 și 2 haplotipul 1).

NB : Pentru a transforma valorile de Ca din mmol/L în mg/L se va ține cont de următoarele :
2,50 mmol/L este egal cu 100mg/L(mmol/L s-a înmulțit cu 4), valorile normale variind între 88 și 104 mg/L.

Dacă până în prezent nu există un consens unanim referitor la aportul de calciu și al produselor lactate recomandate, numeroase studii transversale și intervenționale realizate până în prezent în America de Nord, Europa și China la copiii aflați în perioada de prepubertate, la adolescenți și adulți, au demonstrat importanța aporturilor calcice în perioada de adolescență [1-4]. Aporturile recomandate în Franța sunt de 1200mg/zi pentru copii și adolescenți în vârstă de 10-19 ani (Apports Nutritionnels Conseilles, 2001). Dorim totuși să menționăm că problema corelației dintre aportul de calciu/lactate și mineralizarea osoasă se complică la subiecții considerați intoleranți la lactoză. Ei manifestă dereglări digestive mai mult sau mai puțin grave după ingestia laptelui: flatulență, dureri abdominale, vome și diaree [8]. Acestea îi obligă pe subiecți să refuze consumul de lapte care, la rândul său, atrage după sine un deficit de aport de calciu. Care ar putea fi ameliorat prin consumarea altor alimente bogate în calciu, cum ar fi brânzeturile, produsele lactate acidofile proaspete și apa sub formă de băuturi.

Activitatea lactazei este vital necesară pentru supraviețuirea nou-născuților care mai apoi scade lent până la dispariția totală la mamiferele adulte, inclusiv și la om [9]. Și totuși, la om persistența lactazei se întâlnește, de exemplu la popoarele Europei de Nord [10, 11].

Calciul este un component important al cristalelor de hidroxide de apatită, constituind faza minerală a matricei osoase. La vârsta adolescenței, creșterea pubertară și dublarea masei minerale osoase atrag după sine o creștere importantă a necesităților în calciu. De exemplu, la adolescent, între vârsta de 10 și 18-20 de ani, aproape 600-700 de grame de mineral se depune în schelet ceea ce constituie acreția a 200250mg/zi. Dacă mai adăugăm pierderile prin sudoare și urinare atunci ajungem până la 400mg de calciu care trebuie absorbite zilnic cu alimentația. Fiind cunoscut faptul că eficacitatea absorbției intestinale ale calciului la adolescent este de la 30 până la 50%, ne dăm bine seama că pentru a asigura o mineralizare optimală a scheletului, aporturile cotidiene ale calciului ar trebui să fie între 800 și 1300 mg/zi. În baza acestor calcule, pentru a acoperi 95% din necesitățile zilnice la adolescenți în vârstă de la 10 până la 19 ani, Franța a propus ca aporturile cotidiene ale calciului să fie de 1200 mg/zi. Devine clar că cele mai importante surse de calciu le constituie laptele și produsele lactate. De exemplu, 1 litru de lapte de vacă, asigură un aport de 1200 mg de calciu. De menționat că majoritatea produselor alimentare sunt foarte sărace în calciu.

Prin urmare, în linii generale, este admis ca laptele și produsele lactate, din motivul conținutului înalt al calciului și contribuția lui la creșterea și mineralizarea scheletului la copil, să constituie sursa principală a acestui element. Dar există și unele păreri controversate. Astfel în revista din 139 de publicații, Heaney, iar mai apoi și Huncharek [7], se confirmă impactul pozitiv

al laptelui și produselor lactate asupra sănătății osoase la adult. Divergențele observate în ceea ce privește aporturile de calciu/lapte asupra mineralizării osoase ar putea avea la bază mai multe cauze legate de heterogenitatea studiilor, în special – siturile osoase analizate, vârsta și stadiul pubertar al copiilor supravegheați; forma de aport al calciului, aporturile de calciu înaintea suplimentării lor, originea etnică și statutul vitaminei D.

Bineînțeles că sursa de calciu are o mare importanță. Totuși, dacă studiile intervenționale efectuate până în prezent în diferite colțuri ale planetei, referitor la suplimentarea cu calciu, nu au reușit de fiecare dată să dovedească rolul lor benefic asupra mineralizării, efectul pozitiv al suplimentării cu lapte a putut fi găsit în 5 studii efectuate până în prezent [6, 12-15]. Mai mult, în trei studii în care se compară impactul laptelui și al carbonatului sau al citratului de malat asupra mineralizării, se constată o superioritate netă a lactatelor.

Trei studii efectuate la populații care nu consumau lapte (mai puțin de un pahar de lapte pe săptămână), au stabilit o mineralizare mai slabă la copii și adolescente. Alte trei studii de retrospectivă efectuate la adult, arată efectul negativ pe termen lung al non consumului de lapte în copilărie și/sau în adolescență asupra mineralizării osoase și/sau riscului de fractură la vârsta de adult. Dacă efectul nefast asupra mineralizării scheletului în creștere este permanent dovedit, cauzele consumului scăzut de lapte sunt diverse: «alergia» reală sau presupusă, obișnuințele alimentare ale populației, diete alimentare particulare (macrobiotice, diete vegetariene, diete fără cazeină), fobia unei acțiuni nefaste a laptelui asupra organismului sau malabsorbția/ intoleranța laptelui/lactozei.

În ce privește malabsorbția/intoleranța lactozei, a fost demonstrat clar că atât la adult cât și la copil, nu se asociază cu evitarea laptelui, decât atunci când există simptome clinice clare cum ar fi durerile abdominale. În acest caz, și numai în acest caz, malabsorbția lactozei se asociază cu un deficit al aportului de calciu și al unei mineralizări osoase insuficiente. Rezultatele studiilor noastre au confirmat cele relatate. Așadar, rezultatele studiilor noastre au demonstrat că 30% din adolescenți erau purtători ai genotipului asociat cu deficit al lactazei (C/C en -13910 al genei LCT), însă acest genotip nu a influențat consumul laptelui și nu a prezentat repercusiuni negative asupra mineralizării osoase. Dacă în ansamblu studiile înglobate în acest capitol sugerează rolul primordial benefic al laptelui asupra merializării și conținutului osos în dependență de statutul vitaminei D, rămâne să se stabilească care ar putea fi cantitatea de lapte/produse lactate optim recomandată. Cantitățile de lapte indicate în studiile de intervenție arată că efectul favorabil asupra mineralizării scheletice este foarte slab: suplimentarea cu calciu sub formă de lapte începea de la 254 mg/zi în studiile în care erau antrenati tinerii chinezi, 900

mg/zi în studiile în care au fost implicate fetele cu vârsta cuprinsă între 7-9 ani din Suedia și până la 1300 mg/zi la copiii chinezi cu vârsta cuprinsă între 9 și 10 ani.

Investigații genetice ce vizau cunoașterea frecvenței polimorfismelor genetice ale LCT, corelând rezultatele obținute cu nivelul calciului corijat, polimorfismul genei Klotho și VDR a cohortelor de referință franceze sunt redate în tabelul 5.5., unde sunt ilustate și unele rezultate referitor la creșterea și mineralizarea osoasă a 128 adolescenți, supravegheați pe parcursul a 4 ani, care prezentau sau nu markeri asociați unei deficiențe în lactază.

Tabelul 5.5. Creșterea și mineralizarea osoasă în dependență de polimorfismul genetic și aportul de calciu la copiii francezi.

Varianta genotipică n (%)	C/C 34(27%)	C/T 55(43%)	T/T 39(30%)
Vârsta (ani)	14,7±3,3	14,1±2,9	14,0±2,4
Aport în calciu (mg/zi)	866±230	867±196	876±281
DMO lombară (g/cm²)	0,902±0,18230	0,883±0,179	0,873±0,182
DMO lombară (Z-scor)	0,049±1,087	+0,035±1,100	-0,228±1,069
Talia (DS)	0,470±1,048	0,642±1,058	0,708±1,129
Vârsta (ani)	17,7±2,9	17,1±2,0	17,6±2,2
Aport în calciu** (mg/zi)	891±150	909±184	858±174
DMO lombară (g/cm²)	1,043±0,115	1,046±0,115	1,053±0,095
DMO lombară (Z-scor)	-0,016±1,037	+0,033±1,067	+0,042±0,848
Talia (DS)	0,125±1,095	0,430±1,190	0,504±0,941

Analiză SNP la -13910 a genei LCT. DMO = Densitatea minerală osoasă; SDS = Scorul deviației standard; C/C, C/T, T/T sunt o variație de bază de ADN la -13910 a genei de lactază.

*** Aportul mediu de calciu pe zi, pe parcursul a 4 ani de supraveghere.*

Rezumând publicațiile din literatura de specialitate în contextul efectelor posibile ale unei malabsorbții de lactoză asupra mineralizării osoase, riscului de fracturi și creșterii, putem conchide următoarele:

- malabsorbția lactozei poate fi asociată unui defect de mineralizare osoasă sau a unei majorări a riscului de fracturi (6 studii din 14 analizate);
- ea nu se asociază unei hipomineralizării osoase cu excepția cazurilor în care ea se asociază unor simptome clinice destul de severe cauzate de evitarea consumului de produse lactate sau de consumare a lui în mici cantități (mai puțin de 700 mg/zi);
- această asociere este uneori legată de sex sau de vârstă;

- datele asupra creșterii sunt insuficiente pentru a permite de tras unele concluzii certe.

Pentru a studia mai profund situația în cauză în țara noastră și compara cu cohortele din Orașul Caen, am efectuat investigațiile genetice necesare ce vizau cunoașterea frecvenței polimorfismelor genetice ale LCT, corelând rezultatele obținute cu nivelul calciului corijat, polimorfismul genei Klotho și nivelurile serice ale 25(OH)D.

Tabelul 5.6. Frecvența polimorfismelor la nivel de promotor al lactazei -13910, Klotho și VDR

Cohortele	-13910 LCT		Klotho A749A*		VDRp**		
	CC	CT+TT	C C	CT+TT	0 Hap1	1 hap1	2 hap 1
Chișinău	44%	56%	71%	29%	23%	62%	15%
Orhei	26%	74%	72%	28%	35%	44%	21%
Franța (or. Caen)	32%	68%	78%	21%	27%	54%	20%

* Klotho A749A reprezintă polimorfismul ADN (C/C, C/T sau T/T), creînd o schimbare de codon fără vreo schimbare în alanina de aminoacid de codificare.

** Polimorfismul genei VDR este situat pe regiunea de promotor (la poziția -1012).

Prin urmare, tabelul arată că varianta CC a polimorfismului de lactază nu este semnificativ diferită în toate cele 3 cohorte studiate, fiind mai mică în Orhei și mai mare la copiii din Chișinău. Aceeași situație este întâlnită în alt polimorfism în genele KL și VDR. Din statisticile obținute, putem spune că nivelurile serice de 25-OH D3 sunt nesemnificativ mai mici la subiecții CC la lactază (Tabelul 5.7.). Cu toate acestea, există o situație de frecvență inexplicabilă la copiii sub 12 ani din Școala internat din Orhei, unde, așa cum am stabilit, există un singur CC la 74 CT-TT.

Tabelul 5.7. 25(OH)D (ng/ml) în raport cu polimorfismul LCT -13910

	Chișinău		Orhei	
	<12 ani	12-16 ani	<12 ani	12-16 ani
-13 910 LCT:				
CC	13.9±0.9 (n=26)	13.3±0.8 (n=13)	21*	16.3±1.1 (n=36)
CT+TT	15.5±0.8 (n=36)	15.7±1.4 (n=16)	18.9±0.6 (n=75)	18.7±1.3 (n=45)

Valorile reprezintă media ± SD. Sunt calculate diferențele semnificative între genotipurile din fiecare grup.

*: Doar un copil sub 12 ani a purtat genotipul CC a genei lactazice și un alt copil din Chișinău a fost purtătorul de genotip 2 Hap 1.

Un interes special prezintă faptul că elevii din Gimnaziul internat din Orhei au avut un aport nutrițional sărac de calciu, nivelul de calciu corectat fiind semnificativ mai redus în corelație cu cel mai scăzut nivel de 25(OH)D₃. Mai exact, acest efect apare la persoanele care prezintă polimorfisme de lactază CT+TT, gena Klotho polimorfisme CC și 0 Hap 1 al VDR. Rezultatele obținute indică la faptul că aceste polimorfisme pot avea un impact asupra metabolismului fosfocalcic precum și asupra nivelurilor calciului seric, atunci când aportul de calciu e insuficient și depinde în mare măsură de nivelul de vitamina D din sânge. Printre altele, s-a constatat că calciul seric era semnificativ mai mic în cohorta de elevi din Orhei, care aveau VDR Hap 2 și un nivel suficient de vitamina D în sânge. Copiii din Orhei au avut un aport de calciu sărac în nutriție. În acest caz, este posibil ca polimorfismul VDR să fie funcțional dacă există o cantitate suficientă de vitamina D pentru acțiunea sa.

S-a demonstrat în mod clar că, atât la adulți cât și la copii malabsorbția de lactoză nu este asociată cu evitarea consumului de lapte, numai atunci când există simptome clinice clare cum ar fi durerile abdominale/crampele. În acest caz, doar malabsorbția de lactoză este asociată cu o insuficiență de aport de calciu și a mineralizării osoase. Printre persoanele care sunt considerate intolerante la lactoză, mulți evită consumul de lactate. Potrivit autorităților din domeniul sănătății, nu este necesar ca persoanele cu intoleranță la lactoză să limiteze consumul de produse lactate sau să le excludă din regimul alimentar [20, 21]. Restricția de aport de lactoză ar putea atenua simptomele gastro-intestinale. Cu toate acestea, o dietă săracă în produse lactate sau lipsită de produse lactate creează în general probleme pe termen lung [20, 22]. Limitarea consumului de produse lactate înseamnă a fi lipsit de sursele ușor accesibile de calciu și alte elemente nutritive importante [20].

Studiile au arătat că copiii și adolescenții care nu consumă cantitățile recomandate de lapte și produse lactate nu reușesc să-și satisfacă nevoile lor în calciu, ceea ce îi împiedică, de asemenea, să ajungă la vârful/maxima de masă osoasă necesară. Consumul unor cantități insuficiente de produse lactate ar putea spori în același timp riscul osteoporozei la adulții în vârstă și conduce la un risc crescut de fracturi pe os patologic [20, 21].

Printre altele, laptele și produsele lactate au în general un impact pozitiv asupra sănătății, cum ar fi reducerea riscului de hipertensiune arterială, cancer colorectal și diabet. Astfel, un studiu național multi-etnic realizat în SUA a stabilit un procent mult mai mare de hipertensiune și diabet la persoanele care au fost considerate intolerante la lactoză. [22]

Datorită rolului său important în absorbția calciului, vitamina D ar putea juca un rol pozitiv în managementul tensiunii arteriale. În plus, s-a stabilit că un regim alimentar nutrițional

care conține cantități insuficiente de vitamina D crește tensiunea arterială prin activarea sistemului renină-angiotensină-aldosteron, care determină vasoconstricția, precum și retenția de sodiu și apă în organism [23]. Alte minerale conținute în produsele lactate, cum ar fi magneziul și potasiul, ar putea reglementa tensiunea arterială, dar este dificil de evaluat contribuția lor individuală, deoarece ambele elemente nutritive sunt de obicei în alimente bogate în calciu [24].

Mai multe studii au arătat că produsele lactate pot preveni pierderea de masă musculară și forță care apar odată cu vârsta. Acest fenomen, numit sarcopenie, ar putea fi prevenit datorită activității fizice și unei diete bogate în produse lactate și vitamina D [25]. Recomandările sunt făcute de Fundația Internațională de Osteoporoză și Societatea pe Sarcopenia și Cașexie [25] și se bazează pe faptul că utilizarea regulată a produselor lactate ar avea un impact pozitiv asupra mușchilor, crescând masa musculară scheletică [26,36], îmbunătățind structura osoasă și sporind masa osoasă totală, inclusiv masa osoasă apendiculară [26], în același timp, crescând densitatea minerală osoasă, precum și masa osoasă trabeculară [27], crescând forța musculară [25, 28] și capacitățile funcționale în general [27, 29].

Strategiile de intoleranță implică recomandarea de a ingera cantități mici de lactoză. Este de dorit să se încorporeze cantități mici de lapte sau alte alimente care conțin lactoză și de a distribui consumul lor pe parcursul zilei. Cele mai multe studii au arătat că persoanele cu intoleranță la lactoză nu prezintă nici un simptom după ingerarea cantităților mici de alimente care conțin lactoză. În general, o cantitate de lactoză care ajunge până la 12 grame într-o singură doză (echivalent cu o cană de lapte) poate fi tolerată fără apariția de simptome evidente, mai ales în cazul în care alte produse alimentare sunt consumate în același timp [18]. Cei mai mulți oameni intoleranți la lactoză, inclusiv copiii, pot tolera două cești de lapte pe zi, fiind consumate în cantități mici pe parcursul întregii zile [30].

S-a constatat că laptele și produsele lactate sunt mai bine tolerate dacă sunt ingerate împreună cu alte alimente incluse în meniu. Laptele este mai ușor digerat dacă este consumat cu alimente care interferează cu eliberarea rapidă a lactozei în intestinul subțire, și de aceea, reducerea șarjei (sarcinei) de lactoză care trebuie digerată imediat [18]. Ingestia de lapte împreună cu alte alimente solide, în special alimente bogate în fibre solide, încetinește golirea stomacului, oferind mai mult timp lactazei pentru a digera lactoza în intestin [21, 30].

Este recomandat să se opteze pentru produsele lactate cum ar fi iaurtul, brânza și laptele cu ciocolată, deoarece iaurtul și brânza/cașcavalul sunt produse ca urmare a procesului de fermentare a laptelui de către bacteriile lactice. Pe parcursul procesului de fermentație o anumită cantitate de lactoză este transformată în acid lactic. Ca urmare, iaurtul este în general mai bine

tolerat și în același timp conține culturi de bacterii active care favorizează digestia lactozei [18, 30]. Mai mult decât atât, consistența semisolidă a iaurtului încetinește golirea gastrică și tranzitul intestinal, oferind mai mult timp pentru a digera lactoza [18]. Cele mai multe produse de brânză (cașcavaluri) de consistență tare și brânzeturi (cașcavaluri) vechi conțin mai puțină lactoză. Mozzarella, Cheddar, Parmezan și cașcavalul suedez Emmental sunt doar câteva exemple de cașcavaluri care conțin mai puțină lactoză [18]. Din motive incerte, laptele cu ciocolată tinde să fie mai bine tolerat decât laptele natural neprocesat [18, 19]. În prezent, unii dieteticieni recomandă alegerea produselor lactate fără lactoză sau cu conținut mic de lactoză. Asociația Națională de Medicină din Canada, de exemplu, menționează că produsele lactate fără lactoză sunt substituenți ideali ale produselor lactate obișnuite pentru persoanele cu intoleranță la lactoză [19]. Cu toate acestea, s-a constatat că copiii preferă mai mult laptele de vacă fără lactoză decât băuturile aromatizate din soia [19]. Cu toate acestea, băuturile fortificate/îmbogățite cu calciu și alte alimente suplimentate nu pot substitui laptele de vacă ca echivalent nutrițional. Astfel, consumul de astfel de alimente poate duce la aportul suboptim de nutrienți cheie, cum ar fi proteinele, magneziul, potasiul, riboflavina și vitamina B12 [19]. Administrarea pastilelor de lactază ar putea face parte din strategia de nutriție a acestor persoane [18,19].

Adaptarea colică este o strategie în care aportul de lactoză este crescut treptat [18]. La unele persoane expunerea regulată la lactoză crește eficiența bacteriilor colonice de a metaboliza lactoza, îmbunătățind astfel pragul de toleranță la lactoză [20]. O altă tactică vizează creșterea toleranței și a consumului de o jumătate de pahar de lapte în timpul mesei, în prima jumătate a zilei, apoi consumul în următoarele două mese în următoarele două zile și creșterea treptată și zilnică a frecvenței și cantității de lapte [31].

5.3. Concluzii la capitolul 5

1. Studiul de față ne-a permis să stabilim faptul că flatulența (54% dintre subiecții din Orhei și 41% dintre subiecții din Chișinău), voma (27% din copiii din Orhei și 4% din cei din Chișinău) și episoadele de diaree (22% în lotul din Orhei și 4% în lotul din Chișinău) sunt cele mai frecvente simptome care ar putea favoriza intoleranța la lactoză:

a) Varianta CC a polimorfismului de lactază a fost nesemnificativ diferită în cele două grupuri studiate, fiind mai mică la copiii din Chișinău, care corelează cu o frecvență mai mare a simptomelor clinice care sunt caracteristice acestui sindrom la copiii și adolescenții din Școala internat din Orhei;

b) Nivelurile serice 25-(OH) D3 au fost nesemnificativ mai mici la subiecții cu CC lactază;

c) S-a constatat că calcemia a fost semnificativ mai mică la subiecții din Orhei, în special la cei cu haplotipul 2 VDR și care au un nivel suficient de vitamină D în sânge.

DISCUȚII GENERALE

Vitamina D este unul dintre cei mai importanți moderatori biologici în organismul uman. În afară de funcțiile sale clasice, în ultimul timp sunt publicate tot mai multe lucrări științifice bazate pe dovezi în care se discută activ un șir de proprietăți foarte importante ale ei, cum ar fi creșterea fetală, rolul ei în îmbunătățirea supraviețuirii pacienților cu cancer pulmonar de alte tipuri decât cu celule mici (non-small-cell lung cancer NSCLC), îmbunătățirea evoluției encefalitei experimentale, prevenirea sclerozei multiple, atribuirii rolului protectiv împotriva bolilor autoimune, cu predilecție a diabetului zaharat de tipul I, artritei juvenile, astmului bronșic și a unor tipuri de cancer, inclusiv de sân și de colon, prevenirii și tratării hipertensiunii arteriale, pre eclampsiei, schizofreniei, tratamentului psoriazei, glomerulonefritei, fortificării imunității celulare și umorale în infecțiile respiratorii acute, tuberculozei/leprei și altor maladii granulomatoase.

Metabolitul activ al vitaminei D - 1,25(OH)D₃ și analogii săi sunt actualmente folosiți în transplantologie, imunologie și dermatologie, cercetările în cauza, depășind deja stadiul de laborator, ținând a fi ulterior transferate în clinică.

Un șir de studii observaționale, de intervenție, randomizate și cvasirandomizate efectuate în SUA, Franța, Finlanda, Australia, Canada și alte țări din lume, au precăutat efectul suplimentării vitaminei D în ultimul trimestru al sarcinii asupra dezvoltării intrauterine a fătului. Majoritatea studiilor au confirmat existența unei corelații strânse dintre statutul matern al vitaminei D și dezvoltarea intrauterină a fătului.

Savanții au demonstrat că osteoblaștii care conțin receptori pentru vitamina D au o activitate mai redusă în caz de statut precar al vitaminei D și ca urmare o reducere a creșterii oaselor lungi și o talie mică la naștere. Concentrațiile joase ale vitaminei D serice au fost asociate cu concentrații joase ale insuline-like growth factor (IGF-1) din sângele matern și cel prelevat din cordonul ombilical precum și greutatea mică la naștere.

Rezumând cele reiterate putem expune, că cercetările științifice referitoare la acțiunile vitaminei D, începute aproximativ cu 80 ani în urmă, rămân a fi o provocare pentru cercetători. În pofida ipotezelor inovatoare, funcțiile fiziologice ale vitaminei D rămân obscure, deși, proprietățile vitaminei D, descoperite în ultimii ani, permit, fără îndoială, crearea noilor metode terapeutice în cancerologie, imunologie și transplantologie. Ele induc crearea noilor concepții asupra rolului eventual de protecție prin aportul vitaminei D și al calciului în prevenirea cancerului de colon și sân, pe când rolul exercitat asupra sistemului nervos, asupra organelor de

reproducere și asupra creșterii rămâne o enigmă ce este discutată și dezvăluită de numeroși savanți.

În fine, identificarea genei codante a receptorului vitaminei D și punerea în evidență a variațiilor genei date printre populația generală au permis observarea asocierii dintre genotipul VDR și susceptibilitatea de a dezvolta diverse patologii, parțial sau integral legate de vitamina D. Aceste rezultate trebuie confirmate, probabil, mai intervin pe parcurs și alte trăsături genetice, cum ar fi, de exemplu, variațiile genei care codează transformarea vitaminei D în forma sa activă.

Printre genele ce guvernează creșterea și mineralizarea matricei osoase, gena codantă a receptorului pentru vitamina D (VDR) joacă un rol primordial, deoarece acest receptor este indispensabil pentru absorbția intestinală a calciului (Bouillon R. et al., 2008). Până în prezent au fost descrise circa 300 de polimorfisme în părțile codante și reglatoare ale genei VDR (Nejentsev S. et al., Fang Y. et al. 2005). Trei dintre aceste polimorfisme prezintă un interes deosebit pentru noi, deoarece sunt situate în partea reglatoare a expresiei genei VDR: una în site-ul de legare a factorului de transcripție Cdx-2 specific, implicat în reglarea și diferențierea celulelor intestinale (Mutoh H. et al., 2005) și în reglarea genelor intestinale (Uesaka T. et al., 2004), altele două sunt strâns legate între ele și situate (-1012 și -1521) în zona legată de complexe proteice specifice (Fang Y. et al., d'Alèsio A. et al., 2005). Prin urmare, variantele din site-urile menționate sunt capabile să modifice *in vitro* activitatea transcripțională a promotorului VDR (Arai H. et al., 2001, d'Alèsio A et al., 2005). Drept urmare, polimorfismele -1012/-1521 au fost asociate cu înălțimea adolescenților [d'Alèsio A et al., 2005] și cu riscul de fracturi la persoanele în vârstă (Fang Y et al. 2005). Polimorfismul din site-ul Cdx-2 a fost asociat cu masa osoasă la femeile aflate în perioada postmenopauză (Arai H. et al., 2001) și cu riscul de fracturi la persoanele în vârstă (Fang Y. et al, 2003). Până nu demult, influența acestor polimorfisme la copii și adolescenți a fost puțin studiată, fapt ce ne-a determinat să efectuăm cercetări în această direcție.

În viziunea noastră, studierea funcțiilor fiziologice ale vitaminei D și dezvoltarea noilor strategii terapeutice, și nutriționale, trebuie asociate cu acțiunea factorilor mediului înconjurător, capabili să influențeze statutul vitaminei D și al metabolismului său, cum ar fi - expunerea la soare, aportul alimentar al vitaminei D, calciului și fosfaților.

În abordarea problemei rahitismului nutrițional în comunitățile cu risc înalt, este imperativă folosirea testelor de screening valide și fiabile disponibile pentru a putea determina prevalența rahitismului activ în populație, în special în grupurile cu acces limitat la serviciile de sănătate publică. Este posibil ca metodele de screening să fie diferite pentru copii și adolescenți

de diferite vârste. Desigur, semnele clinice luate în considerație vor varia în funcție de grupul de vârstă. Închiderea întârziată a fontanelei, craniotabesul și hipotonia musculară ar putea constitui semne clinice adecvate pentru sugari și copiii de vârstă mică, dar sunt nereprezentative pentru copiii mai mari. Adolescenții reprezintă un grup vulnerabil în vizorul comunităților științifice medicale, deși pot prezenta manifestări asociate de hipotonia musculară proximală [33].

Stabilirea diagnosticului de rahitism, de obicei, este supra-înregistrat, iar manifestările clinice nu pot constitui instrumentul exclusiv de evaluare medicală a acestuia. Astfel, combinarea utilizării semnelor clinice și a metodelor de laborator biochimice simple, ar favoriza identificarea pacienților cu semne clinice slab manifestate sau absente. În fine, determinarea statutului 25(OH)D și semnele radiografice contribuie la precizia diagnostică.

În scopul de a ajunge la un consens referitor la spectrul economic eficient și fiabil de metode de diagnostic al patologiilor asociate cu deficitul de vitamina D în comunitățile cu risc înalt, este absolut necesară continuarea eforturilor comune a cercetătorilor din domeniul sănătății în atingerea unui numitor comun bazat pe dovezi.

Prezentul studiu transversal asupra unui eșantion compus din 629 copii și adolescenți europeni, locuitori la aceleași latitudini (47-49 °N), dar cu un mod de viață și de alimentație diferit, demonstrează, că semnele clinice și biologice ale carenței vitaminei D pot fi observate la copiii și adolescenții aparent în stare bună de sănătate, la un nivel seric al 25(OH)D mai mic sau egal cu 30 nmol/l, în special atunci când este asociat cu un aport diminuat de calciu/lapte[177].

În ultimii treizeci de ani în urma unui consens, statutul vitaminei D este determinat pe baza nivelului 25-hidroxivitaminei D circulante în sânge, care reprezintă forma de rezervă a vitaminei D în organismul uman, iar nivelul actual stabilit este utilizat pentru a evalua prevalența deficienței și/sau insuficienței de vitamina D, în special la copii și adolescenți [69, 101, 109, 169, 190]. Totuși, până în prezent, nu există încă o interpretare unanimă a impactului funcțional al concentrațiilor circulante ale 25(OH)D. Valorile de referință stabilite conform rezultatelor obținute la indivizii din grupurile populaționale în stare bună de sănătate (valorile „normale”), continuă a fi subiectul dezbaterilor științifice, iar valoarea nivelului „solicitat” este continuu revăzută. Implementarea schemelor de profilaxie specifică adaptată a contribuit la reducerea semnificativă a frecvenței stărilor de carență a vitaminei D în țările occidentale. Ulterior, „valorile normale” ale 25(OH)D au fost progresiv înlocuite cu „valorile solicitate” și cu „valorile de prag” sub care pot surveni modificări patologice de scurtă sau lungă durată la indivizii aparent sănătoși. Majoritatea clinicienilor recunosc că, concentrațiile inferioare celei de

10-12 ng/ml (25-30 nmol/l) sunt asociate cu un risc crescut al rahitismului carențial, convulsiilor hipocalcemice, problemelor dentare și perturbărilor de creștere la copii și adolescenți [2, 30, 165, 168]. „Pragul” de 70 nmol/l al 25(OH)D a fost propus pentru a asigura starea normală a osului în perioada de creștere. Un alt prag propus egal cu 80-90 nmol/l este bazat pe rezultatele studiilor în secțiune, care au evaluat nivelurile 25(OH)D necesare pentru a menține un nivel scăzut de PTH. Însă, numărul mic de subiecți cu valori ce depășesc pragul și absența controlului extern al setului de analiză a 25(OH)D pun la îndoială aceste valori.

Studiul nostru nu oferă dovezi decisive, că valorile între 30 și 50 nmol/l ar afecta negativ starea osului, pe parcursul perioadei de creștere. Semnele clinice ale unei carențe a vitaminei D sunt mai puțin constante și mult mai dificil de interpretat atunci când nivelul seric al 25(OH)D se află între 30-50 nmol/l, dar, la aceste valori ale 25(OH)D circulante, a fost evidențiată o activitate scăzută a fosfatazei alcaline doar la adolescenții francezi comparativ cu cei ce aveau un nivel de 25(OH)D mai mare de 50 nmol/l. În mod similar, la copiii și adolescenții din Gimnaziul Internat din or. Orhei cu valorile 25(OH)D situate în intervalul 30-50 nmol/l n-au fost remarcate predominarea deformărilor osoase, în raport cu copiii ce aveau niveluri mai ridicate de 25(OH)D circulant, cu excepția copiilor în perioada pubertară, cu hipocalcemie [177].

Ca rezultat, indiferent de ponderea nivelurilor joase ale 25(OH)D (sub 30 nmol/l) cu un risc înalt de dezvoltare a semnelor de carență ale vitaminei D, asocierea acestora cu un aport insuficient de calciu pune probleme de sănătate publică nu numai pentru Republica Moldova, dar și pentru întreaga Europă. Conform rezultatelor studiilor noastre, la copiii cu o vârstă mai mică de 15 ani, valorile 25(OH)D sub acest nivel sunt asociate cu o prevalență excesiv de mare a *genu varum* și *genu valgum* la băieți și fete. O prevalență similară a *genu varum/valgum* (18%) a fost înregistrată la copiii din India cu vârsta între 6-18 ani care sufereau de fluoroză și aveau un aport foarte mic de calciu de rînd cu valori joase ale 25(OH)D circulant [303]. Expunerea copiilor din Moldova la un conținut înalt de fluoride în apa potabilă nu poate fi exclusă [201], astfel aportul scăzut de calciu la acești copii (mai puțin de 400 mg/zi) cu siguranță a agravat impactul statutului nesatisfăcător al vitaminei D asupra dezvoltării deformărilor osoase și nivelului calciului seric. Într-adevăr, cercetările noastre au argumentat că nivelul scăzut de calciu seric și deformările osoase erau semnificativ mai rare la copiii din cohorta din mun. Chișinău cu un statut similar scăzut al vitaminei D, însă cu un aport teoretic adecvat de calciu/lapte. Studiile efectuate în cohorta fetelor adolescente din Franța arată că, chiar o deficiență moderată de calciu, de exemplu consumul de lapte mai mic de 100 ml/zi și aportul mediu total de calciu echivalent a 716 mg/zi,

poate agrava impactul statutului insuficient al vitaminei D, cel puțin asupra nivelului calciului seric [110, 299].

Dacă riscul dezvoltării defectelor de mineralizare ale oaselor lungi crește cu siguranță la un nivel de 25(OH)D mai mic de 30 nmol/l, atunci această corelație nu se observă în cazul mineralizării vertebrelor lombare, fapt demonstrat de studiile cohortei franceze. Rezultatele cercetărilor noastre în domeniul sănătății osului în cohortele franceze și din R. Moldova corespund întocmai ipotezei că vitamina D influențează mai mult dezvoltarea oaselor corticale decât a celor trabeculare în perioada prepubertară și pubertară de creștere [177]. În mod similar, nivelurile joase de 25(OH)D erau asociate cu o DMO scăzută a oaselor antebrațului la copiii irlandezi cu vârsta cuprinsă între 12 și 16 ani, la fetele finlandeze [304] și o DMO volumetrică corticală scăzută în porțiunea distală a radiusului și tibiei la fetele finlandeze de 10-12 ani. În mod contrar, masa și densitatea osoasă nu erau asociate cu nivelurile de 25(OH)D la fetele din Finlanda, în perioada de pubertate la măsurarea cu DEXA la nivel de corp în total, la nivel de bazin, femurul proximal și regiunea lombară a coloanei vertebrale, aceeași lipsă a asocierii fiind observată și la femeile hispanice și caucaziene din SUA [305].

Statutul optimal al 25(OH)D, în perioada de creștere a copilului, ar putea fi influențat de polimorfismele genetice care modifică acțiunea vitaminei D, în special cele aflate în regiunea promotorului genei codante pentru receptorul vitaminei D. S-a demonstrat că majoritatea polimorfismelor influențează absorbția intestinală a calciului și densitatea minerală osoasă la copii și adolescenți [132], iar polimorfismul -1012 (varianta rs4516035) favorizează absorbția Ca din produsele lactate având impact pozitiv asupra mineralizării vertebrelor lombare [131]. Variantele specifice ale VDRp (-1012 A/G sau G/G) la reprezentanții rasei caucaziene ar putea agrava acest risc, cel puțin de dezvoltare a hipocalcemiei la un aport moderat deficitar de calciu prin lapte (aport calcic total mediu de 712 mg/zi la adolescenți). Însă, genotipul în cauză nu este capabil să influențeze negativ nivelul scăzut de 25(OH)D, dacă aportul de calciu este scăzut, cum ar fi în Școala Internat din or. Orhei (în mediu 400 mg/zi).

Studiul din cohorta franceză relevă faptul, că acțiunea statutului scăzut al vitaminei D asupra calcemiei la copiii cu un genotip -1012 A/A al VDR se observă mai puțin și este depistată la 30% dintre subiecți în cadrul populației europene și la mai mult de 98% dintre subiecți în cadrul populației asiatice și afro-americane [306]. Totodată, rezultatele cohortei din Moldova demonstrează că modificările clinice și biochimice, cu nivelul scăzut de 25(OH)D, persistă chiar și la copiii cu genotipul A/A, în caz de deficiență severă de calciu/lapte.

Mecanismul de acțiune al vitaminei D este asemănător hormonilor steroizi, care are loc în câteva etape:

legarea formei active de vitamina D, care are structură steroidă $1,25(\text{OH})_2$ cholecalciferol, de receptorul celular specific;

legarea sa de receptori nucleari specifici formează un complex „*hormon-receptor*”;

sinteza de ARN mesager specific (transcripția) și sinteza de proteine specifice (translația).

Dintre proteinele sintetizate o importanță deosebită are proteina care leagă Ca în epiteliul duodenal, favorizând absorbția acestuia.

Ca urmare a unor mutații la nivelul receptorului respectiv care determină reducerea sau sistarea transcripției și/sau translației cu reducerea și/sau sistarea sintezei receptorului specific, are loc reducerea sau absența completă a legării formei active a vitaminei D de receptorul nuclear specific.

Frecvența valorilor joase ale $25(\text{OH})\text{D}$ (sub 30 nmol/l), în perioada de iarnă-primăvară în Franța și Republica Moldova la copiii aparent sănătoși (20-41%) este similară celei înregistrate la copiii din regiunile de nord ale Europei (Danemarca, Finlanda, Polonia, Rusia) 16-51% [28, 83, 224], dar și în Grecia [169], Germania [239], Suedia [103]. Îmbogățirea alimentelor sau suplimentarea cu vitamină D, în viziunea noastră, ar trebui să fie efectuată pe baza unei politici oficiale adoptate și implementate, sub controlul Ministerului Sănătății țărilor vizate, pentru a asigura menținerea statutului vitaminei D mai mare de nivelul de 30 nmol/l, cu predilecție în timpul sarcinii.

În Republica Moldova sursa principală a vitaminei D, în special după vârsta de 1 an și pe parcursul întregii vieți, este reprezentată de cea endogenă, formată sub acțiunea razelor ultraviolete (RUV) de tip A (RUVA) și mai puțin a razelor ultraviolete B (RUVB). Durata zilelor solare benefice, sub acest aspect, este limitată (aprilie-mai până în octombrie-noiembrie), iar una din soluții ar fi expunerea îndelungată a organismului la acțiunea RUVA în sezonul estival, dar investigațiile recent efectuate în acest domeniu au constatat o incidență mult crescută a cancerului cutanat în urma expunerii îndelungate la soare [307]. Savanții au ajuns la concluzia, că expunerea la radiații UV are efecte imediate (eritem și pigmentare) și efecte întârziate (îmbătrânirea prematură a pielii și dezvoltarea diferitor forme de cancer) [308].

“Razele UVA și UVB au mecanisme de acțiune diferite. Razele UVB au o energie mai mare și sunt absorbite direct de o serie de constituenți celulari, cum ar fi acizii nucleici, proteinele și acidul urocanic, care exercită un efect mutagen, fiind principalul agent responsabil de apariția cancerului cutanat. Razele UVA penetrează cu ușurință epidermul, acționând asupra

stratului proliferativ bazal al epidermului și chiar asupra componentelor sanguine din dermă [309]. Ele acționează asupra constituenților celulari în mod indirect, prin mecanisme oxidative ce implică formarea speciilor active de oxigen (anioni superoxid, peroxid de hidrogen, radicali hidroxil, radicali peroxil și oxigen singlet). Acțiunea lor induce, de cele mai multe ori, modificări ireversibile. Radiațiile UVA exercită un efect mutagen mai slab decât radiațiile UVB, dar joacă un rol important în etiologia cancerului de piele. Radiațiile UV pot determina pe lângă efectul de pigmentare, îmbătrânirea prematură a pielii numită fotosenescență actinică. Alterarea structurii cutanate este însoțită de deshidratare și reducerea elasticității, însă cea mai gravă consecință a expunerii la radiațiile UV constă în apariția și dezvoltarea diverselor tumori de tip melanom și carcinom cutanat. Expunerea la radiațiile UV determină o scădere a răspunsului imun (imunosupresie), prin acțiunea asupra celulelor Langerhans. Dintre efectele negative exercitate de radiațiile solare UV, trebuie menționate o serie de modificări la nivel ocular, cum ar fi degenerarea maculară și cataracta” [310].

În concluzie, pentru minimalizarea riscurilor descrise, se recomandă limitarea expunerii la radiațiile solare, în special, a pacienților cu tratament imunosupresor, deoarece ei reprezintă un risc de 500 ori mai mare de dezvoltare a cancerului. De asemenea, copiii și adolescenții sunt mult mai susceptibili la carcinogeneza indusă de iradierea UV decât persoanele adulte. Menționăm și faptul, că substanțele din compoziția loțiunilor cosmetice oferă o protecție eficientă față de arsurile solare, dar nu împiedică efectul imunosupresor al radiațiilor și, până în prezent, nu se poate spune cu certitudine dacă ele previn cancerul de piele.

În pofida, efectelor nocive, totuși, vitamina D este indispensabilă organismului. Minimalizarea expunerii la soare și modificările metabolismului vitaminei D, care însoțesc creșterea *in utero* și cea post-natală, sporesc riscul deficienței vitaminei D la femeile gravide, nou-născut, sugar și copilul mai mic de 5 ani, la fel și la unele subpopulații de copii mai mari și adolescenți cu risc crescut.

Punându-ne scopul de a studia impactul infestației cu helminți asupra părții codante a receptorului pentru vitamina D, de comun cu savanții din Franța, s-a dovedit că infestația cu helminți nu duce la invalidizarea transgenică a VDR și nici vice-versa, infirmându-se ipoteza svantului american Froicu, precum că carența vitaminei D ar servi drept fundal de o infestație mai frecventă cu helminți. Există speranța că dovezile aduse în lucrarea dată, vor putea pune capăt discuțiilor despre necesitatea profilaxiei specifice a carenței vitaminei D, mărimea dozei zilnice, duratei administrării, categoriilor de populație cărora li se recomandă aceasta profilaxie.

Ponderea simptomelor clinice ale intoleranței la lactoză la copiii și adolescenții implicați în studiu din mun. Chișinău și or. Orhei constituie episoadele de diaree, care au fost semnificativ mai frecvente la subiecții din or. Orhei (21,7%), decât la cei din mun. Chișinău (4,2 %), inclusiv 2-3 episoade diareice/an la 8,0% din elevii din or. Orhei și doar 1,40% la cei din mun. Chișinău. A fost, de asemenea, constatat că voma direct legată de consumul de lapte integral de vacă la copiii din școala-internat din or. Orhei a constituit doar 4,9% și doar 1,4% la cei din Chișinău. Flatulența, fiind cel mai frecvent simptom la copii, a fost înregistrat în 40,8% dintre copiii din mun. Chișinău și 53,5% la cei din or. Orhei, inclusiv 34,1% la elevii din or. Orhei. Flatulența s-a dovedit a fi direct legată de consumul de lapte integral de vacă (29,6% din subiecții din mun. Chișinău). Apariția flatulenței după consumul de produse lactate, altele decât laptele, a fost similară la copiii din mun. Chișinău (11,3%) și or. Orhei (9,7%). Desigur, aceste manifestări digestive ar putea fi cauzate de infestarea cu helminți care este frecvent întâlnită la copii, mai ales la cei din Școala internat din or. Orhei, dar, apariția lor, în unele cazuri, după consumul de lapte și/sau produse lactate și anamneza personală și familială ar putea pleda pentru intoleranța la lactoză.

Cercetarea actuală a remarcat că varianta CC a polimorfismului de lactază corelează, în special, cu tabloul clinic la copiii și adolescenții din Gimnaziul internat din or. Orhei și mai puțin specific pentru copiii din mun. Chișinău, iar nivelurile serice 25-(OH) D3 au fost nesemnificativ mai mici la subiecții cu CC lactază.

Copiii cu polimorfismele CT+TT ale lactazei și polimorfismele CC ale genei Klotho ar putea avea un impact asupra nivelurilor calciului seric, atunci când aporturile de calciu/produse lactate sunt inadecvate și depind în mare măsură de nivelul de vitamină D în sânge. Calcemia a fost semnificativ mai mică la subiecții din or. Orhei, în special la cei cu haplotipul 2 VDR și care au un nivel suficient de vitamină D în sânge.

Valeriu Popescu și al.[347], referindu-se la statistica incidenței hipocalcemiilor neonatale, relatează că ele au o frecvență variabilă în dependență de termenul gestațional și greutatea corporală la naștere. Astfel, Craig[348] atestă o incidență de 8% la un grup de nou-născuți neselectați. Seay și Bray [349] raportează o incidență de 20% la prematuri cu o greutate sub 2.500 g la naștere, iar Painter și colaboratorii [350] au constatat o incidență de 25% la nou-născuți cu o greutate sub 1.500 g la naștere. Unii autori menționează că convulsiile neonatale sunt frecvent asociate cu asfizie perinatală și în acest caz incidența atinge 50% la nou-născuții cu encefalopatie hipoxico-ischemică [351,352].

Prin urmare, studiul nostru ne-a permis să depistăm o frecvență destul de înaltă a hipocalcemiei la nou-născuții femeilor care n-au fost suplimentate cu vitamina D și cu un statut precar al ei. Cercetările ne-au permis să constatăm că în acest grup, nivelul calciului în sângele prelevat din cordonul ombilical era foarte jos (în mediu 1,74 mmol/l, sau 69,6 mg/l). Posibil condițiile și metodele de dozare utilizate în studiul nostru au contribuit la această scădere a calcemiei. Totuși, statistica obținută, ne obligă să depistăm fiecare caz de hipocalcemie și tratată cu toată seriozitatea, or în cadrul unei populații, convulsiile neonatale, reprezintă un risc crescut, un criteriu sigur de predicție al cazurilor care vor evolua cu paralizie cerebrală infantilă [353, 354]. Deși, în mod firesc, evoluția depinde în cea mai mare măsură de substratul patologic și de existensia leziunii cerebrale, rezultatele experimentale sugerează, că însăși convulsiile pot determina leziuni pe un creier imatur. Mai mult, modificările presiunii sistemice și creșterea vitezei (vitezei) fluxului sanguin cerebral în zona anterioară a creierului, în cursul crizelor convulsive, pot avea rol „vătămător” asupra creierului nou-născuților, prin creșterea riscului de producere a hemoragiilor și al hipertensiunii intracraniene [355]. De menționat că, probabil, ameliorarea evoluției nou-născuților tratați în unitățile de terapie intensivă (*intensive care unit-ICU*), depinde în cea mai mare măsură de profilaxia convulsiilor neonatale, de diagnosticul precoce și corect, precum și de tratamentul cu succes al acestora [347]. Rezultatele obținute de noi sunt în concordanță cu cele obținute de alți savanți din lume. Astfel, la începutul anilor 70, Purvis și coautorii [356] au raportat despre existența unei asocieri între survenirea tetaniei la nou-născuți și durata expunerii la soare a mamelor în ultimul trimestru al sarcinii. Autori în cauză, precum și Okonofua cu colaboratorii în 1986 [115] și Daaboul și coautorii în 1997 au arătat că deficitul de vitamină D₃ la femeile gravide duce la dezvoltarea hiperparatiroidismului secundar, care rezultă în hipoparatiroidism tranzitoriu și hipocalcemie la nou-născut. Un șir de cercetători ulterior au raportat că nou-născuții femeilor cu un aport scăzut de vitamină D₃ în timpul gravidității, au un nivel scăzut de calciu seric în cordonul ombilical în prima săptămână de viață [359, 360, 361]. Un risc crescut de instalare a deficitului de vitamină D₃ și hipocalcemiei a fost raportat la studierea unui eșantion de imigranți din Asia în Marea Britanie. Okonofua et al. [115] inițial a raportat un nivel scăzut de 25(OH)D și calciu și nivel crescut de PTH în sângele matern și în sângele din cordonul ombilical prelevat la naștere de la 11 mame asiatice, comparat cu 10 mame de rasă europeoidă. Acești autori au expus mai târziu rezultatele unui studiu similar efectuat într-un eșantion mai mare, ce a inclus 43 femei asiatice și 55 de rasă europeoidă, care au fost monitorizate pe durata întregii sarcini. Cercetătorii au depistat o creștere pe parcursul gravidității a concentrațiilor de PTH la femeile din ambele grupuri [363]. Nivelul seric al PTH a

fost invers asociat cu nivelul seric al 25(OH)D, iar femeile asiatice aveau un nivel mai scăzut de 25(OH)D și mai înalt de PTH în comparație cu mamele de rasă europeoidă. Studiul dat a replicat rezultatele precedente de nivel scăzut de 25(OH)D și crescut de PTH în analizele prelevate din cordonul ombilical de la nou-născuții asiatici în comparație cu cei de rasă europeoidă.

Prin urmare, excluderea altor factori etiologici care pot cauza hipocalcemiile neonatale și care se întâlnesc mult mai rar în această vîrstă decît cea a carenței antenatale a vitaminei D, a fost important să studiem impactul unei suplimentări antenatale cu vitamina D în raionul Călărași (obiect de intervenție) și comparați cu lotul martor din Ialoveni.

La aproape jumătate din numărul total de nou-născuții de la mamele nesuplimentate cu 2,5 mg de vitamina D la termenul de gestație de 6 luni (n=43 sau 48%) au fost notate semne neurologice de hipocalcemie și li s-a administrat gluconat de calciu, cu sau fără fenobarbital pe parcursul primelor zile de viață. Calcemia acestor copii s-a dovedit a fi evident scăzută (1,28 mmol/l în mediu) și semnificativ mai joasă decît la copiii fără manifestări clinice caracteristice unei hipocalcemii (în mediu 2,11 mmol/l). În grupul cu semne de hipocalcemie 32% de copii aveau rezerve scăzute de vitamină D (nivelul 25(OH)D în sîngele din cordonul ombilical fiind mai jos de 10 ng/ml).

În studiile efectuate de către Paunier , Cockburn și coautorii[114], Brooke și coautorii [101] se notează un impact vădit pozitiv al suplimentării antenatale cu vitamina D asupra hipocalcemiilor neonatale. Astfel, s-au măsurat concentrațiile plasmatice ale 25(OH)D și calciu la 40 mame sănătoase elvețiene și la nou-născuții lor la naștere, în perioada de iarnă. Calciul seric la nou-născuți a fost determinat în ziua a patra de viață. Ca rezultat, au fost definite 3 grupuri de participanți în dependență de aportul de vitamină D la mame. În special, 16 mame nu au primit suplimentar vitamina D și aveau un aport mediu de ≤ 150 UI/zi, 8 mame nu au primit suplimentar vitamină D și aveau un aport zilnic de 150-500UI din lapte fortificat, de scos și 16 mame au primit în mod regulat supliment cu vitamina D, ca rezultat avînd un aport de 500-1500UI/zi. Concentrația de 25(OH)D în sîngele cordonului ombilical s-a dovedit a fi corelateă cu concentrațiile plasmatice la mamă. Pe de altă parte, nivelurile materne și din cordonul ombilical al 25(OH)D nu au fost corelate cu aportul matern de vitamină D și nu au manifestat diferențe în cele 3 grupuri descrise mai sus. De menționat, că acest studiu nu a fost semnificativ din punct de vedere statistic în ceea ce privește concentrațiile serice de 25(OH)D (atribuită de autori unei variații mari a acestor rezultate), însă, în pofida acestui fapt, nivelul calciului era semnificativ mai jos la nou-născuții, în comparație cu cei din grupul mamelor cu consum peste 500UI/zi.

Rezultate similare au fost raportate și în studii randomizate de suplimentare cu vitamină D în timpul gravidității. În 1980, Cockburn și coautorii [99, 114] au raportat rezultatele unui studiu cvasirandomizat a 1139 femei scoțiene, care au născut în 2 secții de obstetrică diferite. Un grup de 506 femei a primit 400UI/zi de vitamină D de la termenul de 12 săptămâni de gestație, iar 633 femei din al doilea grup au primit placebo ce nu conținea vitamină D. Calciul, 25(OH)D și fosforul au fost determinate la 24 și 34 săptămâni de sarcină în sângele matern, din cordonul ombilical și la vârsta de 6 zile la copil. Ca rezultat, nivelul de 25(OH)D era mai mare la femeile care au primit supliment de vitamină D și, respectiv, la nou-născuții lor. Incidența hipocalcemiei neonatale s-a dovedit a fi mai înaltă la nou-născuții ce erau alimentați cu formule alimentare artificiale cu un conținut înalt de fosfor în comparație cu cei alăptați la sân. Aproximativ în aceeași perioadă Brooke și coautorii [366] au publicat rezultatele studiului randomizat de suplimentare cu vitamină D a femeilor asiatice din Marea Britanie. Un grup de 59 femei au primit 1000UI/zi vitamină D începând cu săptămâna 28-32 de gestație, cu un grup de control de 67 femei care au primit placebo. Ca rezultat, concentrațiile materne de calciu erau mai înalte la femeile ce au primit vitamină D, iar concentrațiile plasmatice a calciului la nou-născuți în ziua a treia și a șasea erau semnificativ mai înalte la femeile ce au fost suplimentate cu vitamină D în comparație cu grupul de control. De menționat este faptul că la nou-născuții femeilor din grupul de control, care au primit alimentație la sân, aveau un nivel semnificativ mai jos de calciu seric în comparație cu cei din grupul ce a primit vitamină D. Astfel, copiii aveau un risc crescut de dezvoltare a hipocalcemiei simptomatice, care, de fapt, a fost diagnosticată la 5 copii din grupul de control alăptați la sân și nici la unul din grupul principal de intervenție.

Rezultatele obținute sugerează existența unui risc semnificativ de deficiență a vitaminei D la femeile din Moldova care nasc la sfârșitul primăverii sau chiar vara. Această constatare demonstrează în egală măsură faptul, că aportul de 2,5 mg de vitamină D femeilor în luna a 6-a a gravidității permite normalizarea rezervelor de vitamină D la nou-născuți fără un careva risc de supradozare.

Datele clinice și biochimice ne-au permis să evaluăm consecințele neonatale ale carenței de vitamină D și efectele profilaxiei sale prin aportul matern de vitamină D. Vitamina D are un efect cunoscut asupra mineralizării vortexului cranian, iar mărirea fontanelor este un semn clasic observat la copiii mai mari ce suferă de carența vitaminei D. Reducerea perimetrului cranian și a suprafeței fontanelei anterioare observate la copii din Călărași pot sugera un efect benefic al aportului matern de vitamină D asupra mineralizării bolții craniene *in utero*.

În ce privește riscurile manifestărilor clinice ale hipocalcemiei, semnele respective au fost depistate cu o frecvență înaltă (48%) la copiii născuți de la mamele ce nu au primit suplimentar vitamina D. Aceste manifestări clinice din primele zile ale vieții ar putea fi asociate cu nivelele semnificativ scăzute ale calciului în sângele prelevat din cordonul ombilical și examinat la naștere. Ele s-au dovedit a fi și mai frecvente (61%) la copiii cu deficiență de vitamină D confirmată prin nivelul de 25(OH)D sub 10 ng/ml în sângele din cordonul ombilical.

Unii savanți ruși au subliniat că rahitismul este o maladie ce afectează întregul organism, manifestându-se preponderent prin modificări ale scheletului [368]. Formulând termenul de rahitism carențial, Спиричев В.Б.(1980) menționează că este o maladie cauzată de necorespunderea temporară dintre necesitățile organismului în creștere în calciu și fosfor și insuficiența sistemelor ce asigură transportarea lor în organismul copilului.

Printre factorii nutriționali care pot influența acreția osoasă la sugar și copilul mic se includ statutul nutrițional al mamei în timpul gravidității, tipul alimentației sugarului, conținutul fosforului și calciului în formulele alimentare, excluderea de la sîn și inițierea alimentației artificiale, precum și dieta copilului mic și a preșcolarului [369] Gaudelus J (1986). menționează că este absolut necesar de determinat concentrația serică a calciului în toate convulsiile întâlnite la sugari și de exclus în permanență rahitismul carențial. Subliniindu-se faptul că rahitismul carențial este o afecțiune sistemică a sugarilor și copiilor de vîrstă fragedă, mai mulți autori constată hipodiagnosticarea lui cu subaprecierea unei posibile dominări asupra unuia din organe sau sisteme, și astfel de simptome cum ar fi hipotonia, scăderea apetitului, transpirația, acutizarea inflamației atopice, sunt trecute cu vederea [371] sau sunt apreciate ca afecțiuni de altă natură.

Observațiile clinice referitor la dereglările apărării antiinfecțioase în rahitismul carențial au fost efectuate cu mult înainte de formarea concepției contemporane a fiziopatologiei rahitismului și acțiunii metaboliților vitaminei D. Argumentele principale aduse au fost: receptivitatea crescută a sugarilor rahitici la infecțiile respiratorii acute, prezența permanentă a afecțiunilor rahitismale la copiii decedați pe parcursul primului an de viață și micșorarea acestor indici în cazul efectuării unei profilaxii specifice ante- și postnatale corecte și cu doze adecvate de vitamina D.

În Republica Moldova în 1996, conform unui studiu efectuat, cu suportul UNICEF-lui, asupra unui eșantion nereprezentativ al copiilor sub vîrsta de 2 ani, frecvența rahitismului confirmată clinic și radiologic era de 21,5%, iar în 35,5% diagnosticul era stabilit clinic sau radiologic. Aceasta reprezintă un factor de risc important în morbiditatea și mortalitatea

sugarului. Nu rareori sugarii sunt aduși în spitalele pentru crize convulsive ce se dovedesc a fi hipocalcemice în cadrul rahitismului evolutiv. În viziunea noastră, cauzele principale ale menținerii prevalenței crescute ale rahitismului carential în Republica Moldova sunt:

- aplicarea incorectă sau incompletă a profilaxiei cu vitamina D;
- renunțarea la profilaxia cu vitamina D după vârsta de 1 an;
- variațiile individuale ale necesităților de vitamina D și neadaptarea dozelor profilactice de vitamina D, fără trecere la doze terapeutice după apariția primelor semne clinice de rahitism;
- frica de supradozare;
- lipsa unui consens la nivel național, cu privire la dozele profilactice ale vitaminei D;
- situația geografică și zilele puțin însorite pe parcursul întregului an;
- prescrierea frecventă și de lungă durată, nu de fiecare dată argumentată, a fenobarbitalului și a altor anticonvulsivante;
- alimentația incorectă a copiilor primilor luni de viață (lapte integru de vaci la care se adaugă frecvent făină de griș);
- modul de înfășurare a sugarilor;
- acoperirea feței și extremităților sugarilor scoși la plimbare, fapt ce face dificilă fotosinteza dermică a 7 – dehidrosterolului.

La copiii din Călărași care au administrat vitamină D trimestrial valorile 25(OH)D erau în majoritatea cazurilor în limitele normei, iar valorile medii erau comparabile cu cele determinate la copiii cu profilaxie obișnuită utilizată în Republica Moldova (variind de la 700 până la 1500 UI/zi de vitamina D). Valorile, de asemenea, erau comparabile cu valorile medii ale 25(OH)D determinate în același laborator la alți copii ce au primit un aport trimestrial de vitamină D (de exemplu, 27 ± 12 ng/ml la copiii examinați din Algeria). Nivelul dat era semnificativ mai înalt la copiii din Ialoveni, ce sugerează că copiii au primit doze mai înalte comparativ cu cele trimestriale, sau au primit concomitent alte medicamente ce conțineau vitamină D.

În ultimul timp, în legătură cu criza economică internațională care a afectat și continue să afecteze paturile cel mai vulnerabile ale societății, odată cu modificările esențiale ale modului de viață a populației (hipodinamia, consumul excesiv de alimente rafinate), o atenție deosebită se acordă conținutului de micronutrienți, printre care un rol important îl are calciul. Insuficiența calciului în alimentație conduce la dezvoltarea diferitor maladii nutriționale, în special pentru anumite categorii ale populației: copii, adolescenți, femei gravide și care alăptează. Carențele de calciu suferite în această perioadă, prezintă cauza unor patologii, care se manifestă ulterior, dintre care cele mai frecvente sunt retardul dezvoltării intrauterine, hiperparatiroidismul matern și

hipocalcemiile neonatale, convulsiile hipocalcemice la copiii mai mari și adolescenți, rahitismul calciopenic (Pettifor, 1997), osteoporoza/osteomalacia/osteopenia.

Conform datelor FAO, circa 2 mlrd de oameni de pe globul pământesc suferă de malnutriție. Aceasta se referă în special, la țările în curs de dezvoltare și la cele în tranziție, așa cum e Republica Moldova. Totuși, chiar și în țările cu venituri importante ale populației, se atestă stări carențiale grave. Astfel, în Marea Britanie au fost semnalate la adolescenți deficiențe nutriționale de calciu, fier, vitaminele A, B1, B2, C. Consiliul Superior de Igienă Publică din Franța constată, de asemenea, deficiențe moderate în mai multe vitamine (β/α -carotine, E, C, folați, B1, B6, B2) și minerale (calciu, magneziu, fier iod, zinc, seleniu) [372,373].

În cazul calciului, al cărui rol este primordial în menținerea sănătății publice, se constată că 44-45% din bărbați și 52-57% din femei se află în condițiile unor carențe moderate (aportul zilnic este inferior de 80% față de aportul nutrițional recomandat). În plus, este important de menționat, că o alimentație săracă în calciu, semnalează, în marea majoritate a cazurilor, carențe ale mai multor micronutrienți. Aceasta este una din cauzele, pentru care nu se recomandă eradicarea carențelor de calciu pe cale medicamentoasă. Astfel, calciul este un indice important al calității alimentației [374, 375, 376].

Cauzele principale ale insuficienței calciului în organism sunt următoarele: insuficiența de produse alimentare (malnutriție), influența compoziției dietei (calciu, fosfor, proteine), dereglarea absorbției calciului în organism, intoleranța la produse lactate, factori endocrini, sexuali, forțe mecanice (activitatea fizică, greutatea corporală la naștere și în diferite perioade ale copilăriei), factorul genetic, etc. [377, 378, 379]. Un rol determinant în insuficiența calciului îi revine asimilării calciului de către organism. Dereglarea absorbției intestinale, poate fi provocată de o serie de factori: îmbolnăviri gastro-intestinale, inclusiv parazitare, incidența căror este destul de înaltă în ambele loturi studiate de către noi; malabsorbția primară; malabsorbție secundară și insuficiență digestivă; carența vitaminei D; insuficiența în dietă; dezechilibrarea medicamentoasă; legarea calciului (chelarea) cu diferiți componenți ai alimentelor (oxalați, fitați); reducerea absorbției odată cu îmbătrânirea organismului [380, 381]. Insuficiența de alimente bogate în calciu disponibil, constituie, în majoritatea situațiilor, principala cauză a lipsei calciului în organism. Asupra biodisponibilității calciului influențează un număr impunător de substanțe [382]. În primul rând se remarcă fibrele alimentare. Dar influența celulozei asupra disponibilității substanțelor minerale este relativ scăzută. Aceleași studii care se referă la metilceluloză menționează că ele practic nu influențează asupra absorbției intestinale a calciului și fierului [382]. Totuși, analiza calitativă a meniului dietelor copiilor din școala internat din

Orhei denotă că fibrele au o pondere importantă în alimentația zilnică a lor (mazăre, fasule, varză). În mai multe lucrări a fost studiată influența fibrelor complexe, sărace în fitați care provin din diverse legume (morcovi, varză, mazăre și fructe), în care n-a fost constatată influența acestora asupra bilanțurilor substanțelor minerale [383, 384].

Alimentele bogate în calciu, dar care conțin o cantitate importantă de antinutrienți, asociați absorbției calciului (fitați, taninuri, oxalați ș.a.) nu pot, de regulă, satisface necesitățile organismului, nefiind capabile de a fi absorbite și valorificate. Astfel, pe plan mondial, dar și în Republica Moldova, se atestă un spectru larg de deficiențe nutriționale în micronutrienți. Cauzele acestor curențe sunt diverse. În linii generale, conform relațiilor savantului moldovean Natalia Motruc [401], acestea ar putea fi generalizate prin următoarele:”- factori socio-economici, care determină nivelul de viață al populației și care depinde puterea de cumpărare și varietatea alimentației populației; - situația geopolitică a teritoriului, eroziunea solului, în general cea provocată de superexploatare și de ploile acide; - condițiile tradiționale de alimentație, care determină consumul prioritar de alimente de proveniență vegetală, cu un conținut înalt de antinutrienți capabili de a exercita o competiție asupra site-urilor de absorbție a micronutrienților și de a diminua considerabil acest aport; - aplicarea tehnologiilor moderne de transformare a materiei prime și a alimentelor, care contribuie la diminuarea conținutului de micronutrienți; - nivelul redus al populației, în privința alimentației raționale și echilibrată; - subestimarea de către factorii de decizie a rolului sănătății ca factor prioritar în dezvoltarea economică a țării; - absența unui cadru legislativ și a programelor strategice de prevenire și eradicare a maladiilor nutriționale”.

Studiile din ultimii ani au dovedit că calitatea alimentației contemporane nu satisface pe deplin necesitățile organismului în creștere în calciu. Conform cercetărilor americani, doar 25% băieți și 10% de fete întrebuințează zilnic cantități suficiente de calciu [385, 386]. În Federația Rusă, aportul diurn al calciului la copii și adolescenți este foarte jos. Astfel, la jumătate din ei aportul constituie doar 50% din necesitățile fiziologice ale vârstei [387].

În cazul calciului, al cărui rol este primordial în menținerea sănătății publice, se constată că 44-45% din bărbați și 52-57% din femei se află în condițiile unor curențe moderate (aportul zilnic este inferior de 80% față de aportul nutrițional recomandat [384].

“Cu toate că o varietate largă de alimente, provenind din diferite surse și din diferite regimuri alimentare, sunt bogate în calciu, biodisponibilitatea sa poate varia considerabil. Mai mulți compuși vegetali printre care fibrele, fitații, oxalații și acizii uronici sunt responsabili de o biodisponibilitate redusă a calciului [380, 388, 389, 401]. Astfel, ingestia unui produs pe bază de

grâu integral poate rezulta la om într-un bilanț calcic negativ. Totuși, se menționează, că reducerea absorbției minerale, provocată de alimentele bogate în fibre poate fi legată mai mult de fitați” [400, 401]. Grâul conține fitați – săruri ale acidului fitic, stratul aleuronic fiind depozitarul principal (până la 87%), urmat de germene (până la 31%) și endosperm (până la 2%)[400, 401].

Adolescența este perioada cea mai vulnerabilă din punct de vedere al nutriției raționale, luând în considerație maturizarea, solicitările fizice și psihice mărite. Deficitul pronunțat de principii nutritive influențează negativ capacitatea de muncă, reduce fagocitoza, puterea musculară a copilului și poate provoca chiar stagnarea creșterii și dezvoltării fizice. Unii autori [400, 401] consideră, că organismul copilului se adaptează la subalimentație prin talie joasă, ceea ce înseamnă reducerea ritmului de creștere. Copiii și adolescenții necesită o cantitate de calciu mai sporită decât adulții, deoarece anume în această perioadă se dezvoltă capacitatea organismului de a absorbi și de a valorifica calciul exogen [393, 394, 395]. În Republica Moldova, în baza dispoziției Ministerului sănătății, în 1991 au fost aprobate normele fiziologice ale principiilor nutritive care diferă în dependență de vîrstă și sex. Anterior a fost menționat că persoanele în etate, care în copilărie sau în adolescență au suferit de carențe în calciu, sunt mai predispuși la osteoporoză [396, 397, 398, 401].

Cu toate acesta, carența calciului în rația copiilor este destul de frecventă. Cu vîrsta (11-18 ani) deficitul de calciu sporește din cauza reducerii consumului de lapte, fapt care uneori contribuie la creșterea frecvenței osteoporozei și fracturilor osoase. Jumătate de litru de lapte și 25-30g de cașcaval, servite zilnic, acoperă necesitățile fiziologice în calciu ale copiilor. O atenție sporită necesită alimentația copiilor lactazo-intoleranți, la care s-a constatat un nivel mult mai redus de calciu în ser decât la copiii sănătoși [390, 391]. În studiul nostru, au semnalat că nu suportă laptele și produsele lactate 9 copii din Școala internat din orașul Orhei și 3 dintre cei spitalizați în spitalul clinic de copii nr. din or. Chișinău.

Estimînd statutul nutrițional al copiilor instituționalizați pe o perioadă de 12 de zile în Școala internat nr.16 din orașul Chișinău, Natalia Motruc [401] raportează că cantitatea medie zilnică a calciului în rația alimentară a elevilor din această instituție era de 66,7mg Ca/zi, ceea ce constituia 55,14% față de norma recomandată. Cu toate că carența acestui microelement în rația alimentară nictemerală este destul de frecventă, cercetările efectuate în regiunile de sud din Polonia la acest capitol denotă ca rația copiilor de 1-14 ani nu acoperă necesitatea nictemerală în calciu și fosfor cu excepția elevilor din clasele primare[402].

De menționat, că o alimentație săracă în calciu semnalează, în marea majoritate a cazurilor, carențe ale mai multor micronutrienți. Aceasta este una din cauzele, pentru care nu se

recomandă eradicarea carențelor de calciu pe cale medicamentoasă. Astfel, calciul este un indice important al calității alimentației [403, 404]. Rezultatele studiului au scos în evidență că aportul mediu zilnic de P constituie doar 67,51% din necesități, fiind cauzat în viziunea noastră de cantitățile considerabil scăzute ale produselor lactate din rația zilnică alimentară a copiilor. Cantitatea medie zilnică de fier din raționul alimentar zilnic constituia 87,05%, fapt ce, de rînd cu incidența înaltă a parazitozelor intestinale, au condus în ansamblu la frecvența mare a anemiilor feriprive la acești copii.

Argumentul posibilității de recuperare a deficienței moderate de fier prin produse alimentare actualmente este considerat ca fiind greșit. Există multiple și convingătoare dovezi care demonstrează faptul că corectarea deficienței de fier numai prin intermediul dietei este imposibilă, deoarece asimilarea fierului din produsele alimentare este limitată. Dieta îmbogățită cu produse cu conținut majorat de fier nu sporește asimilarea fierului – organismul uman este capabil de a însuși 2,0 . 2,5 mg de fier în 24 ore.

Remediile medicamentoase, însă, pot asigura o rată de asimilare a fierului de 20 de ori mai mare. În așa mod, dietoterapia nu are semnificații proprii în terapia anemiilor fierodeficitare stabilită la acești copii și în general, însă este apreciată ca un component auxiliar al tratamentului. Prin urmare, copiii instituției date necesită o suplimentare cu fier medicamentos întru redresarea situației create.

Totuși, dieta echilibrată cantitativ și calitativ este un factor real și esențial al profilaxiei anemiilor sideropenice [405]. Organizația mondială a sănătății (OMS) a determinat (1994) starea patologică „insuficiența de Mg” ca maladie, care în clasificarea internațională a maladiilor, reviziunea a 10 (CIM-10) are codul E 61.3 și deseori carența lui se întâlnește ca diagnostic concomitent. Conform recomandărilor OMS (2002), nivelul normal al Mg în serul sanguin la copii este de 0,74-1,15 mmol/l (18-24mg/l). Un nivel de 0,5-0,7 mmol/l (12-16,8mg/l) denotă o insuficiență moderată de Mg în organism, iar un nivel inferior de 0,5 mmol/l (12mg/l) denotă o insuficiență severă. Cercetările noastre ne-au permis să constatăm că 28 de copii din această instituție aveau o concentrație serică a Mg inferioară de 0,5 mmol/l (12mg/l). Cu toate că aportul Mg în rația alimentară, spre deosebire de Ca, Fe, și fosfor, este relativ mai bună, totuși, situația este la fel de alarmantă. Unii autori [406, 407, 408] au constatat că deficitul de Mg este prezent la copiii supuși stresului cronic, la cei care suferă de depresie și autism. Aflându-se sub supravegherea noastră mai mult timp, am constatat că majoritatea copiilor din Școala internat din Orhei provin din familii incomplete sau chiar orfani, ori unul/ambii dintre părinți suferă de alcoolism sau se află în locurile de detenție, făcînd parte din categoria celor socialmente

vulnerabili. Probabil aceste circumstanțe au jucat un rol decisiv în geneza stărilor de hipomagnezie, de rînd cu alimentația dezechilibrată zilnică. Stresul de orice geneză (fizic, psihic) crește necesitatea de Mg și generează insuficiență intracelulară de magneziu. Aceste fenomene se induc și se agravează reciproc. Starea de stres acut sau cronic conduce la majorarea adrenalinei și noradrenalinei în sînge, care la rîndul lor generează ieșirea Mg^{2+} intracelular și pierderea lui cu urina. Studiile au demonstrat că un aport satisfăcător de magneziu influența cateholaminelor poate fi atenuată, iar la copii crește astfel rezistența față de stres. Cercetările lui P. Suter (1999) au demonstrat că deficitul de Mg este o condiție necesară pentru declanșarea aterosclerozei cu determinism genetic. În condiții de dietă aterogenă, deficitul alimentar de magneziu este un vector precoce în afectarea sclerotică a vaselor și invers, includerea preparatelor de Mg conduce la regresarea hipercolesterinemiei. Deficitul de magneziu crește sensibilitatea organismului la infecții, în special la neuroinfecții, iar șocul toxico-bacterian decurge mai grav, microorganismele generînd mai activ β -lactamaza și formează rezistența la antibioticele din grupul penicilinelor. În starea de deficit de Mg *Stafilococul auriu* produce intensiv toxina-1, considerată responsabilă de șocul toxico-infecțios. Totodată, preparatele de magneziu micșorează riscul de neurotoxicitate a gentamicinei și accentuează activitatea antimicrobiană a penicilinelor naturale, sistemice și sintetice.

Datorită rolului său important în absorbția calciului, vitamina D ar putea juca un rol pozitiv în managementul tensiunii arteriale. În plus, s-a stabilit că un regim alimentar nutrițional care conține cantități insuficiente de vitamina D crește tensiunea arterială prin activarea sistemului renină-angiotensină-aldosteron, care determină vasoconstricția, precum și retenția de sodiu și apă în organism. Alte minerale conținute în produsele lactate, cum ar fi magneziul și potasiul, ar putea reglementa tensiunea arterială, dar este dificil de evaluat contribuția lor individuală, deoarece ambele elemente nutritive sunt de obicei în alimente bogate în calciu.

Mai multe studii au arătat că produsele lactate pot preveni pierderea de masă musculară și forță care apar odată cu vîrsta. Acest fenomen, numit sarcopenie, ar putea fi prevenit datorită activității fizice și unei diete bogate în produse lactate și vitamina D. Recomandările sunt făcute de Fundația Internațională de Osteoporoză și Societatea pe Sarcopenia și Cașexie și se bazează pe faptul că utilizarea regulată a produselor lactate ar avea un impact pozitiv asupra mușchilor, crescînd masa musculară scheletică, îmbunătățind structura osoasă și sporind masa osoasă totală, inclusiv masa osoasă apendiculară, în același timp, crescînd densitatea minerală osoasă, precum și masa osoasă trabeculară, crescînd forța musculară și capacitățile funcționale în general.

Conform numeroaselor studii efectuate în Republica Moldova în cadrul Institutului de cercetări științifice în domeniul ocrotirii sănătății mamei și copilului, Centrului Național Științifico-practic de Medicină Preventivă, Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” cu suportul UNICEF-lui și savanților din Franța [409, 410, 411, 412], deficitul calciului din alimentație prezintă o problemă de sănătate publică pentru întreaga țară. Cauzele principale ale acestui fenomen rezidă în structura alimentației, cauzată de veniturile mici ale majorității populației, la care se constată un consum foarte redus de lapte și al produselor lactate, predominând alimente de origine vegetală, bogate în antinutrienți [413, 414, 415]. Efectuând un studiu amplu asupra alimentației copiilor din familiile originare din Republica Moldova A. Gutțul (2001), menționează ca raportul între calciu și fosfor trebuie să fie pentru copiii de 1-3 ani – 1:1,4, la 10 ani – 1:1,5, la 11-17 ani – 1:2. În realitatea acest raport la copiii alimentați în familii este pentru vârsta de 1-6 ani – 1:2; 11-17 ani (băieți) – 1:2,7; 11-17 ani (fete) 1:2,3. Raportul între calciu și magneziu trebuie să fie de 1:0,7, în realitate s-a constatat că el iera pentru toate vârstele de 1:0,5, cu excepția băieților de 11-13 ani, unde raportul iera de 1:0,6. Autorul menționează, că carența de calciu se întâlnește la toate vârstele, fiind mai pronunțată la băieții de 11-17 ani (53,3-57,7%). Pentru rația alimentară a copiilor este caracteristic și un anumit deficit de fosfor, cu toate că el este mai puțin exprimat (18,9%) în comparație cu alte microelemente. În comparație cu normele fiziologice, insuficiența de fosfor este caracteristică mai mult pentru fetele de 11-13 ani (37,3%), practic exclusă la copiii de vârstă preșcolară (1-6 ani). În dependență de sezon, cercetătorul constată că deficitul de fosfor în rația copiilor variază în limitele puțin exprimate – 17,3 și 21,1%, situația fiind mai agravată în timp de vară-toamnă, când scade rata produselor animaliere consumate. De luat în considerație și faptul, că sursa principală de calciu pentru organism reprezintă produsele alimentare, valoarea cărora poate fi apreciată din punct de vedere al conținutului de calciu, pe de o parte și al biodisponibilității acestuia pentru absorbția de organismul uman, pe de altă parte. Un conținut și o biodisponibilitate înaltă a calciului se înregistrează pentru produsele lactate, care se consideră o sursă principală de calciu alimentar. Alte produse de proveniență animalieră (carnea, peștele de apă dulce, subprodusele) conțin calciu în cantități nesemnificative. Produsele vegetale se caracterizează prin conținutul de calciu de la moderat până la nesemnificativ, excepții fac leguminoasele și unele verdețuri. Însă biodisponibilitatea calciului din aceste surse este redusă [416].

Conform datelor statistice de consum alimentar, referitor la cantitatea de lapte și produse lactate pe cap de locuitor, Moldova se află chiar mai jos și de cât alte țări din Europa de Est și alte

țări din lume, cedînd doar Japoniei, care acoperă probabil aceste deficiențe printr-un consum înalt de pește de mare și ocean mult mai bogat în vitamina D și calciu decît peștele de apă dulce consumat la noi în țară, a unei mai mari cantități de ouă pe cap de locuitor și, posibil, ale unor verdețuri/leguminoase bogate în micro/macronutrienți. Totodată, produsele lactate aduc și o încărcătură alcalină, care reduce excreția urinară a calciului de rînd cu a sodiului care prin acțiunea sa mărește excreția calciului. Rezultanta acestor efecte inverse constau în creșterea pierderilor urinare ale calciului. Totuși, acest efect este neglijabil dacă ținem cont de cantitățile enorme de calciu furnizate de către produsele lactate [417].

Michéle Garabédian (2016), în una din publicațiile sale, menționează că produsele lactate furnizează organismului nu doar cea mai mare cantitate de calciu, ci odată cu aceasta și alți factori care trebuiesc luați neapărat în considerație grație beneficiului lor asupra sănătății osoase [418]. Autoarea subliniază că în lipsa unui consens asupra nivelului de aport de calciu și un aport insuficient de produse lactate se poate repercuta negativ asupra taliei și câștigului de masă osoasă în timpul copilăriei și al debutului de adolescență. Se consideră că produsele lactate, din cauza cantității mare de calciu pe care îl conțin, contribuie la creștere și la mineralizarea scheletală a copilului, precum și la menținerea unui statut osos satisfăcător la persoanele adulte și a celora în vîrstă. Reieșind din acestea, se recomandă de consumat zilnic cîte 2-3 produse lactate cu un aport de 800 – 1 300 mg de calciu/zi pentru populația franceză [419, 420] și cea a Statelor Unite ale Americii [421].

R.P. Heaney, în 2000 publică un articol de sinteză din 139 surse, care demonstrează în mod elocvent rolul pozitiv al calciului dietar sub formă de produse lactate asupra statutului osos la copii și adulți [386]. Totodată, două alte reviste publicate în anii 2000 și 2005 consideră că nu există dovezi științifice suficiente pentru a valida recomandările ce vizează aportul produselor lactate pentru ameliorarea « sănătății osoase » a populației americane, în special la copii și adolescenți [422, 423]. Aceste divergențe sunt, însă, parțial legate de dificultățile de analiză a diferitor determinante ale mediului înconjurător ce influențează masa osoasă. De exemplu, este greu de făcut distincție dintre efectele proprii produselor lactate (surse majore de calciu) și cele legate de aportul calcic total, deoarece alte surse de calciu (apa de băut și verdețurile) sunt rar semnalate și înregistrate în chestionarele alimentare.

Din cauza aceleiași greșeli ale chestionarului întocmit sau ale grupelor de martori constituite, este aproape imposibil de apreciat rolul specific jucat de către diferiți componenți ai produselor lactate. Mai mult, componența diferitor produse lactate variază în funcție de politicile naționale de îmbogățire cu vitamine și săruri minerale. Aceasta din urmă, poate constitui sursa de

divergență dintre rezultatele obținute, ale produselor lactate îmbogățite sau nu cu vitamina D. În sfârșit, alte determinante ale mediului înconjurător ce ar influența masa osoasă, ca de exemplu greutatea corporală și activitatea fizică, în majoritatea studiilor, s-a ținut rar cont de ele.

Totuși, majoritatea autorilor, menționează că impactul pozitiv al lactatelor și/sau calciului asupra statutului osos, este mai pronunțat la subiecții ce au avut un aport calcic spontan slab și /sau când necesitățile în calciu erau mai mari (creștere rapidă, talie înaltă, activitate fizică intensă). Două studii recente de intervenție, randomizate contra placebo, ilustrează în mod convingător esența acestor divergențe. Astfel, aportul de calciu (1g/zi) și de vitamina D (400 UI/zi) pe o durată de 7 ani, n-a avut decât un efect protector nesemnificativ asupra densității osoase, fără a minimaliza riscul de fracturi la 18.000 femei din SUA cu vârsta cuprinsă între 50 - 79 ani, femeile în cauză avînd un aport spontan de calciu (1148mg/zi) și de vitamina D (365UI/zi) aproape sau superioare de aporturile recomandate [424]. Din contra, un aport similar de calciu (1200 mg/zi) și de vitamina D (800 UI/zi) a permis reducerea cu aproximativ 40% riscul fracturilor de col femural la 190 femei în vîrstă instituționalizate din Franța, care au avut un aport deficitar de calciu și vitamina D, documentat prin existența unui hiperparatiroidism secundar [425].

Aceste remarci prealabile, fac ca evoluarea efectelor osoase în termen scurt și lung al consumului de produse lactate la copil:

- să fie dificil disociate de cele ale efectului calciului; - să se țină cont de aportul spontan în calciu și de viteza de creștere a copiilor;

- să se țină neapărat cont de aportul în calciu în evaluarea masei minerale osoase sau a fracturilor pe termen lung la adult și persoanele în vîrstă.

Produsele lactate sunt prețioase nu doar după aportul înalt de calciu, ci și prin faptul că aprovizionează organismul uman și cu alte elemente ce favorizează mineralizarea optimă a scheletului, inclusiv :

- cu fosfați, necesari pentru formarea cristalelor de hidroxi de apatită care se precipită pe matricea osoasă ;
- cu alte minerale cum ar fi magneziul și zincul;
- cu proteinele care favorizează constituirea matricei date și creșterii osoase, pornind *via* de la producerea IGF-1;
- cu lactoză care ameliorează absorbția intestinală a calciului, încetînd tranzitul bolului alimentar;

- cu fosfopeptide provenite din cazeină, care în unele circumstanțe, favorizează absorbția intestinală a calciului și proteine bazice (MBP) care par să joace un rol protector asupra osului, diminuând în esență resorbția osoasă [426];
- cu vitamina D, în caz de îmbogățire a lactatelor, care mărește capacitatea de absorbție a calciului de către intestin, avînd și influență directă asupra celulelor osoase.

Studiile transversale nu găsesc decît în mod inconstant o asociere dintre aporturile spontane în calciu și mineralizarea osoasă la copil și adolescent [427]. Totuși, în 11 din 12 studii randomizate de aport suplimentar de calciu pe o perioadă de 1-4 ani, au demonstrat un efect pozitiv de la 1 la 6% asupra conținutului mineral, densității minerale sau asupra creșterii osoase, la nivel de minimum un sit osos la copii și adolescenții cuprinși între vîrsta de la 6 pînă la 10 ani [428]. Din experiența acumulată de către echipa lui Michéle Garabédian din cadrul INSERM UNITATEA 561, mai mult de 300 de copii și adolescenți ce locuiau în Franța, 10-30% din ei consumau mai puțin de 800mg/zi de calciu, avînd o densitate minerală osoasă a vertebrelor inferior de -1DS a Z-scorului. Această frecvență se ridică pînă la 40% dacă consumul slab de calciu este însoțit de rezerve joase a vitaminei D (concentrații circulante a 25-(OH)D mai joase de 10 ng/ml). Efectele negative ale deficienței de aport în calciu sau în produse lactate la copii și adolescenți, par a nu se limita doar la defecul de mineralizare. Un studiu de corelare vine să demonstreze relația pozitivă dintre consumarea de lapte la copii și adolescenți (15-17 ani) și talia la adult [429]. S-a constatat că riscul fracturilor la copil este mai mare în perioada de pubertate [430]. Unele studii au raportat despre existența unei asocieri inverse la fetele tinere în special dintre numărul fracturi dintr-o parte și a conținutului mineral al vertebrelor și oaselor lungi și lungime/diametrului acestor oase din altă parte [429, 430].

Rezultatele studiului au scos în evidență că aportul mediu zilnic de P constituie doar 67,51% din necesități, fiind cauzat în viziunea noastră de cantitățile considerabil scăzute ale produselor lactate din rația zilnică alimentară a copiilor [177].

Cantitatea medie zilnică de fier din raționul alimentar zilnic constituia 87,05%, fapt ce, de rînd cu incidența înaltă a parazitozelor intestinale, au condus în ansamblu la frecvența mare a anemiilor feriprive la acești copii. Argumentul posibilității de recuperare a deficienței moderate de fier prin produse alimentare actualmente este considerat ca fiind greșit. Există multiple și convingătoare dovezi care demonstrează faptul că corectarea deficienței de fier numai prin intermediul dietei este imposibilă, deoarece asimilarea fierului din produsele alimentare este limitată. Dieta îmbogățită cu produse cu conținut majorat de fier nu sporește asimilarea fierului – organismul uman este capabil de a însuși 2,0 . 2,5 mg de fier în 24 ore.

Remediile medicamentoase, însă, pot asigura o rată de asimilare a fierului de 20 de ori mai mare. În așa mod, dietoterapia nu are semnificații proprii în terapia anemiilor fierodeficitare stabilită la acești copii și în general, este apreciată ca un component auxiliar al tratamentului. Prin urmare, copiii instituției date necesită o suplimentare cu fier medicamentos întru redresarea situației create. Totuși, dieta echilibrată cantitativ și calitativ este un factor real și esențial al profilaxiei anemiilor sideropenice.

Efectuarea unor anchete asupra a 206 copii din diferite sectoare din or. Chișinău, ne-a permis să constatăm că copiii de vîrstă școlară în majoritatea cazurilor (95,6%), servesc zilnic pînă la 3 mese, predominînd produsele din carne și paste făinoase. Nici un copil nu consumă zilnic produse lactate iar cantitatea medie de lapte consumat într-o zi nu depășea 200-250 ml. Odată cu vîrsta, această cantitate este și mai mică. Astfel, am constatat că în 62% de cazuri, copiii ce depășeau vîrsta de 11 ani, consumau produse lactate mai rar de odată pe săptămîină și nu mai mult de 200 ml de lapte în zi.

Pentru a concluziona, trebuie de spus că strategiile de prevenire a carenței vitaminei D sunt propuse acestor grupuri populaționale, ținîndu-se cont de îmbogățirea sistematică a produselor lactate cu vitamină D, cu aport sufficient de calciu și cu biodisponibilitate optima a lui, care ar trebui să aiba loc pe baza unei reglementări stabilite de Ministerul Sănătății în acord cu cel al industriei alimentare din țară și țările limitrofe.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii generale

1. Investigațiile impactului carenței vitaminei D asupra statutului clinico-biologic și genetic în perioadele de dezvoltare intrauterină și postnatală a copilului, realizate pe două loturi de femei gravide (200) și copii (200) din R. Moldova, Franța și Algeria, cu utilizarea metodelor clinice, fiziologice, biochimice, molecular biologice, au stabilit: nivel seric scăzut al 25(OH)D la circa 27% de femei gravide la naștere, ponderea înaltă a rahitismului carențial (15%), hipocalcemiilor neonatale (48%), convulsiilor (23%), anemiilor (30%) și bronșitelor (26%) la sugarii primului an de viață nesuplimentați cu vitamina D.
2. Riscul dezvoltării osteoporozei senile, fiind o maladie cauzată preponderent de insuficiența vitaminei D, poate fi minimalizat, aplicând profilaxia primară a hipovitaminozei D, începând cu perioada antenatală prin suplimentarea femeilor gravide și trimestrială a copiilor primului an de viață cu o doză de 2,5 mg (100 000 UI) de Vitamina D₃.
3. Impactul deficienței de vitamină D în timpul sarcinii, se manifestă indiferent de condițiile geografice și climaterice, exteriorizându-se prin hipocalcemii neonatale și alte dereglări similare ale metabolismului fosfocalcic.
4. Deformările membrelor inferioare și dereglările metabolismului fosfo-calcic, au loc preponderent în perioada creșterii și mineralizării osoase intense, ce necesită 1000 – 1500 UI/zi, în special, toamna târzie și iarna.
5. În cazul exteriorizării primelor semne ale carenței de vitamină D, în scopul stopării evoluției lor, e necesară administrarea unor doze stoss de 100 000 UI săptămânal, în total 4 doze, apoi de trecut la doza profilactică cotidiană sau trimestrială, până la normalizarea completă a statutului vitaminei D.
6. Au fost evidențiate 3 haplotipuri ale promotorului genei VDR, dependente de valorile pragurilor 25(OH)D și nivelul calciului din dietă: calcemia la indivizii în ADN-ul nuclear al cărora nu a fost identificat Hap 1, se menține în limitele normei, pe când la cei la care a fost depistat 1 sau 2 Hap 1, calciul seric a înregistrat valori scăzute.
7. Polimorfismul genei Klotho n-a manifestat asociere corelativă cu calcemia și valorile pragului vitaminei D, dar influențează benefic procesele de maturizare ale organismului fetelor în perioada pubertară.

8. Impactul polimorfismelor CC ale genei Klotho și polimorfismelor CT+TT ale genei LCT asupra conținutului calciului seric și asupra intoleranței/toleranței lactozei depinde de nivelul vitaminei D în sânge.
9. Problema științifică soluționată în cercetare rezidă în aprecierea conceptuală complexă a verigilor patogenetice ale hipocalcemiei și rolul unor gene implicate în structura și fiziologia țesutului osos, raportate la evaluarea complexă a copiilor în funcție de etapele de creștere și dezvoltare, în vederea optimizării strategiilor de profilaxie specifică ante- și postnatală a carenței de vitamina D în baza factorilor genetici, socio-demografici, nutriționali, mediului ambiant și factorilor endogeni.

Recomandări practice

Pentru valorificarea unui management rațional și eficient de conduită al copiilor cu hipocalcemie emitem câteva recomandări:

- 1. Profilaxia impactului carenței vitaminei D asupra dezvoltării intrauterine a fătului și a nou-născutului în perioada neonatală precocă.**
 - a) Pentru corecția eficientă a deficitului de vitamina D la femeile gravide cu risc (nașterile în lunile martie-iunie, nașterile repetate cu perioadă scurtă între ele, neexpunerea suficientă la soare sau care primesc antituberculoase și anticonvulsivante/antiepileptice ș.a.), pentru ameliorarea indicilor antropometrici ai fătului, profilaxiei dezvoltării stărilor de hipocalcemie și contribuției mineralizării optime a țesutului osos la nou-născuți, se propune suplimentarea gestantei la termenul de 6 – 7 luni cu o singură doză stoss de vitamina D a câte 2,5 mg (100 000 UI) sau câte 400 UI/zi, permanent, începând cu termenul de gestație de 12 săptămâni.
- 2. Profilaxia dezvoltării rahitismului carențial în perioada postnatală.**
 - a) Nou-născuților și sugarilor ce primesc produse lactate adaptate, îmbogățite cu vitamina D (400 – 600 UI/litru de lapte), a se administra trimestrial până la vârsta de 12 luni 2- 2,5 mg (80 – 100 000 UI) de vitamina D3.
 - b) Copiilor mai mari de vârsta de 12 luni, până la vârsta de 2,5 ani, a se administra câte 2 – 2,5 mg de vitamina D3 trimestrial în lunile de toamnă - iarnă, prima doză stoss, fiind administrată în luna noiembrie și ultima doză, în luna februarie sau câte 1000 – 1500 UI/zi în lunile cu „r”.

- c) Copiilor în vârstă fragedă de copilărie (de la 2 până la 5 – 6 ani) și adolescenților, a se administra o singură doză stoss de 2,5 mg (100 000 UI) la începutul iernii sau câte 400 – 800 UI/zi în lunile cu „r”.

3. Profilaxia demineralizării osoase.

- a) În scopul profilaxiei demineralizării osoase în perioada de sarcină și copiilor cu insuficiență a lactazei ce consumă cantități reduse de lapte/produse lactate (mai puțin de 250 ml în perioada de sarcină și mai puțin de 500 ml în perioada de adolescență) se recomandă suplimentarea zilnică cu calciu gluconat sau carbonat a câte 1g la metru pătrat (m^2) ($m^2 = 4m+7$; $m+90$ unde m este greutatea corporală în kg).

4. Tratamentul curativ al deficitului/insuficienței vitaminei D în dependență de valorile pragurilor serice ale 25(OH)D

- a) În cazul carenței simple/insuficienței vitaminei D (valorile pragului seric al 25(OH)D fiind egal cu 10 – 30 ng/ml sau 75 – 25 nmol/L) se recomandă o doză stoss de 2,5 mg (100 000 UI) de vitamina D₃, repetată la 1 și 3 luni de interval.
- b) În cazul carenței simple/insuficienței vitaminei D (valorile pragului seric al 25(OH)D fiind egal cu 10 – 30 ng/ml sau 75 – 25 nmol/L), însoțită de hipofosfatemie, se recomandă o doză stoss de 2,5 mg (100 000 UI) de vitamina D₃ lunar până la normalizarea fosfatemiei.
- c) Tratamentul carenței simple/insuficienței vitaminei D (valorile pragului seric al 25(OH)D fiind < 10ng/ml sau < 25 nmol/L, însoțit de hipofosfatemie persistentă), se indică doza stoss de 5 mg (200 000 UI) de vitamina D₃/lună pe parcursul a 2 luni, iar dacă hipofosfatemia persistă, de continuat cu 2,5mg (100 000 UI) lunar până la normalizarea fosfatemiei.
- d) Tratamentul carenței simple/insuficienței vitaminei D (valorile pragului seric al 25(OH)D fiind < 10ng/ml sau < 25 nmol/L, însoțit de hipocalcemie, calciul seric fiind < 2 mmol/L), se recomandă suplimentarea urgentă cu gluconat de calciu a câte 1g/ m^2), diluat cu soluție izotonică de glucoză de 5% în raport de 1:4, până la atingerea nivelului seric al calciului total de 2 mmol/L, după care, se recomandă de continuat administrarea gluconatului de calciu per os, conform vârstei pe parcursul a 24 – 48 ore.
- e) În cazul când concentrația calciului seric este > 2mmol/L, însoțită de semne radiologice osoase caracteristice rahitismului carențial, se recomandă administrarea a 5mg (200 000 UI) de vitamina D₃ per os într-o singură priză (doza stoss), repetată peste 1 lună, de rând

cu administrarea gluconatului de calciu a câte 0,5 – 1g/zi în decurs de 15 zile, urmat mai apoi de tratamentul preventiv al hipovitaminozei D.

- f) În caz de asociere a deficitului vitaminei D cu carența ferului/folaților se recomandă administrarea tardiferonului câte 10mg/kg/zi în decurs de 3 – 4 luni.
- g) Tratamentul carenței simple/insuficienței vitaminei D (nivelul seric al 25(OH)D, fiind cuprins între 10 – 30ng/ml sau 75 – 25 nmol/L) la adolescent și persoana adultă, se recomandă administrarea dozei stoss de 2,5mg (100 000 UI) de vitamina D₃, fiecare 2 săptămâni pe parcursul a 2 luni (în total 4 doze stoss per os).

NB: Pentru o corecție rațională și eficientă a valorilor pragurilor deficitului/carenței vitaminei D, a se ține cont de faptul că este necesar de administrat 100 UI/zi de vitamina D₃ pentru a avansa nivelul seric al 25(OH)D cu 1 ng/ml.

- 5. Valorificarea algoritmului de diagnostic al stărilor de hipocalcemie (Anexa 6), în special, a grupului de risc, ce necesită indiscutabil investigații genetice:
 - hipofosfatemia constatată la copiii de vârstă fragedă;
 - hipo- sau hipercalcemia de lungă durată și/sau recidivantă «*inexplicabilă*»;
 - dezvoltarea fizică, scheletică nearmonioasă;
 - hipostatură neconstituțională;
 - copilul cu retard *in utero*;
 - hipolactozemia;
 - copiii frecvent bolnavi (mai mult de 5 episoade de IRA pe an);
 - retard de pubertate;
 - nedeveloparea nucleelor de osificare corespunzător vârstei biologice;
 - dentiție patologică;
 - deformări ale membrilor inferioare și ale coloanei vertebrale;
 - osteoporoză difuză depistată radiologic sau la densitometria osoasă;
 - caz(uri) de rahitism tardiv în familie; caz(uri) de fosfat-diabet la unul sau mai mulți membri ai familiei;
 - caz(uri) de rahitism pseudocarențial în familie;
 - caz(uri) de rahitism hipofosfatic autosomal dominant în familie;
 - fractură spontană de col femural după 50 de ani la unul sau mai mulți membri ai familiei;
 - diverse deficiențe imune;
 - bolnavii cu scleroză multiplă în familie;
 - bolnavii de epilepsie;

- bolnavii de astm bronșic;
- bolnavii cu diabet de tipul I;
- bolnavii de tuberculoză sau alte granulomatoase (sarcoidoză, lepră, pseudotuberculoză).

BIBLIOGRAFIE

1. Popa F.L. Etiopatogenia osteoporozei masculine. În: Revista Medic ro, 2006, nr 23, p. 36-39.
2. Gupta V. Vitamin D: Extra-skeletal effects. In: J Med Nutr Nutraceut, 2012; nr 1, p. 17 – 26.
3. Blomberg J. M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. In: Hum Reprod, 2010, vol. 25, p. 1303-1311.
4. Tao Q., et al. Vitamin D prevents the intestinal fibrosis via induction of vitamin D receptor and inhibition of transforming growth factor-beta1/Smad3 pathway. In: Dig Dis Sci. 2015, vol. 60(4), p. 868-875.
5. Sanwalka N., et al. Influence of Vitamin D Receptor Gene Fok1 Polymorphism on Bone Mass Accrual Post Calcium and Vitamin D Supplementation. In: Indian J Pediatr, 2015, vol. 82(11), p. 985-990.
6. Chung M., et al. Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: An updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. In: Ann Intern Med, 2011, vol. 155, p. 827-838.
7. Krasowski M.D., et al., Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. In: Mol Cell Endocrinol, 2011, vol. 334(1-2), p. 39-48.
8. Feldman D, Pike J., Adams J. Vitamin D 3rd edition. London. In: Academic Press, 2011, p. 271- 297.
9. Maltsev S.V., Arkhipova N. N., Shakirova E. M. Vitamin D, calcium and phosphate in healthy children and in pathology. Kazan, 2012, p. 120.
10. Rajah J., et al. Clinical practice: diagnostic approach to the rachitic child. In: Eur J Pediatr, 2011, vol. 170(9), p. 1089-1096.
11. Paterson C. R., Vitamin D deficiency: a diagnosis often missed. In: Br J Hosp Med (Lond), 2011, vol. 72(8), p. 456-458.
12. Paterson C. R. Vitamin D deficiency and fractures in childhood. In: Pediatrics, 2011, vol. 127(5), p. 973-974.
13. Moon R. J, et al. Tracking of 25-hydroxyvitamin D status during pregnancy: the importance of vitamin D supplementation. In: Am J Clin Nutr, 2015, vol. 102, p. 1081-1087.
14. Harvey N.C, et al. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. In: Health Technol Assess, 2014, vol. 18, p. 1–190.
15. Spirichev V. B. On the biological effects of vitamin D. In: Pediatriya, 2011, vol. 90(6), p. 113-119.
16. Rizzoli R. et al., Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. In: Bone, 2010, vol. 46(2), p. 294-305.
17. Bilinski K, Boyages S. Evidence of overtesting for vitamin D in Australia: an analysis of 4.5 years of Medicare Benefits Schedule (MBS). In: BMJ Open, 2013, vol. 3(6).
18. Elder C.J.; Bishop N.J. Rickets. In: Lancet, 2014, vol. 383, p. 1665-1676.
19. Sintov A.C., Berkovich L., Ben-Shabat S. Inhibition of cancer growth and induction of apoptosis by BGP-13 and BGP-15, new calcipotriene-derived vitamin D(3) analogs, in-vitro and in-vivo studies. In: Invest New Drugs, 2013, vol. 31(2), p. 247-255.
20. Welsh J. Vitamin D and cancer: integration of cellular biology, molecular mechanisms and animal models. In: Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2012, vol. 243, p. 103-111.
21. Welsh J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. In: Arch Biochem Biophys, 2012, vol. 523(1), p. 107-114.
22. Tuohimaa P., Lou Y. R. Optimal serum calcidiol concentration for cancer prevention. In: Anticancer Res, 2012, vol. 32, p. 373-381.

23. Lunenfield S. Vitamin D and Flavonoids Examined for Impact on Breast and Ovarian Cancers. In: American Association for Cancer Research, 2010.
http://www.naturalnews.com/019780_cancer_Vitamin_D_breast.html (vizitat 10.12.2010).
24. Grant W. Calcium plus Vitamin D supplementation and the risc of Colorectal Cancer. In: N Engl J Med, 2011, vol. 354, p. 684-696.
25. Kremer R., et al. Vitamin D Status and Its Relationship to Body Fat, Final Height, and Peak Bone Mass in Young Women. In: J Clin Endocrinol Metab, 2010, vol. 94, p. 67-73.
26. Bischoff-Ferrari H. A., et al. Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation. In: Osteoporos Int, 2010, vol. 21(7), p. 1121-1132.
27. Garabédian M., ș.a. Métabolisme phosphocalcique et osseux de l'enfant. 2^e ed., Paris: Médecine-Sciences Lavoisier, 2011, p. 1-204.
28. Braegger C., et al. Vitamin D in the healthy paediatric population : a position paper by the ESPGHAN Committee on nutrition. In: J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2013, vol. 56, p. 692-701.
29. INSEE. Estimation de population par région, sexe et grande classe d'âge – Années 1975 à 2012. 2013. http://www.insee.fr/themes/detail.asp?ref_id=estim-pop®_id=99 (vizitat 25.11.2013).
30. Mallet E., et al. Prescription prophylactique de la vitamine D en France : enquête épidémiologique multicentrique nationale chez 3240 enfants de moins de 6 ans. In: Arch Pediatr, 2012, vol. 19, p. 1203-1302.
31. Wagner C. L., et al. Health characteristics and outcomes of two randomized vitamin D supplementation trials during pregnancy: A combined analysis. In: J. SteroidBiochem. Mol. Biol, 2013, vol. 136, p. 313-320.
32. Uriu-Adams J.Y.; Obican S.G.; Keen C. L. Vitamin D and maternal and child health: Overview and implications for dietary requirements. In: Birth Defects Res, 2013, vol. 99, p. 24-44.
33. Vidailhet M., et al. Vitamin D: still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society og Paediatrics. In: Arch Pediatr, 2012, vol. 19, p. 316–28.
34. Javaid M. K., et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. In: Lancet, 2006, vol. 367, p. 36-43.
35. Javaid M., Cooper C. Prenatal and childhood influences on osteoporosis. In: Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012, vol. 16, p. 349-367.
36. Takiishi T., et al. Effects of vitamin D on antigen-specific and non-antigen-specific immune modulation: relevance for type 1 diabetes. In: Pediatr Diabetes, 2013, vol. 14(2), p. 81-89.
37. Thinc O., et al. Vitamin D status and insulin requirements in children and adolescent with type 1 diabetes. In: J Pediatr Endocrinol Metab, 2011, vol. 24, p. 1037-1041.
38. Burris H. H., et al. Vitamin D deficiency in pregnancy and gestational diabetes mellitus. In: Am J Obstet Gynecol, 2012, vol. 207, p. 182.
39. Tuohimaa P., Lou Y.R. Optimal serum calcidiol concentration for cancer prevention. In: Anticancer Res, 2012, vol. 32, p. 373-381.
40. Wu X., et al. Role of Vitamin D Metabolism and Activity on Carcinogenesis. In: Oncol Res, 2015, vol. 22(3), p. 129-137.
41. Davies C.D. Vitamin D and cancer: current dilemmas and future needs. In: Nutrition Rev, 2010, vol. 65, p. 71-74.
42. Chen P., et al. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. In: Breast Cancer Research and Treatment, 2010, vol. 121(2), p. 469-477.
43. Holick M. F. Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. In: Am J Clin Nutr, 2010, vol. 79, p. 362-371.

44. Reilly L., et al. Association between Micronutrients (Vit. A, D, Iron) and Schistosome-Specific Cytokine Responses in Zimbabweans Exposed to *Schistosoma haematobium*. In: *J Parasit Res*, 2012.
45. Gryseels B., et al. Human schistosomiasis. In: *Lancet*, 2010, vol. 368(9541), p. 1106–1118.
46. Olsen A. Effects of multimicronutrient supplementation on helminth reinfection: a randomized, controlled trial in Kenyan school children. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011, vol. 97(1), p. 109-114.
47. Froicu M. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. In: *Mol Endocrinol*, 2009, vol. 17(12), p. 2386-2392.
48. Jehan F., Voloc A. Actions classiques de la vitamine D : apport de la génétique humaine et de modèles de souris génétiquement modifiées. In: *Biologie Aujourd'hui*, 2014, vol. 208(1), p. 45-53.
49. Holick M. Vitamin D: A D-Lightful solution for health. In: *J Med Invest*, 2011, vol. 59, p. 872-80.
50. Schoenmakers I., et al. Prevention and consequences of vitamin D deficiency in pregnant and lactating women and children: A symposium to prioritise vitamin D on the global agenda. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015.
51. Holick M. F. Vitamin D: extraskeletal health. In: *Rheum Dis Clin North Am*, 2012; vol. 38(1), p. 141-160.
52. Holick M.F., Chen T.C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. In: *Am J Clin Nutr*, 2010, vol. 87(4), p. 1080S-6S.
53. Holick M. F., et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2011, vol. 96, p. 1911-1930.
54. Looker A., et al. Vitamin D status: U.S., 2001-2006. In: *NCHS Data Brief*, 2011, vol. 59, p. 1-8.
55. Gani L. U., How C. H. Vitamin D deficiency. In: *Singapore Med J*, 2015, vol. 56, p. 433–437.
56. Akkermans M.D., et al. Iron and Vitamin D Deficiency in Healthy Young Children in Western-Europe Despite Current Nutritional Recommendations. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2015, vol. 62(4), p. 635-642.
57. Lippi G., et al. Birth season and vitamin D concentration in adulthood. In: *Ann Transl Med*, 2015, vol. 3(16), p. 231.
58. Jensen C. B., et al. Secular trends in seasonal variation in birth weight. In: *Early Hum Dev*, 2015, vol. 91, p. 361-365.
59. Urrutia R. P., Thorp J. M: Vitamin D in Pregnancy: Current Concepts. In: *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2012, vol. 24, p.57-64.
60. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. In: *J Pharmacol Pharmacother* 2012, vol. 3, p. 118-126.
61. Marika Salminen, et al. Vitamin D status and physical function in older Finnish people: A one-year follow – up study. In: *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2015, vol. 61, p. 419–424.
62. Norman A.W., Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. In: *Exp Biol Med*, 2010, vol. 235(9), p. 1034-1045.
63. Fernández-Alonso A. M., Dionis-Sánchez E. C., Chedraui P. Vitamin D and Women's Health Research Group: First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D₃ status and pregnancy outcome. In: *Int J Gynaecol Obstet*, 2012, vol. 116, p. 6-9.
64. Moniz C., et al. Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction. In: *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2010, vol. 39, p. 287-301.
65. Sohl E., et al. The impact of medication on vitamin D status in older individuals. In: *Eur J Endocrinol*, 2012, vol. 166, p. 477–85.
66. Holick M.F. The D-lightful vitamin D for health. In: *J Med Biochem*, 2013;32:1-58.

67. Collins-Fulea C., Klima K., Wegienka G. R. Prevalence of low vitamin D levels in an urban midwestern obstetric practice. In: J Midwifery Womens Health, 2012, vol. 57(5), p. 439-444.
68. Beuzit C. L., et al. Prevalence of vitamin D deficiency in children aged 5-10 years in western Brittany. In: Arch Pediatr, 2015, vol. 22(11), p. 1112-1118.
69. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. 2010. <http://www.iom.edu/Reports/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D> (vizitat 13.02. 2012).
70. Hollis B., Wagner C. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. In: Am J Clin Nutr, 2014, vol. 79, p. 717-726.
71. Ross A. C., et al. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington: The National Academies Press, 2011.
72. Nichols E. K., Khatib I. M., Aburto N. J. Vitamin D status and determinants of deficiency among non-pregnant Jordanian women of reproductive age. In: European Journal of Clinical Nutrition, 2012, 66, p. 751-756.
73. Balasubramanian S., Dhanalakshmi K., Amperayani S. Vitamin D Deficiency in Childhood – A Review of Current Guidelines on Diagnosis and Management. In: Ind Pediatr, 2013, vol. 50, p. 669-675.
74. Ross A. C., et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. In: J Clin Endocrinol Metab, 2011, vol. 96(1), p. 53-58.
75. Vieth R. Vitamin D testing limit a mistake. In: CBC News, 2010.
76. Karlsson T., et al. Lower vitamin D status in obese compared with normal-weight women despite higher vitamin D intake in early pregnancy. In: Clin. Nutr, 2015, vol. 34, p. 892-898.
77. Norman Ph. D., et al. Vitamin D. In: International Life Sciences Institute, 2012.
78. Holick M., et al. Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency : an Endocrine Society clinical practice guideline. In: J Clin Endocrinol Metab, 2011, vol. 96(7), p. 1911-1930.
79. Voloc A., et al. Rahitismul - fiziopatologie, tablou clinic și paraclinic, diagnostic diferențial, principii de tratament, in Tratat. Dezvoltarea copilului în maladiile nutriționale, A. Voloc and V. Țurea, Editors. 2007: Chișinău, p. 190-219.
80. Spiro A. , Buttriss J. L. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. In: Nutr Bull, 2014 Dec;39(4):322–350.
81. Mariani P., et al. Bilateral Simultaneous Femoral Neck Fracture Mimicking Abdominal Pain in a Cerebral Palsy Patient. In: Case Reports in Orthopedics, 2014, p. 1-4.
82. Holick M. F., et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. In: J Clin Endocrinol Metab, 2011, vol. 96, p. 1911.
83. Bea J W, et al. Concentrations of the vitamin D metabolite 1,25(OH)2D and odds of metabolic syndrome and its components. In: Metabolism, 2015, vol. 64(3), p. 447-459.
84. Mones M. Abu Shady, et al. Predictors of serum 25-Hydroxyvitamin D concentrations among a sample of egyptian schoolchildren. In: The Scientific World Journal, 2016, p. 1-7.
85. Holick M F, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. In: J. Clin. Endocrinol. Metab, 2011, vol. 96, p. 1911–1930.
86. International Agency for Research on Cancer (IARC). Vitamin D and Cancer. In: IARC Handbooks of Cancer Prevention Meetings, 2016, vol. 16, p. 5–122.
87. Mutlu A., et al. Vitamin D deficiency in children and adolescents with type 1 diabetes. In: J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2011, vol. 3(4), p. 179-183.

88. Feng R., et al. Lower serum 25 (OH) D concentrations in type 1 diabetes: A meta-analysis. In: *Diabetes Res Clin Pract*, 2015, vol. 108(3), p. 71-75.
89. Stene L. C. Does the relative risk for type 1 diabetes conferred by HLA-DQ, INS, and PTPN22 polymorphisms vary with maternal age, birth weight, or cesarean section?. In: *Pediatr Diabetes*, 2011, p. 91-94.
90. Walentowicz-Sadlecka M., et al. The role of vitamin D in the carcinogenesis of breast and ovarian cancer. In: *Ginekol Pol*, 2013, vol. 84(4), p. 305.
91. Bosland M. C., et al. A Perspective on Prostate Carcinogenesis and Chemoprevention. In: *Curr Pharmacol Rep*, 2015, vol. 1(4), p. 258-265.
92. Committee on Obstetric Practice. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee Opinion. Vitamin D: Screening and Supplementation During Pregnancy. 2011 <http://www.acog.org/Resources-And-Publications/Committee-Opinions/Committee-on-Obstetric-Practice/Vitamin-D-Screening-and-Supplementation-During-Pregnancy> (vizitat 22.05.2015).
93. Hollis B.W., et al. Maternal Versus Infant Vitamin D Supplementation During Lactation: A Randomized Controlled Trial. In: *Pediatrics*, 2015, vol. 136(4), p. 625-634.
94. Uusi-Rasi K., Kärkkäinen M. U., Lamberg-Allardt C. J. Calcium intake in health maintenance - a systematic review. In: *Food Nutr Res*, 2013, vol. 16, p. 57.
95. James R.C., et al. Preterm Birth and the Metabolic Syndrome in Adult Life: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *Pediatrics*, 2013, vol. 131, p. 4.
96. Javaid M. K., et al. Growth in childhood predicts hip fracture risk in later life. In: *Finland Osteoporos Int*, 2011, vol. 22, p. 69-73.
97. Harvey N. C., et al. Maternal gestational vitamin D supplementation and offspring bone health (MAVIDOS): a multicentre, double-blind, randomised placebo-controlled trial. In: *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2016, vol. 4(5), p. 393-402.
98. Reissis D., et al.. Development of fetal trabecular micro-architecture in the humerus and femur. In: *J Anat*, 2012, vol. 220(5), p. 496-503.
99. Cockburn F, et al., Maternal vitamin D intake and mineral metabolism in mothers and their newborn infants. In: *Br. Med. J*, 1980, vol. 23, p. 1-10.
100. Hales, C.N., Barker D. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. In: *Br Med Bull*, 2001, vol. 60(1), p. 5-20.
101. Brooke D., et al. Vitamin D supplements in pregnant Asian women: Effects on calcium status and fetal growth. In: *Br Med J*, 1980, vol. 280, p. 751-754.
102. Denisson, E.M., Syddall, H.E., Rodriguez, S. Polymorphism in the growth hormone gene, weight in infancy, and adult bone mass. In: *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, vol. 12, p. 623-629.
103. Specker B. Vitamin D requirements during pregnancy. In: *Am J Clin Nutr*, 2004, vol. 80, p. 1740S-75S.
104. Breukhoven, P.E., et al., Preterm birth does not affect bone mineral density in young adults. In: *Eur J Endocrinol*, 2011, vol. 164(1), p. 133-138.
105. De-Regil L. M., et al. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012.
106. Marya R., et al. Effect of vitamin D supplementation during pregnancy on foetal growth. In: *Indian J Med Res*, 1988, vol. 88, p. 488-492.
107. Zhou H. Rickets in China. In: *Rickets F*, 1991, p. 253.
108. Liberato S. L., Bressan J., Hills A. P. The role of physical activity and diet on bone mineral indices in young men: a cross-sectional study. In: *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2013, vol. 10, p. 43.

109. Uusi-Rasi K., Kärkkäinen M.U., Lamberg-Allardt C. J. Calcium intake in health maintenance - a systematic review. In: Food Nutr Res, 2013, vol. 5, p. 16-57.
110. Ross, A. C., et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. In: J. Clin. Endocrinol. Metab, 2011, vol. 96, p. 53-58.
111. Dytfeld J., Horst-Sikorska W. Pregnancy, lactation and bone mineral density. In: Ginekol Pol, 2010, vol. 81(12), p. 926-928.
112. Halhali A., et al. Placental calcitriol synthesis and IGF-I levels in normal and preeclamptic pregnancies. In: J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, vol. 144, p. 44-49.
113. Hollis B. W., et al. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. In: J Bone Miner Res, 2011, vol. 26(10), p. 2341-2357.
114. Purvis R., et al. Enamel hypoplasia of the teeth associated with neonatal tetany: a manifestation of maternal vitamin D deficiency. In: Lancet, 1973, vol. 2, p. 811-814.
115. Okonofua F, et al. Parathyroid hormone and neonatal calcium homeostasis: evidence for secondary hyperparathyroidism in the Asian neonate. In: Metabolism, 1986, vol. 35, p. 803-6.
116. Okonofua F., et al. Parathyroid hormone and neonatal calcium homeostasis: evidence for secondary hyperparathyroidism in the Asian neonate. In: Metabolism, 1986, vol. 35, p. 803-806.
117. Daaboul J., et al. Hypocalcemic seizures in Breastfed infants with Rickets Secondary to severe Maternal Vitamin D Deficiency. In: Pakistan J of Biological Sciences, 2010, vol.13(9), p. 437-442.
118. Okonofua F., et al. Calcium, vitamin D and parathyroid hormone relationships in pregnant Caucasian and Asian women and their neonates. In: Ann Clin Biochem, 1987, vol. 24, p. 22-28.
119. Mahdiah Mojibian M. D., et al. The effects of vitamin D supplementation on maternal and neonatal outcome: A randomized clinical trial. In: Iran J Reprod Med, 2015, vol. 13, p. 687-696.
120. Thacher T. D., et al. Increasing incidence of nutritional rickets: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, Mayo Clin. Proc, 2013, vol. 88, p. 176-183.
121. Holick M. F., et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. In: J Clin Endocrinol Metab, 2011, vol. 96, p. 1911-1930.
122. Huang X., Jiang Y., Xia W. FGF23 and Phosphate Wasting Disorders. In: Bone Res, 2013, vol. 1(2), p. 120-132.
123. Pettifor J. M., Nutritional rickets. In: F.H. Glorieux, J.M. Pettifor, H. Juppner (Eds.), Pediatric Bone: Biology and Diseases, Academic Press, San Diego, 2012, vol. 2, p. 625-654.
124. Shore R. M., Chesney R. W. Rickets: part II. In: Pediatr. Radiol, 2013, 43, p. 152-172.
125. Salles J.P Bone status in children born small for gestational age. In: Arch Pediatr, 2007, vol. 14(6), p. 549-551.
126. Vickers M. H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. In: Nutrients, 2014, vol. 6(6), p. 2165-2178.
127. Wood C. L., Stenson C., Embleton N. The Developmental Origins of Osteoporosis. In: Curr Genomics, 2015, vol. 16(6), p. 411-418.
128. Patel M. B., et al. Weight in infancy and adult calcium absorption as determinants of bone mineral density in adult men: the Hertfordshire cohort study. In: Calcif Tissue Int, 2012, vol.91(6), p.416-422.
129. Martínez-Mesa J., et al. Life-course evidence of birth weight effects on bone mass: systematic review and meta-analysis. In: Osteoporos Int, 2013, vol. 24(1), p. 7-18.
130. Vaag A. A., et al. The thrifty phenotype hypothesis revisited. In: Diabetologia. 2012, vol. 55(8), p. 2085-2088.
131. Tanvig M. Offspring body size and metabolic profile - effects of lifestyle intervention in obese pregnant women. In: Dan Med J, 2014, vol. 61(7), p. 4893.

132. Smith C. J., Ryckman K. K. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. In: *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2015, vol. 8, p. 295-302.
133. Saint-Pierre A., et al. Bivariate association analysis in selected samples: application to a GWAS of two bone mineral density phenotypes in males with high or low BMD. In: *Eur J Hum Genet*, 2011, vol. 19(6), p. 710-716.
134. Breukhoven P. E., et al. Preterm birth does not affect bone mineral density in young adults. In: *Eur J Endocrinol*, 2011, vol. 164(1), p. 133-138.
135. Schluskel M. M., et al. Birth weight and bone mass in young adults from Brazil. In: *Bone*, 2010, vol. 46(4), p. 957-963.
136. Wood C. L., et al. Bone mineral density and osteoporosis after preterm birth: the role of early life factors and nutrition. In: *Int J Endocrinol*, 2013, vol. 2014, p. 902513.
137. Devlin M. J., Bouxsein M. L. Influence of pre- and peri-natal nutrition on skeletal acquisition and maintenance. In: *Bone*, 2012, vol. 50(2), p. 444-451.
138. Jörg Dötsch. Low birth weight, bone metabolism and fracture risk. In: *Dermatoendocrinol*, 2011, vol. 3(4), p. 240-242.
139. Bouxsein M. L. Influence of pre- and peri-natal nutrition on skeletal acquisition and maintenance. In: *Bone*, 2012, vol. 50(2), p. 444-451.
140. Garabedian M., Ben-Mekhbi H. Le rachitisme carentiel: situation actuelle en France et en Algérie. In: *Pediatrie*, 1989, vol. 44, p. 259-264.
141. Mogoreanu P. Rahitismul. Date moderne ale profilaxiei și tratamentului. Chișinău, 1995; nr. 1, p. 1-79.
142. Voloc A. Clinica, diagnosticul și tratamentul formelor rahitismale tardive la copii. Autoreferatul tezei de doctor în științe medicale. Chișinău, 1998.
143. Munns C. F., Simm P. J. APSU Vitamin D Study Group et al. Incidence of vitamin D deficiency rickets among Australian children: an Australian Paediatric Surveillance Unit study. In: *Med J Aust*, 2012, 196(7), p. 466-468.
144. Торшин И. Ю., и др. Обеспеченность витамином Д детей и подростков 7 – 14 лет и взаимосвязь дефицита витамином Д с нарушениями здоровья детей: анализ крупномасштабной выборки пациентов посредством интеллектуального анализа данных по материалам диссертационных работ. В: *Российский журнал Педиатрия*, 2015, № 2 с. 2–175.
145. Uush T. Prevalence of classic signs and symptoms of rickets and vitamin D deficiency in Mongolian children and women. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 2013, vol. 13, p. 207–210.
146. Goldacre M., Hall N., Yeates D.G., Hospitalisation for children with rickets in England: a historical perspective. In: *Lancet*, 2014, vol. 383, p. 597–598.
147. Lee G. J., et al. Consumption of non-cow's milk beverages and serum vitamin D levels in early childhood. In: *CMAJ*, 2014, vol. 186(17), p. 1287-1293.
148. Maguire J. L., et al. The relationship between cow's milk and stores of vitamin D and iron in early childhood. In: *Pediatrics*, 2013, vol. 131(1), p. 144-151.
149. Barreto O. L., et al. Vitamin D--deficient rickets in a child with cow's milk allergy. In: *Nutr Clin Pract*, 2010, vol. 25(4), p. 394-398.
150. El-Hajj F., et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels: variability, knowledge gaps, and the concept of a desirable range. In: *J. Bone Miner. Res.*, 2015, vol. 30, p. 1119–1133.
151. Рывакин А. И. К патогенезу рахита у детей. В: *Педиатрия*, 2015; № 5, с. 44-49.
152. Pettifor J. M. Calcium and vitamin D metabolism in children in developing countries. In: *Ann. Nutr. Metab.*, 2014, vol. 64 suppl.2, p. 15–22.
153. Хвостова С.А. Возрастные особенности минеральной плотности костей нижних конечностей. В: *Фундаментальные исследования*. 2011. № 10. с. 170-176.

154. Laverny G., et al. Efficacy of a potent and safe vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease. In: *Immunol Lett.*, 2010, vol. 131(1), p. 49-58.
155. Alison H., et al. Evolutionary Physiology of Bone: Bone Metabolism in Changing Environments. In: *Physiology*, 2015, vol. 30, p. 17-29.
156. Рзянкина М.Ф., и.д. Актуальные проблемы подростковой медицины. В: *Дальневосточный медицинский журнал*, 2010. №3 с. 35-38.
157. Волкова Л.Ю. Алиментарные факторы формирования костной ткани у детей и подростков. Пути профилактики возможных нарушений. В: *ВСП*, 2015, №1 с. 124-131.
158. Uush T. Prevalence of classic signs and symptoms of rickets and vitamin D deficiency in Mongolian children and women. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, vol. 136, p. 207-210.
159. Stagi S., et al. The ever-expanding conundrum of primary osteoporosis: aetiopathogenesis, diagnosis, and treatment. In: *Ital J Pediatr*, 2014, vol. 40, p. 55.
160. Shaw N. J. Prevention and treatment of nutritional rickets. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015.
161. Beck-Nielsen S. S. Rickets in Denmark. In: *Dan Med J*. 2012, vol. 59(2), p. B4384.
162. Karonova T., et al. Prevalence of Vitamin D deficiency in the North-West region of Russia: a cross-sectional study. In: *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2016.
163. Kramer H., et al. Association between 25-hydroxivitamin D and intact parathyroid hormone levels across latitude among adults with african ancestry. In: *Endocr Pract.* 2016, p. 98 -217.
164. Holick M. F., Binkley N. C. Endocrine Society et al..Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. In: *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, vol. 96(7), p. 1911-1930.
165. Esterle L., et al. Adverse interaction of low-calcium diet and low 25(OH)D levels on lumbar spine mineralization in late-pubertal girls. In: *J Bone Miner Res.*, 2010, vol. 25(11), p. 2392-2398.
166. Duhamel J.F., et al. Prevention of vitamin D deficiency in adolescents and pre - adolescents. An interventional multicenter study on the biological effect of repeated doses of 100.000 IU of vitamin D3. In: *Arch Pediatr.* 2000; vol. 7(2), p. 117-120.
167. Winzenberg T., et al. Effects of vitamin D supplementation on bone density in healthy children: systematic review and meta-analysis. In: *BMJ*, 2011, vol. 342, p. 7254-7259.
168. Reinau D., et al. Skin Cancer Prevention, Tanning and Vitamin D: A Content Analysis of Print Media in Germany and Switzerland. In: *Dermatology.* 2015.
169. Mudassar A., et al. Hypovitaminosis D and its association with lifestyle factors. In: *Pak J Med Sci.*, 2015, vol. 31(5), p. 1236–1240.
170. Erol M., et al. Vitamin D Deficiency in Children and Adolescents in Bağcılar, İstanbul. In: *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2015, vol. 7(2), p. 134-139.
171. Zittermann A., et al. Vitamin D and airway infections: a European perspective. In: *Eur J Med Res*, 2016, vol. 21(1), p. 14.
172. Schtscherbyna A., et al. Vitamin D status in a Brazilian cohort of adolescents and young adults with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. In: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2016, vol. 111(2), p. 128-133.
173. Conesa-Botella A., et al. Corticosteroid therapy, vitamin D status, and inflammatory cytokine profile in the HIV-tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. In: *Clin Infect Dis*, 2012, vol. 5(7), p. 1004-1011
174. Enko D., et al. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. In: *Biochem Med (Zagreb)*, 2015, vol. 25(2), p. 203-212.

175. Ross A. C., et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. In: *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96(1), p. 53–8.
176. Schroth R.J., et al. Prenatal vitamin D and dental caries in infants. In: *Pediatrics*, 2014, vol. 133(5), p. 1277-1284.
177. Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stemcells and ceramics for bone tissue engineering. In: *Expert Opin Biol Ther*, 2014, vol. 14(2), p. 197-208.
178. Raqib R., et al. Prenatal vitamin D₃ supplementation suppresses LL-37 peptide expression in ex vivo activated neonatal macrophages but not their killing capacity. In: *Br J Nutr*, 2014, vol. 112(6), p. 908-915.
179. Wei R., Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(10), p. 8251-8360.
180. Kokic V., et al. Relationship between vitamin D, IFN- γ , and E2 levels in systemic lupus erythematosus. In: *Lupus*. 2015.
<http://lup.sagepub.com/content/early/2015/09/24/0961203315605367.abstract> (vizitat 10.11.2015).
181. Mudassar A., et al. Hypovitaminosis D and its association with lifestyle factors. In: *Pak J Med Sci*, 2015, vol. 31(5), p. 1236–1240.
182. Sarkar S., et al. Role of vitamin D in cytotoxic T lymphocyte immunity to pathogens and cancer. In: *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, vol. 19, p. 1-14.
183. Mak G., Hanania N. A. Vitamin D and asthma. In: *Curr Opin Pulm Med*, 2011, vol. 17(1), p. 1-5.
184. Руснак Ф.И. Роль витамина Д в иммунопатологии почек и артериальной гипертензии. *Нефрология и диализ*. В: Журнал "Нефрология и диализ", Москва Т. 4, 2002; № 2.
185. Lucas R. M., et al. Vitamin D and immunity. In: *F1000Prime Rep*, 2014, vol. 6, p. 118.
186. Омельченко Л. И. Комплексная коррекция иммунологических нарушений у часто болеющих детей с включением витамина D. В: *Педиатрия, акушерство и гинекология*, 1992; № 2, с. 28-29.
187. Таточенко В. К. Бронхиты у детей (пособие для врачей), 2004; М: с. 5-18.
188. Rogers C. S., et al. Vitamin D₃ potentiates the antitumorigenic effects of arsenic trioxide in human leukemia (HL-60) cells. In: *Exp Hematol Oncol*, 2014, vol. 3(1), p. 9.
189. Talat N., et al. Vitamin D deficiency and tuberculosis progression. In: *Emerg Infect Dis*, 2010, vol. 16, p. 853–855.
190. Gao Y, et al. The relationship between serum 25-hydroxy vitamin D and insulin sensitivity and β -cell function in newly diagnosed type 2 diabetes. In: *J Diabetes Res*, 2015, vol. 2015, p. 636-891.
191. Bolla N. R., et al. Synthesis and evaluation of geometric analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₂ as potential therapeutics. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015.
192. Mangin M., Sinha R., Fincher K. Inflammation and vitamin D:the infection connection. In: *Inflamm Res*, 2014, vol. 63(10), p. 803-819.
193. Wang W. L. Effects of 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and testosterone on miRNA and mRNA expression in LNCaP cells. In: *Mol Cancer*, 2011, vol. 10, p. 58.
194. Mordan-McCombs S. Tumor progression in the LPB-Tag transgenic model of prostate cancer is altered by vitamin D receptor and serum testosterone status. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, vol. 121(1-2), p. 368-371.
195. Rhieu S. Y., et al. Potent antiproliferative effects of 25-hydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃ that resists the catalytic activity of both CYP27B1 and CYP24A1. In: *J Cell Biochem*, 2014, vol. 115(8), p. 1392-1402.

196. Cantorna M. T., et al. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(4), p. 3011-3021.
197. Cantorna M. T., Waddell A. The vitamin D receptor turns off chronically activated T cells. In: *Ann N Y Acad Sci*, 2014, vol. 1317, p. 70-75.
198. Good M., Barragan M., Kolls J. K. Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(9), p. 8127-8151.
199. Barker T. Circulating interferon-gamma correlates with 1,25(OH)₂D and the 1,25(OH)₂D-to-25(OH)D ratio. In: *Cytokine*, 2012.
200. Fabri M. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. In: *Sci Transl Med*, 2011, vol. 3(104), p. 104-112.
201. Thiering E., Brüske I., Kratzsch J. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D and bone turnover markers in a population based sample of German children. In: *Sci Rep*, 2015, vol. 5, p. 18138.
202. Mogoreanu P. Formarea copilului frecvent bolnav. Rahitism. Date moderne ale profilaxiei și tratamentului. Instrucție metodică. Chișinău, 1995, p. 27-28.
203. Mandal D., et al. Vitamin D receptor expression levels determine the severity and complexity of disease progression among leprosy reaction patients. In: *New Microbes New Infect*, 2015, vol. 6, p. 35-39.
204. Liu Q., et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms on the risk of tuberculosis, a meta-analysis of 29 case-control studies. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83843.
205. Agarwal A., et al. Vitamin D status in pediatric osteoarticular tuberculosis. In: *J Clin Orthop Trauma*, 2015, vol. 6(4), p. 227-229.
206. Larcombe L. Effect of Vitamin D Supplementation on Mycobacterium tuberculosis-Induced Innate Immune Responses in a Canadian Dene First Nations Cohort. In: *PLoS One*, 2012; vol. 7(7), p. e40692.
207. Tebruegge M., et al. Nontuberculous Mycobacterial Disease in Children - Epidemiology, Diagnosis & Management at a Tertiary Center. In: *PLoS One*, 2016, vol. 11(1) p. e0147513.
208. Papandreou D., Hamid Z. T. The Role of Vitamin D in Diabetes and Cardiovascular Disease: An Updated Review of the Literature. In: *Dis Markers*, 2015, vol. 2015, p. 580474.
209. Rønningen K. S. Environmental trigger(s) of type 1 diabetes: why so difficult to identify? In: *Biomed Res Int*, 2015, vol. 2015, p. 321656.
210. Eringsmark Regnéll S., Lernmark A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. In: *Diabet Med*, 2013, vol. 30(2), p. 155-160.
211. Antico A. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? In: *J Gen Intern Med*, 2014, vol. 29(Suppl 1), p. 1-545.
212. Liu C., et al. Correlation of serum vitamin D level with type 1 diabetes mellitus in children: a meta-analysis. In: *Nutr Hosp*, 2015, vol. 32(04), p. 1591-1594.
213. Soedamah-Muthu S. S., et al. Dairy consumption and incidence of hypertension: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. In: *Hypertension*, 2012, vol. 60, p. 1131-1137.
214. Samimi M., et al. The effects of vitamin D plus calcium supplementation on metabolic profiles, biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in pregnant women at risk for pre-eclampsia. In: *J Hum Nutr Diet*, 2015.
215. Halhali A., et al. Placental calcitriol synthesis and IGF-I levels in normal and preeclamptic pregnancies. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, vol. 144 Pt A, p. 44-49.
216. Halhali A., et al. Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(8), p. 6465-6490.

217. Christians J. K., Gruslin A. Altered levels of insulin-like growth factor binding protein proteases in preeclampsia and intrauterine growth restriction. In: *Prenat Diagn*, 2010, vol. 30(9), p. 815-820.
218. Van Hemelrijck M., et al. The association between circulating IGF1, IGFBP3, and calcium: results from NHANES III. In: *Endocr Connect*, 2015, vol. 4(3), p. 187-195.
219. Dubois-Ferrière V., et al. Calcitropic hormones and IGF-I are influenced by dietary protein. In: *Endocrinology*, 2011, vol. 152(5), p. 1839-1847.
220. Klement R. J., Fink M. K. Dietary and pharmacological modification of the insulin/IGF-1 system: exploiting the full repertoire against cancer. In: *Oncogenesis*, 2016, vol. 5, p. 193.
221. Quarles L. D. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. In: *Exp Cell Res*, 2012, vol. 318(9), p. 1040-1048.
222. Condamine L., et al. Local action of phosphate depletion and insulin-like growth factor 1 on in vitro production of 1,25-dihydroxyvitamin D by cultured mammalian kidney cells. In: *J Clin Invest*, 1994, vol. 94(4), p. 1673-1679.
223. Свешников А. А. Минеральная плотность костей скелета, масса мышц и проблемы профилактики переломов. В: Академия Естествознания: М., 2013; с. 366.
224. Пажигова З. Б., и. д. Распространенность рассеянного склероза в мире (обзорная статья). В: *Международный журнал экспериментального образования*. 2014. №1-2 с. 78-82.
225. Гависова А. А., Твердикова М. А., Якушевская О. В. Остеопороз: современный взгляд на проблему. В: *ПМЖ*. 2012. №21 с. 1110-1116.
226. Slavov G. S., et al. Vitamin D immunomodulatory potential in multiple sclerosis. In: *Folia Med (Plovdiv)*, 2013, vol. 55(2), p. 5-9.
227. Marie-France N. et al. The transcriptomic response of mixed neuron-glial cell cultures to 1,25-dihydroxyvitamin d3 includes genes limiting the progression of neurodegenerative diseases. In: *J Alzheimers Dis*, 2013, vol. 35(3), p. 553–564.
228. Dudani S. J., et al. Vitamin D and multiple sclerosis: Potential pathophysiological role and clinical implications. In: *Int J Appl Basic Med Res*, 2011, vol. 1(2), p. 71–74.
229. Галятина Т.А., Устьянцева И. М., Хохлова О. И. Особенности регуляции костного ремоделирования при врожденной патологии опорно-двигательного аппарата у детей. В: *Клиническая лабораторная диагностика*, 2014, № 4 с.17-21.
230. Pisani P., et al. Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. In: *World J Orthop*, 2016, vol. 7(3), p. 171-181.
231. Heuser A., et al. Biological fractionation of stable Ca isotopes in Göttingen minipigs as a physiological model for Ca homeostasis in humans. In: *Isotopes Environ Health Stud*, 2016, vol. 21, p. 1-16.
232. Pitukcheewanont P., et al. Bone health in children and adolescents: risk factors for low bone density. In: *Pediatr Endocrinol Rev*, 2013, vol. 10(3), p. 318-335.
233. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. In: *J Nippon Med Sch*, 2010, vol. 77(1), p. 4-12.
234. Van de Peer Y., Pires J. C. Editorial overview: Genome studies and molecular genetics: Of plant genes, genomes, and genomics. In: *Curr Opin Plant Biol*, 2016, p.367-71.
235. Zhao B., et al. Zhou Z. Vitamin D receptor BsmI polymorphism and osteoporosis risk in post-menopausal women. In: *Arch Med Sci*, 2016, vol. 12(1), p. 25-30.
236. Mohammadi Z., et al. Prevalence of osteoporosis and vitamin D receptor gene polymorphisms (FokI) in an Iranian general population based study (Kurdistan) (IMOS). In: *Med J Islam Repub Iran*, 2015, vol. 29, p. 238.

237. Casado-Díaz A., et al. Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene are determining factors of bone mineral density in young healthy postmenopausal women. In: *Arai J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, vol. 136, p. 187-189.
238. Laczmanski L., et al. Association between vitamin D concentration and levels of sex hormones in an elderly Polish population with different genotypes of VDR polymorphisms (rs10735810, rs1544410, rs7975232, rs731236). In: *Gene*, 2015, vol. 559(1), p. 73-76.
239. Mehr N., Tasee A., Syed A..Vitamin D Receptor Cdx-2 Polymorphism and Premenopausal Breast Cancer Risk in Southern Pakistani Patients. In: *PloS ONE*, 2015, vol. 10(3), p. e1000104
240. Hsu Y-H, et al. An Integration of Genome-Wide Association Study and Gene Expression Profiling to Prioritize the Discovery of Novel Susceptibility Loci for Osteoporosis-Related Traits. Visscher PM. In: *PLoS Genetics*. 2010, vol. 6(6), p. e1000977.
241. Dawson-Hughes B., Harris S., Finneran S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptors genotype. In: *J Elin Endocrinol Metab*, 1995, vol. 80, p. 3657-3661.
242. Deng Y, et al. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. In: *Nutrients*. 2015, vol. 7(9), p. 8020-8035.
243. Kuchay R. A., et al. Effect of C/T -13910 cis-acting regulatory variant on expression and activity of lactase in Indian children and its implication for early genetic screening of adult-type hypolactasia. In: *Clin Chim Acta*, 2011, vol. 412(21-22), p. 1924-1930.
244. Enko D., et al. Lactose malabsorption testing in daily clinical practice: a critical retrospective analysis and comparison of the hydrogen/methane breath test and genetic test (c/t-13910 polymorphism) results. In: *Gastroenterol Res Pract*, 2014, vol. 2014, p. 464382.
245. Misselwitz B., et al. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: *United European Gastroenterol J*, 2013, vol. 1(3), p. 151-159.
246. Deng Y., et al. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(9), p. 8020-8035.
247. Ranciaro A., et al. Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. In: *Am J Hum Genet*, 2014, vol. 94(4), p. 496-510.
248. Lukito W., et al. From lactose intolerance to lactose nutrition. In: *Asia Pac J Clin Nutr*, 2015, Suppl 1 p. S1-8.
249. Esterle L., et al. Analyse SNP en - 13910, resultats confidentiels non publiés. Travail sur Lactose intolerance, 2010, Inserm U561.
250. Pettifor J. M. Vitamin D &/or calcium deficiency rickets in infants & children: a global perspective. In: *Indian J Med Res*, 2008, vol. 127(3), p. 245-249.
251. Khandare A. L., Harikumar R., Sivakumar B. Severe bone deformities in young children from vitamin D deficiency and fluorosis in Bihar-India. In: *Calcif Tissue Int*, 2005, vol. 76(6), p. 412-418.
252. Martineau A, Jolliffe D. “Vitamin D and Human Health: from the Gamete to the Grave”: Report on a meeting held at Queen Mary University of London, 23rd–25th April 2014. In: *Nutrients*, 2014, vol. 6(7), p. 2759-2919.
253. Ritu G., Gupta A. Vitamin D deficiency in India: prevalence, causalities and interventions. In: *Nutrients*, 2014, vol. 6(2), p. 729-775.
254. Gupta A. Fortification of foods with vitamin D in India. In: *Nutrients*, 2014, vol. 6(9), p. 3601-3623.
255. Dawodu A, Wagner CL. Prevention of vitamin D deficiency in mothers and infants worldwide — a paradigm shift. In: *Paediatrics and international child health*, 2012, vol. 32(1), p. 3-13.

256. Roth D. E., et al. Vitamin D status of infants in northeastern rural Bangladesh: preliminary observations and a review of potential determinants. In: *J Health Popul Nutr*, 2010, vol. 28(5), p. 458-469.
257. Choi R., et al. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Pregnant Korean Women: The First Trimester and the Winter Season as Risk Factors for Vitamin D Deficiency. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(5), p. 3427–3448.
258. Mojtaba H., Mohammad T. The angular profile of the knee in Iranian children: A clinical evaluation. In: *J Res Med Sci*, 2011, vol. 16(11), p. 1430–1435.
259. Mathew S. E., Madhuri V. Clinical tibiofemoral angle in south Indian children. In: *Bone Joint Res.*, 2013, vol. 2(8), p. 155–161.
260. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for Health: A Global Perspective. In: *Mayo Clinic proceedings*, 2013, vol. 88(7), p. 720-755.
261. Nabeta HW, et al. Serum vitamin D status in children with protein-energy malnutrition admitted to a national referral hospital in Uganda. In: *BMC Research Notes*, 2015, vol. 8, p. 418.
262. Freedman DM, et al. Sunlight and Other Determinants of Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels in Black and White Participants in a Nationwide US Study. In: *American Journal of Epidemiology*, 2013, vol. 177(2), p. 180-192.
263. Braegger C. , et al. Vitamin D in the healthy European paediatric population. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013, vol. 56(6), p. 692-701.
264. Jehan F., et al. Growth, calcium status and vitamin D receptor (VDR) promoter genotype in European children with normal or low calcium intake. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, vol. 121(1-2), p. 117-120.
265. Saini UC, et al. Normal development of the knee angle in healthy Indian children: a clinical study of 215 children. In: *Journal of Children's Orthopaedics*, 2010, vol. 4(6), p. 579-586.
266. Bafor A, Omota B, Ogbemudia AO. Correlation between clinical tibiofemoral angle and body mass index in normal Nigerian children. In: *International Orthopaedics*, 2012, vol. 36(6), p. 1247-1253.
267. Oyewole OO, Akinpelu AO, Odole AC. Development of the tibiofemoral angle in a cohort of Nigerian children during the first 3 years of life. In: *Journal of Children's Orthopaedics*, 2013, vol. 7(2), p. 167-173.
268. Moon RJ, et al. Vitamin D and skeletal health in infancy and childhood. In: *Osteoporosis international*, 2014, vol. 25(12), p. 2673-2684.
269. Lee JY, So T-Y, Thackray J. A Review on Vitamin D Deficiency Treatment in Pediatric Patients. In: *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics : JPPT*. 2013, vol. 18(4), p. 277-291.
270. Ceroni D, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in Swiss teenagers with appendicular fractures: a prospective study of 100 cases. In: *Journal of Children's Orthopaedics*, 2012, vol. 6(6), p. 497-503.
271. Rabenberg M., et al. Vitamin D status among adults in Germany – results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). In: *BMC Public Health*, 2015, vol. 15, p. 641.
272. Peckham S, Awofeso N. Water Fluoridation: A Critical Review of the Physiological Effects of Ingested Fluoride as a Public Health Intervention. In: *The Scientific World Journal*. 2014, vol. 2014, p. 293019.
273. Schmid A, Walther B. Natural Vitamin D Content in Animal Products. In: *Advances in Nutrition*, 2013, vol. 4(4), p. 453-462.

274. Albu A., et al. Assessment of nutritional habits on a group of pupils from a countryside elementary school in Romania. În: Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași, 2013, vol. 117(3), p. 764-770.
275. Lehtonen E, et al. Use of vitamin D supplements during infancy in an international feeding trial. In: Public health nutrition, 2014, vol. 17(4), p. 810-822.
276. Egan JB, et al. Vitamin D Receptor Ligands, Adenomatous Polyposis Coli, and the Vitamin D Receptor FokI Polymorphism Collectively Modulate β -Catenin Activity in Colon Cancer Cells. In: Molecular carcinogenesis, 2010, vol. 49(4), p. 337-352.
277. Voloc A., et al. High prevalence of genu varum/valgum in European children with low vitamin D status and insufficient dairy products/calcium intakes. In: Eur J Endocrinol, 2010, nr 163(5), p. 811-817.
278. Carter G. D., et al. Proficiency testing of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) assays. In: J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, vol. 121(1-2), p. 176-9.
279. Zengin A., Prentice A., Ward K. A. .Ethnic differences in bone health. In: Front Endocrinol (Lausanne), 2015, vol. 6, p. 24.
280. Dorgan JF, et al. Adolescent Diet and Subsequent Serum Hormones, Breast Density and Bone Mineral Density in Young Women: Results of the Dietary Intervention Study in Children (DISC) Follow-Up Study. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. In: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2010, vol. 19(6), p. 1545-1556.
281. Manya H., Akasaka-Manya K., Endo T. Antiaging research using klotho mice. In: Yakugaku Zasshi, 2010, vol. 130(1), p. 3-9.
282. Dubal DB, et al. Life Extension Factor Klotho Prevents Mortality and Enhances Cognition in hAPP Transgenic Mice. In: The Journal of Neuroscience. 2015, vol. 35(6), p. 2358-2371.
283. Manya H., Akasaka-Manya K., Endo T. Klotho protein deficiency and aging. In: Geriatr Gerontol Int, 2010, 10 Suppl 1, p. S80-7.
284. Massó A., et al. Secreted and Transmembrane α Klotho Isoforms Have Different Spatio-Temporal Profiles in the Brain during Aging and Alzheimer's Disease Progression. In: Li PLoS One, 2015, vol. 10(11), p. e0143623.
285. Silver J., Naveh-Many T. FGF23 and the parathyroid. In: Adv Exp Med Biol, 2012, vol. 728, p. 92-99.
286. Xu Y., Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. In: Endocr Rev, 2015, vol. 36(2), p. 174-193.
287. Liu Y. J., et al. Klotho: a novel and early biomarker of acute kidney injury after cardiac valve replacement surgery in adults. In: Int J Clin Exp Med, 2015, vol. 8(5), p. 7351-7358.
288. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. In: Annual review of physiology, 2013, vol. 75, p. 503-533.
289. Cheng C-Y, Kuro-o M, Razzaque MS. Molecular Regulation of Phosphate Metabolism by Fibroblast Growth Factor-23–Klotho System. In: Advances in chronic kidney disease, 2011, vol. 18(2), p. 91-97.
290. Swamy GK, et al. Maternal Vitamin D Receptor Genetic Variation Contributes to Infant Birthweight among Black Mothers. In: American journal of medical genetics Part A, 2011, vol. 155(6), p. 1264-1271.
291. Song J.H., et al. Developmental immunolocalization of the Klotho protein in mouse kidney epithelial cells. In: Eur J Histochem, 2014, vol. 58(1), p. 2256.

292. Leunissen E. H., et al. The epithelial calcium channel TRPV5 is regulated differentially by klotho and sialidase. In: *J Biol Chem*, 2013, vol. 288(41), p. 29238-29246.
293. Crasto C. L., et al. Relationship of low-circulating "anti-aging" klotho hormone with disability in activities of daily living among older community-dwelling adults. In: *Rejuvenation Res*, 2012, vol. 15(3), p. 295-301.
294. Gutiérrez OM. Fibroblast growth factor 23, Klotho and disordered mineral metabolism in chronic kidney disease: unraveling the intricate tapestry of events and implications for therapy. In: *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2013, vol. 23(3), p. 250-254.
295. John GB, Cheng C-Y, Kuro-o M. Role of Klotho in Aging, Phosphate Metabolism, and CKD. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 2011, vol. 58(1), p. 127-134.
296. Haussler MR, et al. The Role of Vitamin D in the FGF23, Klotho, and Phosphate Bone-Kidney Endocrine Axis. In: *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 2012, vol. 13(1), p. 57-69.
297. Miranda J., et al. The anti-aging factor α -klotho during human pregnancy and its expression in pregnancies complicated by small-for-gestational-age neonates and/or preeclampsia. In: *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2014, vol. 27(5), p. 449-457.
298. Donate-Correa J., et al. Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. In: *World J Biol Chem*, 2015, vol. 6(4), p. 351-357.
299. Zhai C., et al. Polymorphism of klotho G-395A and susceptibility of coronary artery disease in East-Asia population: a meta-analysis. In: *Int J Clin Exp Med*, 2015, vol. 8(2), p. 1582-1588.
300. Esterle L., et al. Milk, preferably to other calcium sources, provides calcium, phosphates, magnesium and protein intakes associated with bone mineral density and circulating IGF-1 in female adolescents. In: *Osteoporosis International*, 2009, vol. 20(4), p. 567-575.
301. Nguyen M., et al. Infantile hypercalcemia and hypercalciuria: new insights into a vitamin D-dependent mechanism and response to ketoconazole treatment. In: *J Pediatr*, 2010, vol. 157(2), p. 296-302.
302. Razzaque MS. The role of Klotho in energy metabolism. In: *Nature reviews Endocrinology*, 2012, vol. 8(10), p. 579-587.
303. Duncan EL, et al. Genome-Wide Association Study Using Extreme Truncate Selection Identifies Novel Genes Affecting Bone Mineral Density and Fracture Risk. In: *PLoS Genetics*, 2011, vol. 7(4), p. e1001372.
304. Harvey N. C., et al. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. In: *Health Technol Assess*, 2014, vol. 18(45), p. 1-190.
305. Seitz S., et al. Impaired bone mineralization accompanied by low vitamin D and secondary hyperparathyroidism in patients with femoral neck fracture. In: *Osteoporos Int*, 2013, vol. 24(2), p. 641-649.
306. Kremer R., Gilsanz V. Fat and Bone: An Odd Couple. In: *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, vol. 6, p. 190.
307. Krier J., et al. Reclassification of genetic-based risk predictions as GWAS data accumulate. In: *Genome Med*, 2016, vol. 8(1), p. 20.
308. Grigalavicius M., et al. Daily, seasonal, and latitudinal variations in solar ultraviolet A and B radiation in relation to vitamin D production and risk for skin cancer. In: *Int J Dermatol*, 2016, vol. 55(1), p. e23-28.

309. Kawasumi M., et al. Protection from UV-induced skin carcinogenesis by genetic ataxia telangiectasia and Rad3 –related (ATR)kinase. In: Proc Nat Acad Sci USA, 2011, vol. 108(33), p. 13716-13721.
310. Harmon R. M., et al. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. In: J Clin Invest, 2013, vol. 123(4), p. 1556-1570.
311. Varma S. D., Kovtun S., Hegde K. R. Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists. In: Eye Contact Lens, 2011, vol. 37(4), p. 233-245.
312. Nogales-Gadea G., et al. McArdle Disease: Update of Reported Mutations and Polymorphisms in the PYGM Gene. In: Hum Mutat, 2015, vol. 36(7), p. 669-678.
313. Troelsen J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. In: Biochim Biophys Acta, 2005, vol. 1723(1-3), p. 19-32.
314. Bersaglieri T., et al. Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene. In: Am J Hum Genet, 2004, vol. 74(6), p. 1111-1120.
315. Itan Y, et al. The origins of lactase persistence in Europe. In: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000491>, 2009, (vizitat 20.09.2013).
316. Bersaglieri T, et al. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. In: Am J Hum Genet, 2004, vol. 74(6), p. 1111-1120.
317. Rabot S., et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. In: J Nutr, 2010, vol. 140(3), p. 677S-89S.
318. Smith G., et al. Lactase persistencerelated genetic variant: population substructure and health outcomes. In: Eur J Hum Genet, 2009, vol. 17(3), p. 357-367.
319. Tishkoff S., et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. In: Nat Genet, 2007, vol. 39(1), p. 31-40.
320. Kretchmer N. Expression of lactase during development. In: Am J Hum Genet, 1989, vol. 45(4), p. 487–488.
321. Murray R., et al. Absorption of lactose from colon of newborn piglet. In: Am J Physiol, 1991, vol. 261(1), p. G1-8.
322. Menéndez-Buxadera A., et al. Multi-trait and random regression approaches for addressing the wide range of weaning ages in Asturiana de los Valles beef cattle for genetic parameter estimation. In: J Anim Sci, 2008, vol. 86(2), p. 278-286.
323. Bickell S., et al. Genotype rather than non-genetic behavioural transmission determines the temperament of Merino lambs. In: Animal welfare, 2009, vol. 18(4), p. 459-466.
324. Yoshida Y., et al. Studies on the etiology of milk intolerance in Japanese adults. In: Gastroenterol Jpn, 1975, vol. 10(1), p. 29-34.
325. Matthews S., et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. In: Postgrad Med J, 2005, vol. 81, p. 167-173.
326. Swaminathan N. Not Milk? Neolithic Europeans Couldn't Stomach the Stuff. In: Scientific American, 2007.
327. Germain P., et al. Overview of nomenclature of nuclear receptor. In: Pharmacol Rev, 2006, vol. 58(4), p. 685-704.
328. Timo Sahi. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia with emphasis on the situation in Europe. In: Scandinavian Journal of Nutrition/Naringsforskning, 2001, vol. 45, p. 161-162.
329. Malmstrom H., et al. High frequency of lactose intolerance in a prehistoric hunter-gatherer population in northern Europe. In: BMC Evolutionary Biology, 2010, vol. 10, p. 89.

330. Coelho M., et al. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. In: *Hum Genet*, 2005, vol. 117(4), p. 329-39.
331. Bersaglieri T., et al. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. In: *Am J Hum Genet*, 2004, vol. 74(6), p. 1111-1120.
332. Wade N. Study Detects Recent Instance of Human Evolution. In: *The New York Times*, 2006.
333. Aoki K. Theoretical and Empirical Aspects of Gene–Culture Coevolution. In: *Theor Popul Biol*, 2001, vol. 59(4), p. 253-261.
334. Itan Y, et al. The Origins of Lactase Persistence in Europe. In: *PLoS Comput Biol*, 2009, vol. 5(8), p. e1000491.
335. Myles S., et al. Genetic evidence in support of a shared Eurasian-North African dairying origin. In: *Hum Genet*, 2005, vol. 117(1), p. 34-42.
336. Enattah N. S., et al. Independent Introduction of Two Lactase-Persistence Alleles into Human Populations Reflects Different History of Adaptation to Milk Culture. In: *Am J Hum Genet*, 2008, vol. 82(1), p. 57-72.
337. Itan Y., et al. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. In: *BMC Evolutionary Biology*, 2010, vol. 10, p. 89.
338. Itan Y., et al. The Origins of Lactase Persistence in Europe. In: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000491>, 2009, (vizitat 20.09.2013).
339. Yanyong D., et al. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. In: *Nutrients*, 2015, vol. 7(9), p. 8020–8035.
340. Tishkoff S. A., et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. In: *Nat Genet*, 2007, vol. 39(1), p. 31-40.
341. Duarte J, et al. NUREBASE: database of nuclear hormone receptor. In: *Nucleic Acids Res*, 2002, vol. 30(1), p. 364–368.
342. Honkanen R., et al. Lactose intolerance predispose to low bone density ? A population-based study of perimenopausal Finnish women. In: *Bone*, 1996, vol. 19(1), p. 23-28.
343. Heyman MB; Committee on Nutrition. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. In: *Pediatrics*, 2006, vol. 118(3).
344. Gremse D., et. al. Abdominal pain associated with lactose ingestion in children with lactose intolerance. In: *Clin Pediatr (Phila)*, 2003, vol. 42(4), p. 341-5.
345. Honkamen R., et al. Lactose intolerance associated with fractures of weight-bearing bones in Finnish women aged 38-57 years. In: *Bone*, 1997, vol. 21(6), p. 473-477.
346. Sevalieri D. Lactase persistence and lactose intolerance. In: *Annual Review of Genetics*, 2007, vol. 37, p. 197-219.
347. Valeriu P., Mihaela R. Convulsiile neonatale. În: *Algoritm diagnostic si therapeutic în pediatrie*. Editura medicală Almatea. București, 1999, p. 53-75.
348. Craig W. Convulsive movements occurring in the first 10 dazs of life. In: *Arch Dis Child*, 1960, vol. 35, p. 336-339.
349. Seay A., Bray P. Significance of seizures in infants weighting less than 2.500 grams. In: *Arch Neurol*, 1977, vol. 34, p. 381-382.
350. Painter M., et al. Phenobarbital and diphenyl-hydantoin levels in neonates with seizures. In: *J Pediatr*, 1978, vol. 92, p. 315-319
351. Volpe J. Neurology of the newborn. In: *Saundres Co*, Philadelphia, 1987, p. 129 – 157.
352. Vanucci R. Acute perinatal brain injury: hypoxia-ischemia. In: *MD Aspen Publishers*, Rockville, 1989, p. 183-244.

353. Nelson K., Broman S. Perinatal risk factors in children with serious motor and mental handicap. In: *Ann Neurol*, 1977, vol. 2, p. 371.
354. Nelson K., Ellenberg J. Neonatal signs as predictors of cerebral palsy. In: *Pediatrics*, 1979, vol. 64, p. 225.
355. Perlman J., Volpe J. Seizure in the preterm infant: effects on cerebral blood flow velocity, intracranial pressure and arterial blood pressure. In: *J pediatr*, 1983, vol. 102, p. 288.
356. Laskey M., et al. Bone changes after 3 mo of lactation: influence of calcium intake, breast-milk output, and vitamin D-receptor genotype. In: *Am J Clin Nutr* 1998, vol. 67, p. 685-692.
357. Purvis R., et al. Enamel hypoplasia of the teeth associated with neonatal tetany: a manifestation of maternal vitamin D deficiency. In: *Lancet*, 1973, vol. 2, p. 811-814.
358. Daaboul J., et al. Vitamin D deficiency in pregnant and breast-feeding women and their infants. In: *J Perinatol* 1997, vol. 17, p. 10-14.
359. Javaid M., et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. In: *Lancet*, 2006, vol. 367, p. 36-43.
360. Congdon P., et al. Mineral content of the forearms of babies born to Asian and white mothers. In: *BMJ*, 1983, vol. 286, p. 1234-1235.
361. Marya R., et al. Effects of vitamin D supplementation in pregnancy. In: *Gynecol Obstet Invest*, 1981, vol. 12, p. 155-161.
362. Okonofua F., et al. Parathyroid hormone and neonatal calcium homeostasis: evidence for secondary hyperparathyroidism in the Asian neonate. In: *Metabolism* 1986, vol. 35, p. 803-806.
363. Okonofua F., et al. Calcium, vitamin D and parathyroid hormone relationships in pregnant Caucasian and Asian women and their neonates. In: *Ann Clin Biochem*, 1987, vol. 24, p. 22-28.
364. Paunier L., Lacourt G., et al. 25-Hydroxyvitamin D and calcium levels in maternal, cord and infant serum relation to maternal vitamin D intake. In: *Helv Pediatr Acta*, 1978, vol. 33, p. 95-103.
365. Cockburn F., et al. Maternal vitamin D intake and mineral metabolism in mothers and their newborn infants. In: *Br Med J*, 1980, vol. 231, p. 1-10.
366. Brooke D., et al. Vitamin D supplements in pregnant Asian women: Effects on calcium status and fetal growth. In: *Br Med J*, 1980, vol. 280, p. 751-754.
367. Cockburn F., et al. Maternal vitamin D intake and mineral metabolism in mothers and their newborn infants. In: *Br Med J*, 1980, vol. 231, p. 1-10.
368. Коровина Н.А., Чебуркин А.В., Захарова И.Н. Лечение рахита препаратами витамина In: *Д. Педиатрия*, 2000, vol. 5, p. 79-83.
369. Specker B. Nutrition Influences Bone Development from Infancy through Toddler Years. In: *J Nutr*, 2004, vol. 134, p. 691S-695S.
370. Gaudelus J. Rachitisme carentiel du nourrisso. Nouvelle edition entierement refondue et mise a jour. Ellipses. In: *AUPELF/UREF*, 1997, p. 318.
371. Froicu M., et al. A crucial role for the D in experimental inflammatory bowel diseases. In: *Mol Endocrinol*, 2003, vol. 17, p. 238-239.
372. Colloque internationale sur l'osteoporose (organisé par le Centre de recherche et d'information nutritionnelle – CERIN), Paris, 1992.
373. WHO. First Food and Nutrition Action Plan for Europe 2000-2005. Regional Office for Europe
374. Cleveland L., Goldman J., Boffud L. Data tables: results from USDA's 1994. Continuing Survey of Food Intakes by Individuals and 1994 Diet and health knowledge survey. Belts ville (MD): Agricultural Research service, US Department of Agriculture; 1996;
375. Donovan U., Gibson R. Dietary intakes of adolescent females consuming vegetarian, semivegetarian and omnivorous diets. In: *Jurnal of Adolescent Health*, 1996, vol. 18(4), p 292-300.

376. Guthrie H., Picciano M. Human nutrition. In: J. M. Smith, 1995. St-Louis: Mosby: 659 p.
377. Abrams S., Stuff J. Calcium metabolism in girls: current dietary intakes lead to low rates of calcium absorbtion and retention during puberty. In: Am.J.Clin. Nutr. 1994, vol. 60, p. 739-743.
378. Ames S., Gorham B., Abrams S. Effects of high vs. low calcium absorbtion and red blood cell iron incorporation by small children. In: Am.J.Clin. Nutr., 1992, vol. 70, p. 44-48.
379. Wasserman R., Fulmer C. Calcium transport protein, calcium absorbtion and vitamin D. In: Ann. Rev. Physiol., 1983, vol. 45, p. 375-390.
380. Allen L.H. Calcium bioavailability and absorbtion. In: A review American Jurnal of Clinical Nutrition, 1983, vol. 35, p. 83.
381. Brune M., et al. Iron absorbtion from bread. Inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. In: J. Nutr., 1992, vol. 122, p. 442-449.
382. Guéguen L. La biodisponibilité du calcium des aliments. In: Cah. Nutr. Diét., 1990, vol. 25, p. 233-236.
383. Harland B. and Oberleas D. Phytate in foods. In: Weld. Rez. Nutr. Diet. 1987, vol. 52, p. 235-259.
384. Heaney R., Waver C., Fitzsimmons M. Soybean phytate content: effect on calcium absorbtion. In: Am. J. Clin. Nutr., 1991, vol. 53, p. 745-747.
385. Van der Sluis I., de Muinck Keizer-Schrama SMPF: Osteoporosis in Childhood: Bone Density of Children in Health and Disease. In: J Pediatr Endocrinol Metab, 2001, vol. 14(7):p. 817-832.
386. HEANEY RP: Calcium, dairy products and osteoporosis. In: J Am Coll Nutr, 2000, vol. 19, p. 83S-99S.
387. Щеплягина Л.А.: Снижение костной минеральной плотности у детей и возможности ее коррекции. In: Доктор ПУ, 2005, vol. 2, p. 32.
388. Brownell K., Cohen L. Aderence to dietary regimes. In: Behavioral medicina, 1995. vol.20, nr.4 p. 149-154.
389. Sanders T., Vegetarian diets and children. In: Pediatric Clinics of North America, 1995, vol. 42(4), p.955-965.
390. Bartnik M. et al. Changes in phytate content and phytase activity during the germination of some cereals. In: J. Cereal Sci, 1987, vol. 5 p. 23-28.
391. Halberg L., Rossander L., Skanberg A. Phytates and the inhibitory effects of bran on iron absorbtion in man. In: A. J. Clin. Nutr., 1987, vol. 45, p. 988-996.
392. Balam G., Gurri F. A physiological adapion to under nutrition us outcomes for childern: etnic. In: Anales de Human Biology, 1994, vol. 21(5) p. 483-489.
393. Abrams S. Using table to asse's mineral requirements in children. In: Am. J. Clin. Nutr., 1999, vol. 70, p. 955-964.
394. Bauer S., Yakob E., Berg A. Energy and nutritional intake in young weight lifters before out after nutritional conseling. In: Schweizerschrift fur Mediziu und Traumatology, 1994, nr. 3, p. 35-42.
395. Министерство Здравоохранения Р.Ф. РАМН и др. Методическая рекомендация по обогащению продуктов питания микронутриентами. Москва. 1999.
396. Bonjour J., et al. Calcium enriched foods and bone macs growth in prepubertal girls: a rondomized, double- blind, placebo controlled trial. In: J Clin Invest, 1997, vol. 99, p. 1287-1294.
397. Michaelsen K., et al. The importance of nutrition for the prevention of osteoporozis. In: Ugeskrift for Laeger, 1994, vol. 156(7), p.958-960.
398. Sturza R. Principii moderne de analiză a alimentelor. In: UTM, 2006, 310p.
399. Cadogan J., et al. Milk intake and bone mineral acquisition in adolescent girls: rondomised, controlled intervention trial. In: BMJ, 1997, vol. 315, p. 1255-1260.

400. Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis: The Minnesota Nutrition Data System (MDS2.4). 1993.
401. Motruc N. Ameliorarea valorii nutritive a produselor de panificație prin fortifierea cu cationi de calciu. Teza de doctor în științe tehnice. Chișinău 2007. 154p.
402. Gutțu A. Alimentația copiilor. Chișinău. Tipografia Centrală, 2001, 166p.
403. Cleveland L., Goldman J., Boffud L. Data tables: results from USDA's 1994. Continuing Survey of Food Intakes by Individuals and 1994 Diet and health knowledge survey. Beltsville (MD): Agricultural Research service, US Department of Agriculture; 1996;
404. Guthrie H.A., Picciano M.F. Human nutrition, ed. J.M. Smith, 1995. St-Louis: Mosby: 659p.
405. Țurea V., et al. Anemiile feriprivate la copii. În tratatul A. Voloc/V. Țurea. Dezvoltarea copilului și conduita în maladiile nutriționale. Chișinău. 2007. p. 149-186.
406. Громова О. Дефицит магния в организме ребёнка с позиции практикующего врача. In: Российский педиатрический журнал, 2002, vol. 5, p. 48-52.
407. Mishra O., Fritz K., Delivoria-Papadopoulos. In: M. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2001, vol. 7(4), p. 249-253.
408. Voloc A., et al. Magneziul, aspecte fiziopatogenetice. În: tratatul A. Voloc/V. Țurea. Dezvoltarea copilului și conduita în maladiile nutriționale. Chișinău. 2007, p 187-189.
409. Studiu asupra consumului alimentar și aporturilor nutriționale ale familiilor din Republica Moldova. Raport final, UNICEF, Biroul pentru Republica Moldova, 1999. 55p.
410. Alimentația copiilor sub 5 ani în Republica Moldova. Raportul studiului realizat în octombrie-noiembrie 1988, UNICEF, Biroul pentru Republica Moldova, 1999.
411. UNDP Moldova XXI. Strategia națională pentru dezvoltarea durabilă. Chișinău. 2000.
412. Recommendations pour une politique de nutrition en sante publique en faveur des enfants et des meres en Republique de Moldavie. Rapport de mission du 18 juin 1999, UNICEF, Bureau pour la Republique de Moldova.
413. Elaborarea sistemului național de supraveghere națională. Raport privind consultația tehnică, UNICEF, Biroul pentru Republica Moldova, 2000.
414. Alimentația și nutriția umană în Republica Moldova. Constatări și recomandări, UNICEF, Biroul pentru Republica Moldova, 2000. Studiu asupra consumului alimentar și aporturilor nutriționale ale familiilor din Republica Moldova. Raport final, UNICEF, Biroul pentru Republica Moldova, 1999. 55p.
415. Alimentația copiilor sub 5 ani în Republica Moldova. Raportul studiului realizat în octombrie-noiembrie 1988, UNICEF, Biroul pentru Republica Moldova, 1999.
416. Heaney R.P., Waver C.M. Oxalate in vegetables, effect on calcium absorbability. J. Bone Mineral Res. 8 (suppl.), 1993. p.333-337.
417. Rizzoli R., et al. Skeletal site selectivity in the effects of calcium supplementation on areal bone mineral density gain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in prepubertal boys. In: J Clin Endocrinol Metab. 2005, vol. 90, p. 3342-9.
418. Garabedian M. Produits laitiers et ostéoporose: agir dès l'enfance. INSERM, 2006. 10 p.
419. Apports nutritionnels conseillés pour la population française, 3^e editions. A. Martin coordonnateur. Tec and Doc Lavoisier. 2000.
420. Programme National Nutrition Santé 2001-2005. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité.
421. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary References Intakes. Dietary references intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington DC. National Academy Press, 1997.

422. Weinsier R., Krumdieck C. Dairy foods and bone health: examination of the evidence. In: *Am J Clin Nutr.*, 2000, vol. 72, p. 681-689.
423. Lanou A., Berkow S., Barnard N. Calcium, dairy products, and bone health in children and young adults: a reevaluation of the evidence. In: *Pediatrics*, 2005, vol. 115, p. 736-743.
424. Jackson R., et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. In: *New Engl J med.*, 2006, vol. 354, p. 669-683.
425. Aoe S., et al. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. In: *Osteoporosis Int.*, 2005, vol. 16, p. 2123-8.
426. Matkovic V., et al. Calcium supplementation and bone mineral density in females from childhood to young adulthood: a randomized controlled trial. In: *Am J Clin Nutr.*, 2005, vol. 81, p. 175-188.
427. Weinsier RL, Krumdieck CL. Dairy foods and bone health: examination of the evidence. In: *Am J Clin Nutr.*, 2000, vol. 72, p. 681-689.
428. Jackson R., et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. In: *New Engl J med.*, 2006, vol. 354, p. 669-683.
429. Wiley A. Does milk make children grow? Relationships between milk consumption and height in NHANES 1999-2002. In: *Am J Hum Biol.*, 2005, vol. 17, p. 425-441.
430. Ferrari S., et al. Childhood fractures are associated with decreased bone mass gain during puberty: an early marker of persistent bone fragility?. In: *J Bone Miner Res.*, 2006, vol. 21, p. 501-507.
431. Wosje K., Specker B. Role of calcium in bone health during childhood. In: *Nutr Rev.*, 2000, vol. 58(9), p. 253-268.
432. Громова О. Дефицит магния в организме ребёнка с позиции практикующего врача. In: *Российский педиатрический журнал*, 2002, Vol. 5, p. 48-52.
433. Mishra O., Fritz K. Delivoria-Papadopoulos. In: *M. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 2001, vol. 7(4), p. 249-253.
434. Recommendations pour une politique de nutrition en sante publique en faveur des enfants et des meres en Republique de Moldavie. Rapport de mission du 18 juin 1999, UNICEF, Bureau pour la Republique de Moldova.

ANEXE

Anexa 1. Prevenirea rahitismului carențial în Republica Moldova 1998 – 1999

Date la naștere:

Mamă – Copil nr. _____

Numele: _____

Adresa: _____

Mediu urban _____ mediu rural _____

Sexul M F

Data nașterii	
Medicamentele primite de gravidă în timpul actualei sarcini	
Vârsta mamei	
Gemeni	
Căsătorită	
Divorțată	
Concubinaj	
Rangul în familie (indică diferența dintre copilul precedent și actualul copil, și numărul copiilor la momentul dat, din celula familială supusă cercetării)	
Termenul nou-născutului (săptămâni)	
Greutatea la naștere (kg)	
Talia la naștere (cm)	
Perimetrul cranian (cm)	
Dimensiunile fontanelei mari (anterioare) – lungimea x lățimea (cm x cm)	
Dificultăți (complicații) la naștere atât din partea gravidei, cât și din partea nou-născutului	

Anexa 2. Observații asupra copilului de la a 7-a zi de viață până la vârsta de 12 luni

Mamă – Copil Nr. _____

Numele: _____ Adresa: _____

Vârsta (luni)	7 zile	1 lună	2 luni	3 luni	4 luni	5 luni	6 luni	7 luni	8 luni	9 luni	10 luni	11 luni	12 luni
Greutatea (kg)													
Talia (cm)													
Fontanela anterioară (cmxcm) (lungimea x lățimea)													
Erupția dentară													
Alimentarea la sân*													
Semne de intoxicație*													
Agitație													
Vome													
Poliurie –polidipsie													
Deshidratare													
Stagnare în creștere													
Semne de carență*													
Tremurături													
Convulsii afebrile													
Convulsii febrile													
Laringospasm													
Dereglări cardiace													
Hipotonie													
Craniotabes													
Craniostenoză													
Bose frontale													
Mătăanii condro-costale													
Deformații toracice													
Bureleți meta-epifizari													
Genu-varum													
Genu-valgum													
Osalgii													
Fracturi pe os patologic													
Alte simptome*													
Anemie													
Hepato-splenomegalie													
Diaree													
Gastroenterită													
Helminthiază*													

Bronșiolită													
Bronșită													
Alte**													
Tratamentul primit vitamina D**													
Calciu**													
Fenobarbital**													
Alte**													
Biologie calcemie (mmol/l)													
25(OH)D (ng/ml)													

* notați cu x dacă semnul este prezent.

** notați cu x și descrieți în detalii patologia și tratamentul (tip, doza, frecvența, durata) pe verso al acestui chestionar.

Anexa 3. Prezentarea schematică a derulării primei etape a studiului

	Termenul de gestație a sarcini			Primul an de viață				
	6	7	Nașterea	7 zi	3 lună	6 lună	9 lună	12 lună
Maternitatea 1 (100 femei)								
Supraveghere clinică			X	x	x	X	X	X
Prelevare de sânge pentru dozarea:								
Calcemiei		X	x					X
25(OH)D		X	x					X
Prescripția vitaminei D (100,000 UI)								
Sublotul 1 (50 femei)	X			x	x	x	X	x
Sublotul 2 (50 femei)	X							-----
Maternitatea 2 (100 femei)								
Supraveghere clinică			x	x	x	x	X	x
Prelevare de sânge pentru :								
Calcemiei			X					x
25(OH)D			X					
Prescripția vitaminei D (100.000 UI)								
Sublotul 1 (50 femei)				x	x	x	X	x
Sublotul 2 (50 femei)								
	-----profilaxie habituală -----							

Anexa 4. Studiu asupra stărilor de carență a vitaminei D la copii și adolescenți

Data de examinare a copilului _____

Numărul chestionarului _____

Numele _____

Prenumele _____

Sexul

F	M
☐	☐

Data nașterii _____ Luna _____ Anul _____

Adresa: _____

Talia _____ cm

Greutatea _____ kg _____ grame

Greutatea la naștere _____ kg talia la naștere _____ cm termenul la naștere _____ săptămâni

Nr d/o	Parametrii evaluați	Rezultatul (+ sau -) Cu remarca ce se impune
1	ACUZELE ÎN MOMENTUL EXAMINĂRII	
1.1.	Convulsii	
1.2.	Osalgii	
1.3.	Dureri în oasele bazinului	
1.4.	Dureri la coloana vertebrală	
1.5.	Crampe musculare	
1.6.	Nevrozitate	
1.7.	Fatigabilitate	
1.8.	Transpirație abundentă	
1.9.	Somn superficial	
1.10.	Nu se poate concentra	
1.11.	Inapetență	
1.12.	Dureri abdominale	
1.13.	Grețuri	
1.14.	Carie dentară	
2.	Semne de viroză respiratorie la moment	
3.	Semne de diaree la moment	
4.	Boli de piele	
4.1.	Dermatită alergică	

4.2.	Dermatită atopică	
4.3.	Psoriazis	
4.4.	Vitiligo	
4.5.	Fotodermatoză	
4.6.	Neurodermită	
4.7.	Sindromul Raynauld	
4.8.	Scabie	
5.0	Alte (a specifica)	
6.	Boli cronice ale aparatului digestiv	
6.1.	Boală ulceroasă a stomacului	
6.2.	Boală ulceroasă a duodenului	
6.3.	Bulbită erozivă	
6.4.	Gastrită erozivă	
6.5.	Gastroduodenită cronică	
6.6.	Holepatie	
6.7.	Hepatită cronică	
6.8	Pancreatită cronică	
6.9.	Sindrom de malabsorbție, a specifica mai jos, dacă prezintă, în special :	
	6.9.1 Celiachie	
	6.9.2 Intoleranță disaharidazică	
	6.9.2 Intoleranță lactazică	
7.0.	Alergie alimentară (a specifica la ce produs/e)	
8.	Boli cronice renale (a specifica):	
9.	Tratament anticonvulsivant (a indica preparatul, doza pentru 24 ore și durata în zile): 1. Fenobarbital _____ 2. Finlepsin _____ 3. Carbamazepin _____ 4. Difenin _____ 5. Altele(a specifica) _____	
10.	Tratament cu corticosteroizi (a specifica doza de 24 ore, durata în zile și denumirea preparatului) 1. _____ 2. _____	
11.	Vitaminoterapie(a specifica cele care conțin vitamina D, durata, doza, denumirea): 1. _____ 2. _____ 3. _____	
12.	Nivelul hemoglobinei (Hb) : 1. _____ g/l	

Anexa 5. Studiu clinic asupra depistării intoleranței la lactoză la copii și adolescenți

Data de examinare a copilului _____

Numărul chestionarului _____

Numele _____

Prenumele _____

Sexul

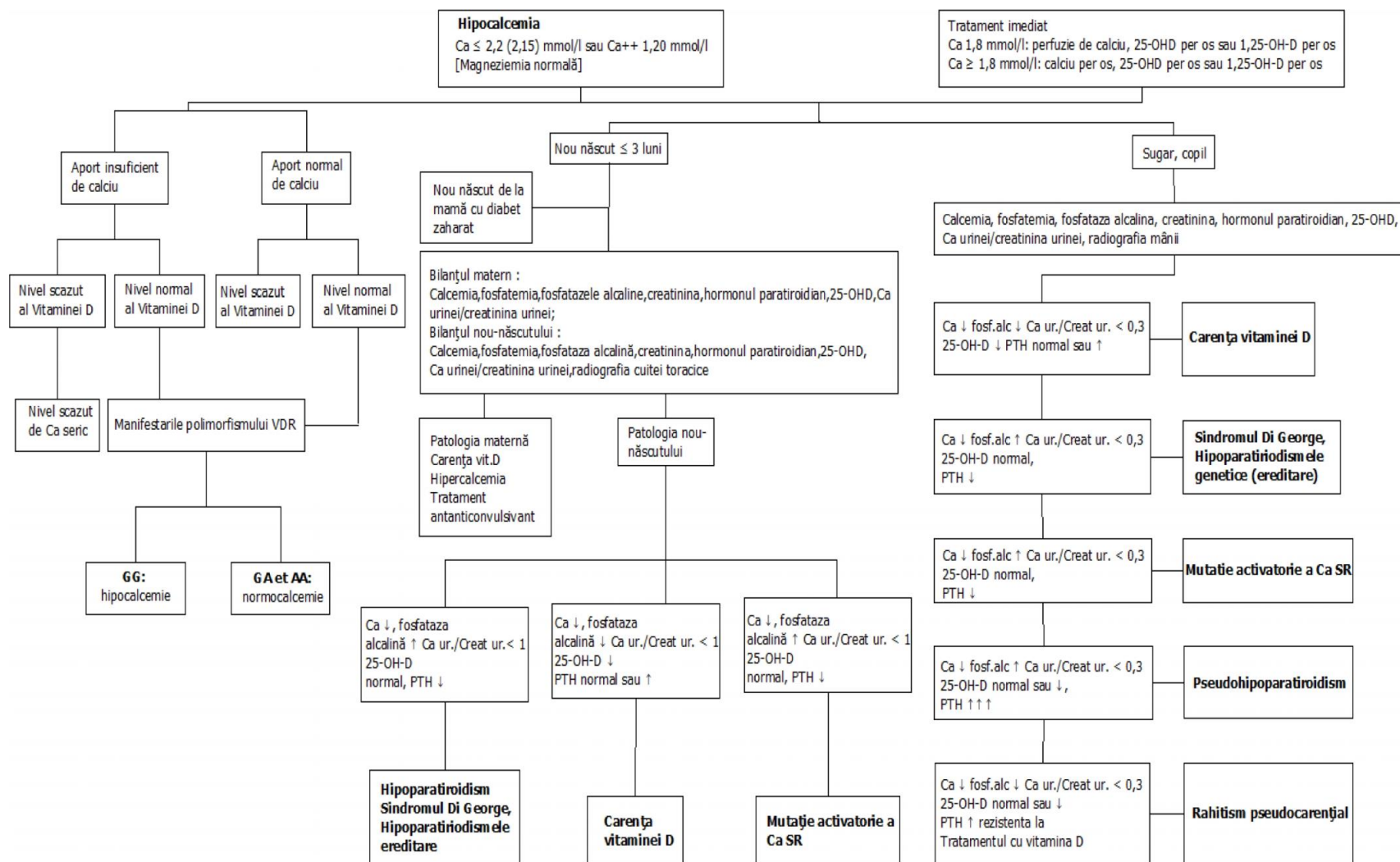
F	M

Virsta _____

Adresa: _____

Nr d/o	Parametrii evoluți	Rezultatul (+ sau -) Cu remarca ce se impune
1	Dureri abdominale/crampe abdominale	
1.1	Odata in luna	
1.2.	Recidivante	
1.3.	Zilnic	
1.4.	Odata in saptamina	
1.5.	Odata in luna	
1.6.	Matinale /nocturne (<i>m</i> sau <i>n</i> prescurtat)	
1.7.	Postprandiale	
1.8.	Dupa consumul de lapte neprocesat	
1.9.	Dupa consumul de produse lactate, inclusiv biscuiti cu lapte, ciocolata cu lapte, smintina, cascaval	
2.	Diaree	
2.1.	1 episod in an	
2.2.	2-3 episoade/an	
2.3.	4-5 episoade/an	
2.4.	Imediat dupa consumul de lapte	
2.5.	Imediat dupa consumul de produse lactate	
3.	Vome	
3.1.	Dupa consumul de lapte	
3.2.	Dupa consumul de produse lactate	
3.3.	Nelegate de consumul de lapte	
4.	Flotulenta	
4.1.	Dupa consumul de lapte	
4.2.	Dupa consumul de produse lactate	
5.	Anamneza personala	
5.1.	Alergoze respiratorii	
5.2.	Urticarii recidivante	
5.3.	Careva interventii chirurgicale la intestin	
6.	Anamneza familiala	
6.1.	Intoleranta laptelui/produselor lactate la mama	
6.2.	Intoleranta laptelui/produselor lactate la tata	
6.3.	Intoleranta laptelui/produselor lactate la frati/surori	
6.4.	Intoleranta laptelui/produselor lactate la bunici	
6.5.	Intoleranta laptelui/produselor lactate la alte rude (de specificat)	

Anexa 6. Algoritmul de diagnostic al hipocalcemiei



Anexa 7. Acte de implementare

APROB

Director IMSP IM și C

Sergiu Gladun



ACT DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea propunerii de implementare:** "Aspecte clinico-biologice și genetice în patogenia carenței Vitaminei D în perioadele pre și postnatală de dezvoltare a copilului "
2. **De cine a fost propusă:** Conferențiar universitar Voloc Alexandru
3. **Unde a fost implementată:** Departamentul Pediatrie IMSP IM și C
4. **Anul implementării:** 2016
5. **Rezultatele metodei:** temele ce vizează cercetările tezei referitor la aspectele clinico-biologice și genetice în patogenia carenței Vitaminei D în dezvoltarea copilului
6. Implementarea este recomandată de a fi aplicată în procesul curativ al secțiilor pediatrie a IMSP IM și C

Șef Departament Pediatrie

Doctor habilitat în medicină



Ina Paliu

MINISTERE DE LA SANTE
ET DE LA POPULATION

SECRETARIAT GENERAL

DIRECTION REGIONAL DE LA SANTE SUD-EST

DIRECTION GENERAL DU CENTRE HOSPITALIER REGIONAL

AMISSA BONGO DE FRANCEVILLE

DIRECTION ADMINISTRATIVE ET FINANCIERE

DIRECTION MEDICALE

REPUBLIQUE GABONAISE
Union - Travail - Justice



Directeur Général CHU CHRAB

MITCHORERET O. André

ACTE D'IMPLEMENTATION

1. **Sujet proposé :** « CAT DEVANT UNE HIPOCALCÉMIE NÉONATALE »
2. **Proposé par :** Dr. Alexandru Chiril VOLOC, maître de conférence, médecins : Aimé VEMBA, anesthésiste- réanimateur, KANGUNZA Délphen, médecin généraliste, NADU Achille, médecin généraliste, AVOUNE Evelyne, médecin généraliste
3. **Le service ou on a proposé l'implémentation du sujet :** service de néonatalogie du Centre Hopsitalier Régional Amissa BONGO de Franceville, Gabon
4. **L'âge d'implémentation du sujet :** 2014, 2015 et 2016
5. **La source d'information :** Aicardi J – The medical management of neonatal and infantile seizures and febrile seizures. In : Porter R, Morselli PL (eds) :The epilepsies, p.206-226, Buittenworthis, London 1985. Brown JK, Minns RA- Epilepsy in neonates. In : Tyrer JH (ed). The treatment of epilepsy, p. 161-202, MTP Press, Lancaster, England, 1980. Plouin P – Benign neonatal convulsions, In : Wasterlain CG, Vert P (eds) : Neonatal seizures, p.51-59. Raven Press, New York, 1990.
6. **Les resultats obtenues :** Les médecins ont appris à mieux gérer les syndromes convulsifs néonataux.
7. **L'efficacité de l'implémentation :** le protocole élaboré et distribué au sein du dit service, presente une CAT claire et facile à réaliser.

Directeur des affaires médicales (DAM)



OFFOBO Sylvien

MINISTERE DE LA SANTE ET LA PREVOYANCE SOCIALE

SECRETARIAT GENERAL

DIRECTION REGIONALE DE LA SANTE
CENTRE-EST (OGOOUE-LOLO)

Centre Hospitalier Régional
Paul MOUKAMBI de Koula-Moutou

DIRECTION GENERALE

DIRECTION MEDICALE



N° 079/MSPS/SG/DRS-CE-OL/CHRPMM/DG/DM/CE

“APPROUVE”



Directeur Général DU CHR PAUL MOUKAMBI
Nestor David ANGOUE-NKOGHE

ACTE D'IMPLEMENTATION

1. **Sujet proposé :** « Conduite à tenir (CAT) devant une hypocalcémie néonatale » et « CAT devant une spasmophilie ».
2. **Proposé par :** Dr. Alexandru Chiril VOLOC, maître de conférence.
3. **Le service ou on a proposé l'implémentation du sujet :** service de pédiatrie et de néonatalogie du Centre Hospitalier Régional Paul Moukambi de Koula-Moutou.
4. **L'âge d'implémentation du sujet :** 2016
5. **La source d'information :**
Aicardi J - The medical management of neonatal and infantile seizures and febrile seizures. In : Porter R, Morselli PL (eds) : The epilepsies, p.206-226, Buitenworthis, London 1985. Brown JK, Minns RA- Epilepsy in neonates. In : Tyrer JH (ed). The treatment of epilepsy, p. 161-202, MTP Press, Lancaster, England, 1980. Plouin P - Benign neonatal convulsions, In : Wasterlain CG, Vert P (eds) : Neonatal seizures, p.51-59. Raven Press, New York, 1990. A. Voloc. Aspecte clinico-biologice si genetice in patogenia carentei de vitamina D in perioadele pre- si postnatale de dezvoltare a copilului. Monografie. Iasi, Romania, 2016. A.Voloc. Protocole de prise en charge de la spasmophilie. CHU de Libreville 2016. 27 p.
Neonatal seizures. In : Dam M, Gram L (eds) : Comprehensive epileptology, Raven Press, New York, 1991. Popescu V, Radut-Stefanescu. Convulsiiile Neonatale. In : Valeriu Popescu. Algoritm diagnostic si terapeutic in pediatrie. ISBN 973-98167-4-6. Bucuresti. Editura Medicala AMALTEA, 1999.
6. **Les résultats obtenus :** Les praticiens et le personnel soignant on appris à mieux gérer les syndromes convulsifs néonataux et la spasmophilie.
7. **L'efficacité de l'implémentation :** le protocole élaboré et distribué au sein du dit service, présente une CAT claire et facile à réaliser.

Fait à Koula - Moutou, le 04 Novembre 2016

Directeur
des Affaires Médicales

Dr. EDOU ALLO'O Apollinaire



B.P.03 Koula-Moutou Tél. : 65 50 15 - Fax : 65 56 31

ACTE D'IMPLEMENTATION

1. **Sujet proposé :** « L'algorithme de la prise en charge d'une hypocalcémie chez le grand enfant et l'adolescent ».
2. **Proposé par :** Dr. Alexandru Chiril VOLOC, maître de conférence.
3. **Lieu et Service concerné :** Centre hospitalier universitaire d'Angondjé, service de pédiatrie et de consultation externe
4. **Période d'implémentation du sujet :** 2016
5. **Les Références :** Ross A. C., Manson J. E., Abrams S. A., et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. In: J Clin Endocrinol Metab, 2011, vol. 96(1), p. 53-58. Voloc A. Aspecte clinico-biologice și genetice în patogenia carenței de vitamina D în perioadele pre- și postnatală de dezvoltare a copilului. Iași, România: editura Alfa, 2015. 243p. ISBN: 978-606-540-141-9. Uusi-Rasi K., Kärkkäinen M.U., Lamberg-Allardt C. J. Calcium intake in health maintenance - a systematic review. In: Food Nutr Res, 2013, vol. 5, p. 16-57. Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A. et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. In: J. Clin. Endocrinol. Metab, 2011, vol. 96, p. 53-58. Okonofua F., Menon R., Houlder S., et al. Calcium, vitamin D and parathyroid hormone relationships in pregnant Caucasian and Asian women and their neonates. In: Ann Clin Biochem, 1987, vol. 24, p. 22-28. Patel M. B., Makepeace A. E., Jameson K. A., et al. Weight in infancy and adult calcium absorption as determinants of bone mineral density in adult men: the Hertfordshire cohort study. In: Calcic Tissue Int, 2012, vol. 91(6), p. 416-422. Devlin M. J., Bouxsein M. L. Influence of pre- and peri-natal nutrition on skeletal acquisition and maintenance. In: Bone, 2012, vol. 50(2), p. 444-451.
6. **Les résultats obtenus :** Les praticiens et le personnel soignant ont appris à mieux gérer les grands enfants avec l'hypocalcémie.
7. **L'efficacité de l'implémentation :** le protocole élaboré et distribué au sein des services, présente une conduite claire et facile à réaliser.

Directrice de la Formation/Superviseur de projets







"APPROUVE"

MBOUMBA TCHIBAUT ANAELLE

Coordinatrice Régionale

ACTE D'IMPLEMENTATION

1. **Sujet proposé :** « La prise en charge d'un enfant avec l'intolérance au lactose ».
2. **Proposé par :** Dr. Alexandru Chiril VOLOC, maître de conférence.
3. **Lieu et Service concerné :** Centre Hospitalier Universitaire de Libreville, service de pédiatrie
4. **Période d'implémentation du sujet :** 2015
5. **Les References:** Mathews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell A.K. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J*, 2005; 81: 167-73. Stallow L. M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Rev Genet*, 2003; 37: 197-219. Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. Absence of the lactase persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104: 3736-41. Alexandru Voloc et al. Genetic study of lactose intolerance in children and adolescents in the Republic of Moldova: A cohort study. In: *Revista de științe ale sănătății*. 2015. Vol.5. p. 62-70. Bailey RK, Fileti CP, Keith J, Tropez-Sims S, Price W, Allison-Otley SD. Lactose intolerance and health disparities among African Americans and Hispanic Americans: an updated consensus statement. *J Natl Med Assoc*, 2013; 105: 112-27. Zaitlin, Paige MS, RD; Dwyer, Johanna DSc, RD; Gleason, Gary R. PhD. Mistaken beliefs and the facts about milk and dairy foods. *Nutrition Today*, 2013; 48: 135-43. Heyman MB. Lactose intolerance in infants, children and adolescents. *Pediatrics*, 2006; 118: 1279-86.
6. **Les resultats obtenus :** Les praticiens et le personnel soignant ont appris à mieux gérer les enfants avec cette pathologie.
7. **L'efficacité de l'implémentation :** le protocole élaboré et distribué au sein des services, presente une conduite claire et facile à réaliser.

Directrice de la Formation/Superviseur de projets

VAMED GABON S.A.S

DIVISION SERVICES

Centre Ville Immeuble Panoramique 4eme Etage

B.P 3991/Tel: +241 01 77 37 69

VERBIC VERENA

Email: sasgabon.services@vamed.com

"APPROUVÉE"

MBOUMBA TCHIBAUT ANAELLE

Coordnatrice Régionale VAMED

ACTE D'IMPLEMENTATION

1. **Sujet proposé :** « La prise en charge d'un enfant avec du rachitisme carentiel ».
2. **Proposé par :** Dr. Alexandru Chiril VOLOC, maître de conférence.
3. **Lieu et Service concerné :** Centre hospitalier universitaire D'OWENDO, service de consultation externe
4. **Période d'implémentation du sujet :** 2015, 2016
5. **Les Références:** Garabédian, M. La vitamine D: les nouvelles fonctions d'une ancienne vitamine: Les vitamines liposolubles. in Congrès/ Conférence internationale du tournesol No15. 2000. Toulouse, FRANCE. Voloc A cu coautorii. Aspecte clinico-biologice și genetice în patogenia carenței de vitamina D în perioadele pre- și postnatală de dezvoltare a copilului. Iași, România: editura Alfa, 2015. 243p. ISBN: 978-606-540-141-9. Ababii L., Voloc A., Moroșanu L., Maniuc M., Voloc A. A. Afecțiunile respiratorii acute la copil. Chișinău: Tipografia Centrală. 2010. 172p. ISBN 978-9975-78-859-5. Voloc A., Țurea V., Garabedian M., Moroșanu L. et al. Dezvoltarea copilului și conduita în maladiile nutriționale. Chișinău:Tipografia Centrală. 2007.312p. ISBN 978-9975-923-95-8. Maltsev S.V., Arkhipova N. N., Shakirova E. M. Vitamin D, calcium and phosphate in healthy children and in pathology. Kazan, 2012, p. 120. Rajah J., Thandrayen K., Pettifor J.M., et al.Clinical practice: diagnostic approach to the rachitic child. In: Eur J Pediatr, 2011, vol. 170(9), p. 1089-1096. Paterson C. R., Vitamin D deficiency: a diagnosis often missed. In: Br J Hosp Med (Lond), 2011, vol. 72(8), p. 456-458. Paterson C. R. Vitamin D deficiency and fractures in childhood. In: Pediatrics, 2011, vol. 127(5), p. 973-974. Moon R. J, Crozier S. R., Dennison E. M. et al.Tracking of 25-hydroxyvitamin D status during pregnancy: the importance of vitamin D supplementation. In: Am J Clin Nutr, 2015, vol. 102, p. 1081-1087. Harvey N.C, Holroyd C., Ntani G. et al. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. In: Health Technol Assess, 2014, vol. 18, p. 1-190. Spirichev V. B. On the biological effects of vitamin D. In: Pediatriya, 2011, vol. 90(6), p. 113-119. Rizzoli R. et al., Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. In: Bone, 2010, vol. 46(2), p. 294-305. Bilinski K, Boyages S. Evidence of overtesting for vitamin D in Australia: an analysis of 4.5 years of Medicare Benefits Schedule (MBS). In: BMJ Open, 2013, vol. 3(6). Elder C.J.; Bishop N.J. Rickets. In: Lancet, 2014, vol. 383, p. 1665-1676.
6. **Les resultats obtenus :** Les praticiens et le personnel soignant ont appris à mieux gérer les enfants avec le rachitisme carentiel.
7. **L'efficacité de l'implementation :** le protocole élaboré et distribué au sein du service, presente une conduite claire et facile à réaliser.

Directrice de la Formation/Superviseur de projets



DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Voloc Alexandru

Semnătura

Data

CV AL AUTORULUI



Date personale

Nume, Prenume

Voloc Alexandru

Data, luna, anul nașterii

27 noiembrie 1953

Locul nașterii

Republica Moldova, raionul Fălești, s. Năvîrneț

Studii universitare

1971 – 1977

Institutul de Stat de Medicină, facultatea de pediatrie, Chișinău

Studii postuniversitare

1977-1978

Internatura la specialitatea de Pediatrie, SCMC nr.1, Chișinău

1983-1985

Secundariatul clinic special cu însușirea limbii franceze, farmacopeii franceze și medicinei tropicale, Institutul de perfecționare a medicilor, Kiev, Ucraina

1996-1997

Studii postuniversitare la distanță, “Rezolvarea problemelor de sănătate publică”, Centrul internațional al copilului, Paris, Franța

1997

Studii postuniversitare “Soluționarea problemelor materno-infantile de sănătate publică, Centrul internațional al familiei și copilului, Paris, Franța

2005

Programul SABIT al Guvernului SUA “ Gestionarea spitalelor”, Washington, DC, SUA

Activitatea profesională

2013 –prezent

Coordonator Regional de pregătire a cadrelor medicale spitalicești

VAMED und service (Regiunea Africii Ecuatoriale).

Proiectul: “FORMATION”: Propus pentru decorarea cu medalia de bronz pentru rezultatele obținute.

2010 – 2013

Director de clinică, Centrul Regional Spitalicesc din FCV/KLM Ogooue, Gabon.

Coordonator de luptă contra epidemiei Chikungunya-Dengue “Equipe Interpays” Africa Centrală. Menționat cu Diploma de onoare. Membru al Echipei cadru al DRS.

2008 – 2009

Medic pediatru/neonatolog. Centrul Regional Spitalicesc, Saurimo, Angola

2004 – 2008

Director Medical, Președinte al Consiliului Medical, medic pediatru în secția de pediatrie generală, Spitalul Clinic Municipal pentru Copii nr.1, Chișinău, Moldova

2004 – 2008	Conferențiar universitar. Catedra de pediatrie- semiologie și puericultură, Universitatea de stat de medicină și farmacie „N. Testemițanu”
2001 – 2004	Medic – pediatru Secția de reumatologie a Institutului de cercetări științifice în domeniul ocrotirii sănătății mamei și copilului, Chișinău, Moldova
1997 – 2001	Pediatrul principal al Ministerului sănătății al Republicii Moldova; Medic-pediatru, secția de pediatrie, Institutul de cercetări științifice în domeniul ocrotirii sănătății mamei și copilului, Chișinău, Moldova Conferențiar universitar la Catedra de pediatrie a USMF “Nicolae Testemițanu”
1991-1997	Medic-pediatru, ordinator clinic superior. Secția de pediatrie, Institutul Mamei și Copilului, Chișinău, Republica Moldova
1990-1991	Medic – pediatru cu abilități în gastrologie Secția de gastrologie a Institutului de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, Chișinău, Republica Moldova.
1989-1990	Medic – pediatru Secția de gastrologie a Institutului de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, Chișinău, Republica Moldova.
1986-1989	Medic – pediatru Secția de pediatrie și neonatologie, inclusiv cea de copii orfani a Spitalului Civil din Tiaret, Republica Democrată Algeriană
1985-1986	Medic – neonatolog Secția de neonatologie a Institutului de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, Chișinău, Republica Moldova.
1983-1985	Medic – pediatru. Cadru superior de rezervă a Ministerului Sănătății al URSS pentru a fi angajat peste hotarele țării în calitate de specialist în pediatrie și neonatologie. Catedra de Pediatrie nr.1 a Institutului de perfecționare a medicilor. Spitalul clinic specializat nr.14 Kiev, Ucraina
1980-1983	Medic – pediatru în secția de pediatrie Spitalul Raional Central or. Dondușeni, Moldova
1978-1980	Medic pediatru de sector. Spital raional central s. Tîrnova, raionul Dondușeni, medic neurolog pentru maturi (0.5 salariu)
Educație și instruire	
1971-1977	Diplomă de Medic Pediatru. Facultatea de Pediatrie.

07-09-1998	Institutul de Stat de medicină, Chișinău, Moldova Diplomă de Doctor în Științe Medicale. Specialitatea Pediatrie. Institutului de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, Chișinău, Moldova.
06-07-2005 – 04-08-2005	Certificat în Gestiunea spitalelor. Catedra de sănătate publică a Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu” din orașul Chișinău Republica Moldova
19-06-2002 – 21-06-2002	Curs de instruire continuă în cadrul Săptămânii a XXVII a Medicinii Balcanice. Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu” Chișinău, Moldova
18-01-1999 – 20-01-1999	Curs de instruire în domeniul managementului rațional farmaceutic. Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu” Chișinău, Moldova
29-11-1999 – 04-12-1999	Instruire continuă în domeniul epidemiologiei nutriționale, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu” Chișinău, Moldova
26-10-1998 – 06-11-1998	Training internațional în Conduita integrală a maladiilor infantile. Alma-Ata, Kazahstan, organizat de OMS Biroul Regional European
26-06-1998	Instruire continuă în conduita clinică a maladiilor diareice și infecțiilor respiratorii acute la copil. Organizat de OMS Biroul Regional European în or. Criuleni, Moldova
19-05-1998 – 22-05-1998	Atelier de lucru și instruire în domeniul imunizării. Ministerul Sănătății din Kîrgîzstan, or. Bișkek
20-11-1996 – 14-01-1997	Instruire continuă în gastroenterologie și nutriția
09-04-1997 – 09-05-1997	pediatrică. Spitalul Robert Debré, Paris, Franța
1996 – 1997	Curs internațional în domeniul sănătății mamei și copilului. Centrul Internațional al Copilului și Familiei, Paris, Franța
04-1996 – 12-1996	Instruire continuă la distanță în domeniul soluționării problemelor de sănătate a Mamei și Copilului. Centrul Internațional al Copilului și Familiei Paris, Franța

Afilieri și activitate internațională

1997 - 2005	Membrul Comitetului internațional al metabolismului fosfocalcic și al vitaminei D, Paris, Franța; Colaborare îndelungată cu UNICEF pe diferite proiecte de studiu la nivel național (traducător, anchetator, coordonator național, coordonator științific) ; În colaborare cu AFPA humanitaire din Franța și Specialiștii principali din Moldova, a fost elaborat și editat ghidul « Protocoale de urgență în pediatrie »; Președinte/Vice-președinte al echipelor de experți ai Centrului Național de Evaluare și Acreditare a Instituțiilor Medicale de Stat și Private din Republica Moldova; Am colaborat cu ONG „Médecins Sans Frontières
-------------	---

Belgique” asupra elaborării unui Proiect de conduită a bolnavilor psihici la nivel de ambulatoriu, fiind selectat în calitate de coordonator național al proiectului (proiectul nu a fost implementat din lipsa de finanțe suficiente pentru realizarea lui la nivel de țară);

În colaborare cu savanții din Franța, am elaborat, promovat și implementat Programul național de luptă contra maladiilor iod deficitare;

În calitate de pediatru principal al Ministerului sănătății, am elaborat și implementat Programul național de alimentație al copiilor de toate vârstele în baza cărui am obținut de la Comitetul european de ajutor umanitar 2 mln euro și implementat pe parcursul a mai multor ani în comun cu ONG “Pharmaciens sans frontieres. Comité International”, programul de alimentare a copiilor cu diferite stări de malnutriție;

În calitate de director medical, am elaborat, promovat și implementat programul de reabilitare medicală a copiilor din orfelinatul pentru fete cu deficiențe mentale și fizice din or. Hâncești. Ca rezultat, în instituția dată s-a redus considerabil mortalitatea, s-a ameliorat calitatea vieții fetelor, iar instituția după reconstrucția efectuată cu ajutorul Guvernului Irlandez, servește exemplu pentru toată țara privind standardele de viață, întreținere și reabilitare medicală;

Pe parcursul a mai multor ani am fost responsabilizat la nivel de minister al sănătății să elaborez strategii de scădere a mortalității infantile, infanto-juvenile și a copiilor de toate vârstele;

Pe parcursul a 5 ani am fost membru al Comitetului de adopție națională și internațională a copiilor orfani al Guvernului Republicii Moldova;

În colaborare cu UNICEF, pe parcursul a 6 ani, în calitate de președinte, am implementat Proiectul de luptă contra maladiilor respiratorii acute și al bolilor diareice la copii recomandat de către OMS.

Cunoașterea limbilor

Română – maternă, rusă, franceză – fluent, engleză, portugheză – noțiuni de bază