

# Koncentracija vitamina D u muškaraca i žena u dobi od 18 do 28 godina u zimskom radoblju

---

Šarić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:855195>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Jelena Šarić**

**KONCENTRACIJA VITAMINA D U  
MUŠKARACA I ŽENA U DOBI OD 18 DO  
28 GODINA U ZIMSKOM RAZDOBLJU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Jelena Šarić**

**KONCENTRACIJA VITAMINA D U  
MUŠKARACA I ŽENA U DOBI OD 18 DO  
28 GODINA U ZIMSKOM RAZDOBLJU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u Zavodu za kliničku laboratorijsku medicinu u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentorica rada: prof. prim. dr. sc. Tatjana Bačun.

Rad ima trideset i šest (36) stranica, pet (5) tablica i dvije (2) slike.

*Posebna zahvala mentorici prof.prim.dr.sc Tatjani Bačun na savjetima, prenesenom znanju i pomoći pri pisanju rada.*

*Hvala mojim kolegicama Tei Markulak i Ivani Jelavić.*

*Zahvala mojoj obitelji na stalnog podršci, ohrabrivanju i ljubavi.*

**SADRŽAJ**

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....                                | 1  |
| 1.1. Vitamini.....                          | 1  |
| 1.2. Vitamin D.....                         | 1  |
| 1.2.1. Izvori vitamina D.....               | 2  |
| 1.2.2. Metabolizam vitamina D.....          | 4  |
| 1.2.3. Biološko djelovanje vitamina D.....  | 6  |
| 1.2.4. Deficit i toksičnost vitamina D..... | 7  |
| 1.2.5. Optimalna doza vitamina D.....       | 9  |
| 1.2.6. Povezanost vitamina D i bolesti..... | 9  |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....                | 11 |
| 3. ISPITANICI I METODE.....                 | 12 |
| 3.1. Ustroj istraživanja.....               | 12 |
| 3.2. Ispitanici.....                        | 12 |
| 3.3. Metoda.....                            | 12 |
| 3.3.1. Prikupljanje uzoraka.....            | 12 |
| 3.3.2. Priprema uzoraka za analizu.....     | 12 |
| 3.3.3. LC-MS/MS.....                        | 12 |
| 3.4. Statističke metode.....                | 17 |
| 4. REZULTATI.....                           | 18 |
| 5. RASPRAVA.....                            | 21 |
| 6. ZAKLJUČAK.....                           | 24 |
| 7. SAŽETAK.....                             | 25 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| 8. SUMMARY.....    | 26 |
| 9. LITERATURA..... | 27 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 34 |
| 11. PRILOG.....    | 35 |

**Popis kratica**

D2 – ergokalciferol

D3 – kolekalciferol

25(OH)D3 – 25-hidroksikolekalciferol

1,25(OH)2D3 – 1,25-dihidroksikolekalciferol

UVB – ultraljubičaste B sunčeve zrake

CYP – citokromi P450

7-DHC – 7-dehidrokolesterol (engl. *7-dehydrocholesterol*)

DBP – protein koji veže vitamin D (engl. *vitamin D-binding protein*)

VDR – receptor za vitamin D

RXR – receptor retinoične kiseline

PTH – paratiroidni hormon

FGF23 – fibroblastni čimbenik rasta 23

VDRE – elementi odgovora vitamina D

IJ – internacionalne jedinice (engl. *international units*)

KBC – klinički bolnički centar

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*)

MS – maseni spektrometar

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*)

SRM – praćenje jednostrukih reakcija (engl. *single reaction monitoring*)

MRM – praćenje višestrukih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring*)



## 1. UVOD

### 1.1. Vitamini

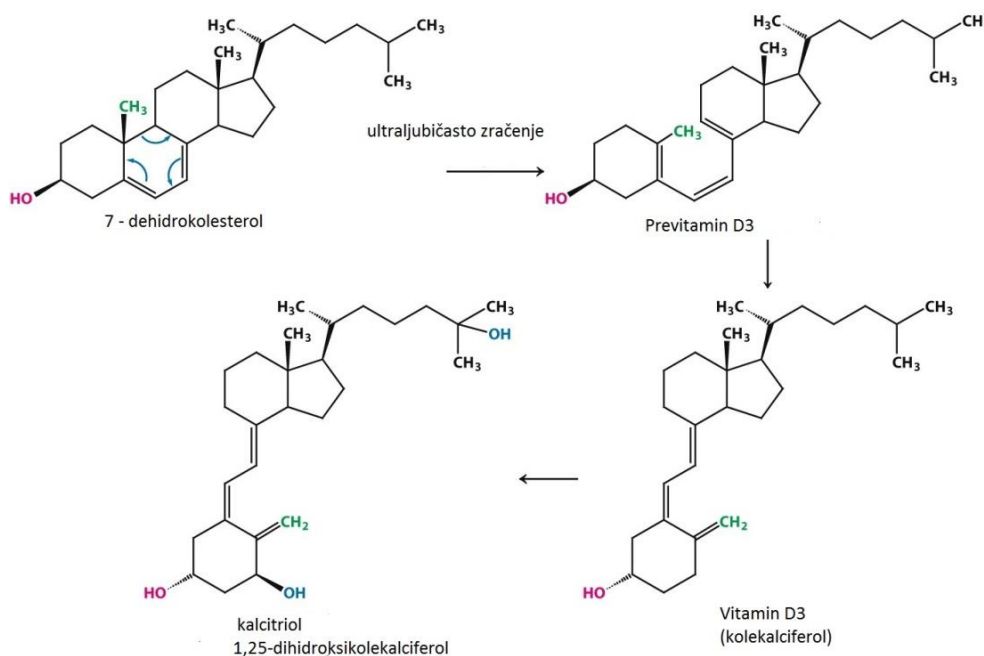
Riječ „vitamin“ dolazi od latinske riječi *vita*, što znači život, i riječi *amin* jer je poljski biokemičar Casimir Funk pretpostavio da je riječ o aminu. Kasnije su otkriveni drugi vitamini koji se nisu mogli svrstati u amine, ali je naziv ipak zadržan. Vitamini su organski spojevi koji su organizmu potrebni u malim količinama. Različite su kemijske strukture i potrebni su za održavanje zdravlja, rasta i reprodukcije. Njihova je uloga u metabolizmu održavanje aktivnosti enzima jer su mnogi od njih koenzimi ili prostetičke skupine. Kod reakcija u kojima su koenzimi, vitamini služe kao primatelji ili davatelji skupina, iona ili elektrona, troše se ili mijenjaju te je zbog toga organizmu potrebna stalna opskrba vitaminima. Ljudski organizam ne može ih sam sintetizirati te ih zbog toga moramo unositi prehranom. Manjak vitamina nazivamo hipovitaminoza i ona uzrokuje karakteristične poremećaje u organizmu. Višak vitamina naziva se hipervitaminoza. Ona je rijetka i u većini ju slučajeva ne uzrokuje prehrana. Potpuni nedostatak vitamina naziva se avitaminoza. Prema topljivosti razlikujemo vitamine topljive u mastima i vitamine topljive u vodi. Vitamini topljivi u vodi su: tiamin, riboflavin, niacin, pantotenska kiselina, piridoksin, folna kiselina, cijanokobalamin i askorbinska kiselina. Oni slobodno putuju kroz tijelo, njihov se višak izlučuje bubrezima te su organizmu stalno potrebni u malim dozama. Vitamini topljivi u mastima su: vitamin A, vitamin D, vitamin E i vitamin K. Oni se pohranjuju u tjelesnim stanicama i ne moraju se konzumirati često jer ih, osim vitamina D, normalna prehrana daje dovoljno (1, 2).

### 1.2. Vitamin D

Sir Edward Mellanby, znanstvenik koji je većinu svog života proveo proučavajući rahitis i njegovu incidenciju u Velikoj Britaniji, zaključio je da je rahitis bolest koja se javlja zbog nedostatka određene tvari u prehrani. Istu je bolest liječio pomoću ulja jetre bakalara. Pretpostavio je da je riječ o vitaminu A, a McCollum je testirao njegovu hipotezu i došao do zaključka da nije riječ o vitaminu A, već o novom vitaminu kojeg je nazvao vitamin D. Askew i suradnici 1932. godine uspjeli su izolirati vitamin D iz ergosterola, 1935. godine Windaus je uspio izolirati vitamin D<sub>3</sub>, a 1978. godine Esvelt i suradnici detektirali su ga i izolirali masenom spektrometrijom. Nicolaysen je uočio da vitamin D uzrokuje povećanu apsorpciju kalcija iz tankog crijeva. Otkriće vitamina D utjecalo je na razvoj velikog broja

istraživanja radi boljeg razumijevanja njegove uloge u liječenju i prevencije rahitisa kod djece i osteomalacije kod odraslih (3).

Vitamin D (D2 ili D3) spada u vitamine topljive u mastima, a njegova specifična obilježja i steroidna struktura čine ga više hormonom nego vitaminom. U organizmu ljudi i sisavaca stvara se vitamin D3 (kolekalciferol), dok kod biljaka nastaje vitamin D2 (ergokalciferol). Vitamin D2 razlikuje se od vitamina D3 jer ima dvostruku vezu između C22 i C23 i metilnu skupinu na C24 bočnom lancu. Također, vitamin D2 potječe od biljnog sterola, dok vitamin D3 potječe od 7-dehidrokolesterola, prekursora kolesterola, sintetiziranjem u koži (1). Sinteza vitamina D prikazana je na Slici 1.



**Slika 1.** Sinteza vitamina D (slika preuzeta i prilagođena iz knjige (2)).

### 1.2.1. Izvori vitamina D

Glavni izvor vitamina D za većinu je ljudi izlaganje kože ultraljubičastim B sunčevim zrakama (UVB) i na taj se način vitamin D u krvi zadržava dva puta duže u usporedbi s onim unesenim prehranom ili dodacima. Količina vitamina D proizvedena izlaganjem suncu jednaka je unošenju između 10.000 i 25.000 internacionalnih jedinica (IJ) vitamina D (4). Zemljopisna širina, dob dana i godišnje doba utječu na unos vitamina D. Pigmentacija kože, starost, stil odijevanja, korištenje kreme za sunčanje te duže radno vrijeme u zatvorenom

prostoru mogu spriječiti sintezu vitamina D te dovesti do deficita. Koža osoba tamnije boje kože zahtijeva duže izlaganje sunčevoj svjetlosti kako bi se postigla ista količina vitamina D u usporedbi s kožom osoba svjetlije boje kože (5, 6). Mala količina namirnica sadrži vitamin D, a neke od njih su meso masne ribe, jaja, gljive te ostali proizvodi koji su prikazani u Tablici 1. Mnoge europske zemlje dodaju vitamin D u žitarice, kruh i margarin te se takvim proizvodima odvija velik dio unosa vitamina D prehranom. Smjernice Europskog endokrinološkog društva ukazuju na to da je potreban dnevni unos od 1.500 do 2.000 IJ vitamina D kako bi se postigle koncentracije 25- hidroksikolekalciferola vitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) > 20 ng/ml u serumu kod odraslih osoba (4, 7). Zabrinutost populacije vezano uz povezanost izlaganja sunčevim zrakama i raka kože te prerano starenje kože dovelo je do povećane uporabe proizvoda za sunčanje sa zaštitnim faktorom koji dovode do smanjenih koncentracija vitamina D u organizmu. Skupinu osoba s rizikom od nedostatka vitamina D čine: trudnice i dojilje, mlade žene, dojenčad i djeca mlađa od 5 godina, osobe čija je izloženost sunčevom svjetlu niska ili nikakva, osobe tamnije boje kože, pretile osobe te osobe koje uzimaju lijekove koji utječu na metabolizam vitamina D u krvi (5, 6). Edukacija populacije, praćenje koncentracija te nadomjesna primjena važan su čimbenik u održavanju optimalnih koncentracija vitamina D u organizmu.

**Tablica 1.** Izvori vitamina D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> (preuzeto i prilagođeno s internet stranice (4)).

| Izvor                             | Sadržaj vitamina D, IJ = 25 ng                                |
|-----------------------------------|---|
| Ulje jetre bakalara               | 400 – 1000 IJ / žličica vitamina D <sub>3</sub>               |
| Losos, svježi                     | 600 – 1000 IJ / 100 g vitamina D <sub>3</sub>                 |
| Losos, konzerva                   | 300 – 600 IJ / 100 g vitamina D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> |
| Sardine, konzerva                 | 300 IJ / 100 g vitamina D <sub>3</sub>                        |
| Skuša, konzerva                   | 250 IJ / 100 g vitamina D <sub>3</sub>                        |
| Tuna, konzerva                    | 236 IJ / 100 g vitamina D <sub>3</sub>                        |
| Shiitake gljive, svježe           | 100 IJ / 100 g vitamina D <sub>3</sub>                        |
| Shiitake gljive, osušene na suncu | 1600 IJ / 100 g vitamina D <sub>3</sub>                       |
| Žumanjak                          | 20 IJ   |

### 1.2.2. Metabolizam vitamina D

Za metabolizam vitamina D3 najbitnija su tri ključna koraka: 25-hidroksilaza, 1  $\alpha$ -hidroksilaza i 24-hidroksilaza koje djeluju uz pomoć citokroma P450 (CYP-ova). Enzimi se nalaze u endoplazmatskom retikulumu (CYP2R1) ili u mitohondriju (CYP27B1 i CYP24A1) (9).

U koži se pomoću sunčevih UVB zraka (290 – 300 nm) odvija sinteza vitamina D iz kolesterola, odnosno preko 7-dehidrokolesterola (7-DHC, engl. *7-dehydrocholesterol*) nastaje prekolekalciferol (previtamin D3) u keratinocitima i *stratum spinosum* slojevima epiderme, koji zatim termalnom izomerizacijom prelazi u vitamin D3 (kolekalciferol). Višak UVB zraka pretvara previtamin D3 u biološki neaktivne metabolite, tahisterol i lumisterol. Vitamin D3 iz kože u jetru prenosi se vezan za vitamin D vežući protein (DBP, engl. *vitamin D-binding protein*). Vitamin D unesen prehranom oslobađa se u želucu i crijevima te se zatim uklapa u micele te prenosi do crijevnih resica, gdje se apsorbira pasivnom difuzijom. Nakon apsorpcije ugrađuje se u hilomikrone i prenosi do jetre putem limfnog sustava ili krvotoka (2, 8, 9, 10, 11).

U jetri se kolekalciferol hidroksilira u 25-hidroksikolekalciferol (kalcidol), koji je glavni cirkulirajući oblik vitamina D3 i klinički pokazatelj statusa vitamina D. Najvažniji su CYP-ovi za ovaj korak mitohondrijski CYP27A1 i mikrosomalni CYP2R1, iako se u istraživanjima sa smanjenim koncentracijama 25-OH vitamina D3 povezuje samo gubitak CYP2R1. CYP27A1 može hidroksilirati vitamin D i slične spojeve na položajima 24, 25 i 27. D3 je prvenstveno hidroksiliran na položaju 25, a D2 na 24. Za razliku od CYP27A1, CYP2R1 jednako hidroksilira D2 i D3 (8, 9, 10, 11).

Kalcidol ili 25-hidroksikolekalciferol pomoću DBP-a prenosi se u bubrege, gdje se pretvara u svoj biološki aktivan oblik 1,25-dihidroksikolekalciferol (kalcitriol) pomoću enzima 1  $\alpha$ -hidroksilaze pomoću CYP27B1. CYP27B1 ubraja se u mitohondrijske oksidaze mješovitih funkcija i homologan je s ostalim hidroksilazama poput CYP24A1 ili CYP27A1. Locira se na unutarnjoj membrani mitohondrija i služi kao terminalni akceptor elektrona koji se prenose iz NADPH-a preko feredoksin reduktaze. Njegova ekspresija značajna je u keratinocitima, bubrezima, mozgu, makrofazima itd. Regulacija 1  $\alpha$ -hidroksilaze u bubregu odvija se pomoću paratiroidnog hormona (PTH), fibroblastnog čimbenika rasta 23 (FGF23) i 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D. Povišeni kalcij inhibira sintezu 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D3 supresijom PTH, a

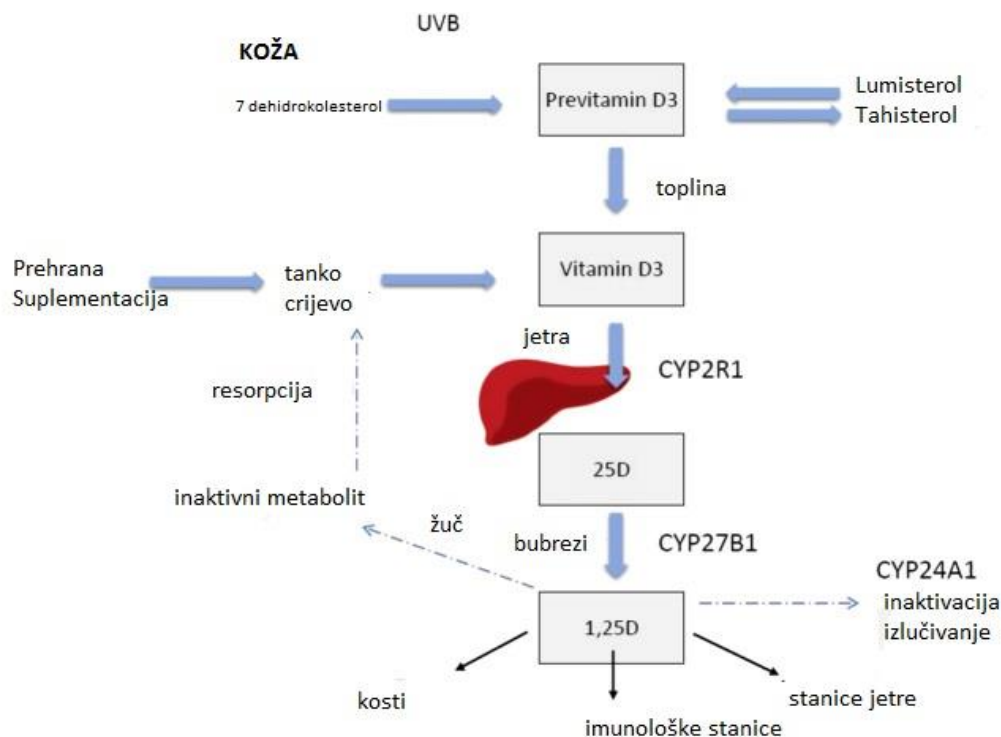
povišeni fosfat stimuliranjem FGF23. CYP24A1 inhibiran je s 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i često služi kao njegov marker bubrezima.

Cirkulirajući 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kataboliziran je s 24-hidroksilazom pomoću CYP24A1. 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> na položaju C-24 hidroksiliraju se pomoću ovog enzima te nastaju 24,25(OH)<sub>2</sub> i 1,24,25(OH)<sub>3</sub> vitamin D<sub>3</sub>, odnosno dolazi do razgradnje i nastanka konačnog produkta kalcitranske kiseline koja se izlučuje urinom. Kod ljudi dominira aktivnost 24-hidroksilaze, iako CYP24A1 također može imati aktivnost 23 hidroksilaze, što uzrokuje stvaranje 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>-26,23 laktona i 25(OH) D<sub>3</sub>-26,23 laktona. CYP24A1 inhibira 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> te tako povratnim mehanizmom sprječava intoksikaciju organizma vitaminom D (8, 9, 10, 11). Detaljan metabolizam vitamina D prikazan je na Slici 2.

Metaboliti vitamina D u krvi se prenose vezani za protein koji veže vitamin D (DBP) i albumin. DBP se primarno stvara u jetri, ali može i u drugim tkivima kao što su bubrezi ili masne stanice. Ima visoki afinitet za metabolite vitamina D, a njegove koncentracije veće su od koncentracija metabolita vitamina D. Razine DBP-a smanjuju se tijekom akutnih stanja, bolesti jetre i nefrotskog sindroma (8). Iako je glavna funkcija DBP-a transport metabolita vitamina D, on također sudjeluje i u drugim funkcijama, kao što su aktivacija makrofaga ili osteoklasta. Filtrira se u glomerulu nefrona te reapsorbira zajedno s 25(OH)D<sub>3</sub> u bubrežnim tubulima. Poprilično je polimorfan, a tri njegove najpoznatije inačice su GC1F, GC1S i GC2, koje imaju različite afinitete vezanja na vitamin D, od kojih GC2 ima najmanji, a GC1F najveći (8, 11).

Receptor za vitamin D (VDR) prisutan je u većini tkiva i pripada porodici steroidnih receptora. Nalazi se na kromosomu 12q13 i sastoji se od tri domene: N-terminalne DNA vezane domene s dva cinkova modula prsta koja se vežu za brazde DNA, C-terminalne domene za vezanje liganda i zglobne regije koja povezuje te dvije domene zajedno. Do danas su otkriveni brojni VDR polimorfizmi koji su locirani na promotoru u 3'UTR regiji, a pokazali su značajnu povezanost s hipertenzijom, dijabetesom i autoimunim bolestima. Hormonski oblik vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ili kalcitriol ligand je za VDR, koji djeluje u skladu s drugim hormonskim receptorima, posebno s x receptorom retinoične kiseline (RXR), s kojim stvara heterodimer. Cirkulirajući kalcitriol prolazi kroz staničnu membranu i u jezgri se veže za VDR. Genomski učinak uključuje vezanje kompleksa VDR-kalcitriola s x receptorom retinoične kiseline na specifične DNA sekvence elementa odgovora vitamina D (VDREs), što

rezultira transkripcijom gena i sintezom nove mRNA (8, 9, 10). Negenomski učinak očituje se aktiviranjem signalnih molekula (npr. fosfolipaza C ili A2), aktivacijom protein-kinaze (npr. protein-kinaza A), otvaranjem ionskih kanala ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Cl}^-$ ) te stvaranjem sekundarnih glasnika (npr. cAMP) (11, 12).



**Slika 2.** Metabolizam vitamina D (slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Pliz i sur. (13)).

### 1.2.3. Biološko djelovanje vitamina D

Biološko djelovanje vitamina D ostvaruje se djelovanjem kalcitriola ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) na crijevnu apsorpciju kalcija i fosfata, bubrežnu ekskreciju i homeostazu kalcija i fosfata za održavanje zdravlja kostiju. Regulacija kalcitriola ovisi o aktivnosti  $1\alpha$ -hidroksilaze i  $24$ -hidroksilaze, koje su regulirane koncentracijama kalcija i fosfata u serumu. Niske koncentracije kalcija uzrokuju pojačano lučenje paratiroidnog hormona koji stimulira sintezu  $1\alpha$ -hidroksilaze, što na kraju dovodi do povećanja kalcitriola. PTH inhibira  $24$ -hidroksilazu. Kalcitriol djeluje na tri ciljna tkiva: crijevo, bubreg i kost zbog održavanja optimalnih razina kalcija u organizmu. U crijevima kalcitriol stimulira apsorpciju kalcija koja ovisi o crijevnoj topljivosti, njegovoj prisutnosti u prehrani i kapacitetu crijevne apsorpcije. U bubrezima kalcitriol zajedno s PTH potiče reapsorpciju kalcija u distalnim tubulima, djelovanjem na

ulazak kalcija kroz apikalnu membranu, difuziju kalcija posredovanu kalbamicinom te aktivan prijenos kroz membranu. U kostima kalcitriol zajedno s PTH izaziva apsorpciju kalcija iz kostiju te uzrokuje hiperkalcijemiju u izvanstaničnoj tekućini (15, 16, 17).

#### **1.2.4. Deficit i toksičnost vitamina D**

##### **Deficit**

U svijetu su prirodni izvori vitamina D ograničeni, a obogaćivanje hrane vitaminom D nedovoljno je ili ne postoji te se zbog toga najvećim dijelom dobiva izlaganjem suncu. Dob dana, geografska širina i godišnje doba imaju utjecaj na proizvodnju vitamina D (18). Za određivanje deficita vitamina D koristi se metoda mjerenje serumskog 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub>. Koncentracije niže od 20 ng/ml upućuju na nedostatak ili deficit vitamina D (7).

Prehrana, manjak 7-DHC-a te smanjeno izlaganje suncu može dovesti do deficita vitamina D kod starije populacije (19). Osobe tamnije boje kože imaju veću količinu melanina u epidermu, koji se s 7-DHC-om „natječe“ za apsorpciju UVB zraka, te je tim osobama potrebno do 10 puta više izlaganja sunčevoj svjetlosti kako bi sintetizirali istu količinu vitamina D kao i osobe svjetlije puti. Korištenjem krema za zaštitu od sunčevih zraka smanjuje se interakcija UVB zraka sa 7-dehidrokolesterolom, što dovodi do smanjene proizvodnje vitamina D za 95 – 99 % (18). Bolesnici s malapsorpcijskim sindromima kao što su celijakija, Chronova bolest ili cistična fibroza imaju smanjene koncentracije vitamina D u krvotoku. Kod osoba s kroničnom bolesti bubrega smanjeno je stvaranje 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>, a kod pretelih osoba uočeno je odlaganje vitamina D u masno tkivo, što dovodi do niskih koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub> u krvotoku (6).

Deficit vitamina D uzrokuje promjene u koncentracijama kalcija i fosfata u organizmu, odnosno dolazi do smanjenja apsorpcija kalcija i fosfora u crijevima, što dovodi do povećanja koncentracija paratiroidnog hormona. Sekundarni hiperparatireoidizam uzrokuje otpuštanje kalcija iz kostiju i povećano izlučivanje fosfora bubrezima. Visoke koncentracije PTH-a također dovode do povećanja osteoklastične aktivnosti, odnosno do smanjenja gustoće kostiju, što može dovesti do osteopenije i osteoporoze (5, 6).

Simptomi koju se javljaju kod bolesnika s deficitom vitamina D su: opća slabost, trzanje mišića, umor, bolovi u mišićima, osteoporoza, osteomalacija itd. Kod djece se javljaju kašnjenje u razvoju, promjene u kostima ili frakture (6).

Prema preporukama Europskog endokrinološkog društva za liječenje deficita vitamina D potrebne su određene koncentracije, a one za dojenčad i manju djecu (0 – 1 godine) iznose 2.000 IJ/d vitamina D2 ili vitamina D3 ili 50.000 IJ vitamina D2 ili vitamina D3 jednom tjedno za 6 tjedana do postizanja optimalnih koncentracije. Za djecu u dobi od 1 – 18 godina preporuča se liječenje s 2.000 IJ/d vitamina D2 ili vitamina D3 za 6 tjedana ili s 50.000 IJ vitamina D2 jednom tjedno najmanje 6 tjedana. Odrasle osobe s deficitom vitamina D liječe se s 50.000 IJ vitamina D2 ili vitamina D3 jednom tjedno 8 tjedana ili s 6.000 IJ/d vitamina D2 ili vitamina D3. Kod pacijenata s malapsorpcijskim sindromom, pacijenata koji uzimaju određene lijekove i pretilih pacijenata potrebna je veća doza, od 6.000 do 10.000 IJ/d za postizanje  $25(\text{OH})\text{D}_3 > 20 \text{ ng/ml}$  (6).

### **Toksičnost**

Prekomjerno izlaganje suncu ne uzrokuje toksičnost vitamina D, međutim prekomjerni unos vitamina D dodacima povezan je s toksičnim učinkom na organizam. Dijagnoza intoksikacije vitaminom D kod većine pacijenata rezultat je prekomjernih doza ili učestalih razdoblja doziranja vitamina D koji se primjenjuju zbog određenih bolesti poput hipoparatiroidizma ili osteoporoze. Intoksikacija vitaminom D dijagnosticira se prisutnošću povišenih koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , praćenih teškom hiperkalcijemijom i hiperkalciurijom, koje su prve mjerljive manifestacije intoksikacije. Zbog popularnosti vitamina D kao lijeka koji se koristi za liječenje mnogih bolesti, uzimanje dodataka vitamina D postalo je izrazito rašireno kod inače zdravih osoba. Iako još nije utvrđena točna koncentracija vitamina D pri kojoj se pojavljuju simptomi intoksikacije vitaminom D, smatra se da se simptomi javljaju pri koncentracijama većim od 150 ng/ml.

Simptomi intoksikacije vitaminom D mogu biti slični simptomima drugih stanja povezanih s hiperkalcijemijom, jer ona dovodi do većine simptomatskih obilježja toksičnosti vitamina D. Gastrointestinalni simptomi su proljev, konstipacija, mučnina, povraćanje i anoreksija, dok su kardiovaskularni simptomi hipertenzija i elevacija ST-segmenta. Simptomi vezani uz bubrege su dehidracija, žeđ, hiperkalciurija i zatajenje bubrega. Ostali simptomi koji se mogu javiti su depresija, zbunjenost, psihoza, gubitak sluha itd.

Akutna intoksikacija vitaminom D uzrokovana je dozama većim od 10.000 IJ/d, što rezultira koncentracijama u serumu  $25(\text{OH})\text{D}_3 > 150 \text{ ng/ml}$ . Kronična intoksikacija vitaminom D uzrokovana je dozama iznad 4.000 IJ/d tijekom dužeg razdoblja (4, 8).



### 1.2.5. Optimalna doza vitamina D

Referentni raspon za vitamin D razlikuje se ovisno o etničkoj pripadnosti, dobi, zemljopisnom položaju populacije i sezoni uzorkovanja. Pokazatelj statusa vitamina D u organizmu koncentracija je 25(OH)D<sub>3</sub>, a njegov poluživot u krvotoku iznosi dva do tri tjedna i u dobroj je korelaciji s bolestima kao što je, primjerice, hiperparatireoidizam. Preporučene koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub> u populaciji su > 20 ng/ml. Koncentracije vitamina D koje su niže od 30 ng/ml upućuju na manjak ili insuficijenciju, dok koncentracije niže od 20 ng/ml upućuju na nedostatak ili deficit vitamina D. Suvišak vitamina D javlja se kad je koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub> viša od 100 ng/ml uz hiperkalcijemiju, a intoksikacija vitaminom D javlja se pri koncentracijama 25(OH)D<sub>3</sub> > 125 ng/ml u krvi. Prema smjernicama Europskog endokrinološkog društva preporučene dnevne količine vitamina D za dojenčad i djeca staru od 0 – 1 godinu iznose 400 IJ/d, a djecu stariju od 1 godine najmanje 600 IJ/d. Odrasle osobe u dobi od 19 – 50 godina zahtijevaju 600 IJ/d. Osobe u dobi od 50 – 70 godina i starije od 70 godina zahtijevaju 600 ili 800 IJ/d. Za sprječavanje padova i fraktura populaciji starijoj od 65 godina preporučuje se 800 IJ/d. Trudnicama i dojiljama potrebno je 600 IJ/d vitamina D. Pretile osobe i osobe čija terapija uključuje antifungike, glukortikoide i antikonvulzivne lijekove trebaju uzimati dva do tri puta više vitamina D u odnosu na svoju dobnu skupinu (4, 7).

### 1.2.6. Povezanost vitamina D i bolesti

Posljednjih je godina ustanovljen utjecaj vitamina D na prevenciju i upravljanje određenim bolestima. Razne epidemiološke studije uvidjele su povezanost između niskih koncentracija 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> i različitih akutnih ili kroničnih bolesti, zbog čega se javlja veliko zanimanje za vitamin D. Vitamin D i kalcij neophodni su za održavanje zdravlja kostiju. Deficit vitamina D uzrokuje smanjenu apsorpciju kalcija, što dovodi do povećanja koncentracija PTH-a te oslobađanja kalcija iz kostiju kako bi se održale optimalne koncentracije kalcija u krvi. Nedostatak vitamina D kod djece može izazvati rahitis, rijetku bolest koja uzrokuje smanjenje gustoće kostiju i savijanje, dok u odraslih dovodi do osteomalacije, slabljenja kostiju, boli u kostima i slabosti mišića (6). Uočena je i povezanost između deficita vitamina D i bolesti kardiovaskularnog sustava, progresije vaskularne kalcifikacije i aterotromboze. Deficit vitamina D povezan je s rizičnim čimbenicima za nastanak kardiovaskularnih bolesti kao što su hipertenzija, dijabetes melitus i dislipidemija (21, 22, 23). U pojedinim je istraživanjima uočeno da kod osoba oboljelih od multiple

skleroze, odgovarajuće koncentracije vitamina D u krvotoku mogu imati povoljan učinak na smanjenje progresije bolesti (24). Vitamin D i njegovi metaboliti smanjuju učestalost različitih vrsta raka (rak debelog crijeva, prostate, dojke i jajnika) inhibicijom angiogeneze, smanjenjem proliferacije te poboljšanjem međustanične komunikacije (25). Deficit 25(OH)D<sub>3</sub> povezan je s razvojem dijabetesa, odnosno javlja se veća otpornost na inzulin i rizik od dijabetesa tipa 2 (26). Postoje istraživanja koja povezuju nedostatak 25(OH)D<sub>3</sub> s povećanim rizikom za depresiju, Alzheimerovu bolest, epilepsiju itd. (27). Vitamin D ima važnu ulogu i u reguliranju imunološke funkcije, inhibiranjem upalnih reakcija i autoimunih bolesti (25). Uočena je i povezanost deficita vitamina D s respiratornim infekcijama, prehladom i gripom (28). Teško je razjasniti je li manjak vitamina D uzrok ili posljedica raznih kroničnih bolesti te su radi toga potrebna daljnja istraživanja.

**2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitati postoje li razlike u koncentraciji 25-OH vitamina D kod ispitanika u dobi od 18 do 28 godina u zimskom razdoblju prema spolu.
2. Usporediti dobivene rezultate analize s referentnim vrijednostima i podacima iz literature.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj istraživanja

Presječna studija.

#### 3.2. Ispitanici

Skupina ispitanika sastojala se od ukupno 59 dobrovoljnih ispitanika u dobi od 18 do 28 godina. Ispitanicima je krv izvađena na prostoru Medicinskog fakulteta Osijeka te zatim analizirana na prostoru Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak kojim su potvrdili da žele sudjelovati u istraživanju.

Istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek.

#### 3.3. Metoda

##### 3.3.1. Prikupljanje uzoraka

Ispitanicima je krv izvađena u epruvete s crvenim čepom u kojima se nalaze polistirenske smole za odjeljivanje seruma od stanica. Ispitanici su trebali stisnuti šaku te je zatim izabrano mjesto uboda opipavanjem vena. Iznad mjesta uboda upotrijebljena je podveza koja nije bila korištena dulje od 1 minute. Mjesto uboda dezinficirano je korištenjem 70%-nog alkohola kružnim pokretom. Nakon što se dezinficijens osušio, ubod igle obavljao se pod kutom od 10 – 20 stupnjeva. Epruvete su nekoliko puta lagano promiješane i ostavljene u uspravnom položaju.

##### 3.3.2. Priprema uzoraka za analizu

Krv je centrifugirana na 3000 okretaja tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, serum se odvojio u druge epruvete pomoću jednokratnih epruveta, koje su se do analize pohranile u hladnjak na -20 °C. Uzorak je zatim analiziran metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) na analizatoru LCMS-8050 prema uputama proizvođača (Shimadzu Corp.) (Slika 3, 4).

##### 3.3.3. LC-MS/MS

Uzorak je analiziran na analizatoru LCMS-8050 prema uputama proizvođača, a analitički sustav LCMS-8050 sastoji se od NEXERA X2 HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) koji je povezan sa

masenim spektrometrom (MS). LC-MS/MS metodu karakterizira visoka osjetljivost, specifičnost te mogućnost istovremene analize više analita (29, 30, 31). Smatra se zlatnim standardom za određivanje koncentracije vitamina D u serumu (7).

Kromatografija je metoda razdvajanja analita između dviju faza; mobilne faze (pokretna faza) i stacionarne faze (nepokretna faza). Tvari iz otopine stupaju u interakciju sa stacionarnom i tekućom mobilnom fazom. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti metoda je koja pumpanjem tekućine (pokretna faza) pod visokim tlakom potiče prolazak smjese tvari ili traženog analita kroz kolonu. Vrijeme zadržavanja na koloni ovisi o stacionarnoj fazi, mobilnoj fazi i o prirodi tvari koju analiziramo. Uređaj za HPLC sastoji se od rezervoara mobilne faze, pumpe, injektora, predkolone, kolone i detektora

Masena spektrometrija metoda je kojom se molekule razdvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja. Sastoji se od ionizatora, koji ionizira plinovite molekule i fragmente koji su nastali cijepanjem molekula, analizatora, koji razdvaja ionizirane čestice prema odnosu masa i naboja i detektora koji detektira razdvojene ione i pohranjuje nastali signal.

Kemijska ionizacija atmosferskog tlaka (APCI) široko je korištena tehnika ionizacije u LC-MS/MS metodi. Ionizacija se odvija pri atmosferskom tlaku i može ionizirati polarne i nepolarne molekule, ali analit mora biti termički stabilan. Za razliku od ESI ionizacije, APCI se događa u plinskoj fazi te joj potrebna optimalna temperatura od 400 °C i struja dušika. Uzorak se otapa u otapalu i pumpa se kroz kapilaru unutar kvarcne cijevi. Na kraju kapilare uzorak se pretvara u aerosol, a zatim isparava uz pomoć struje dušika i zagrijava se na temperaturu od 400 °C. Plinovito otapalo i uzorak tada se ioniziraju djelovanjem visoko nabijene elektrode koja stvara električno polje. Javljuju se česti sudari iona i molekula koji mogu prenijeti naboj iz iona u drugi neutralni ion. Sudar ioniziranog iona otapala s molekulom analita može stvoriti izravan prijenos naboja s radikalnog kationa na ion analita. Dobiveni ioni analita unose se u maseni spektrometar za analizu.

Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri paralelne elektrode koje su različitog naboja (dvije negativne i dvije pozitivne) te su postavljene na jednakoj udaljenosti jedna od druge. Ioni traženog analita prolaze između tih elektroda, a napon koji se dovodi na elektrode stvara elektromagnetsko polje o kojem ovisi koji će točno ion proći. Kvadrupolni analizator sadrži tri kvadrupola povezana u seriji. U prvom kvadrupolu filtriraju se odabrani prekursor ion na osnovi omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Nakon Q1 ioni putuju u drugi kvadrupol koji služi kao kolizijska ćelija, gdje se ioni fragmentiraju bombardiranjem s molekulama dušika ili argona te

nastaju fragmenti prekursor iona. Od tih nastali fragmenata iona odabiru se produkt (sekundarni) ioni, gdje se u trećem kvadrupolu filtriraju opet na osnovi omjera mase i naboja ( $m/z$ ) te dobiveni maseni spektar prikazuje intenzitete jednog ili više odabranih produkt iona. Ako se prati jedan produkt ion, radi se o jednostrukoj tranzicijskoj reakciji (engl. *single reaction monitoring, SRM*), a u našem slučaju radi se o praćenju više produkt iona u višestrukim tranzicijskim reakcijama (engl. *multiple reactions monitoring, MRM*) (29).

#### **Potrebne kemikalije:**

*ClinMass® Complete Kit for 25-OH-Vitamin D2/D3 in Plasma and Serum*

**Sadržaj:** – tekućina za ispiranje (1 x 1000 ml)

- SPE-pufer (2 x 1000 ml)
- mobilna faza (1 x 700 ml)
- interni standard (1 x 30 ml)
- set kalibratora seruma, liofil (razina 0 – 3) (4 x 1 x 1 ml)
- bočice za prethodnu obradu uzoraka (3 x 100 komada)
- precipitant P (15 ml).

**Start pribor:** – analitička kolona s kromatogramom (1 kom)

- SPE-kolona (1 kom)
- analitička kolona 3-epi s testnim kromatogramom + (za dodatnu analizu 3-epi 25-OH-Vitamin D3) (1 kom).

**Dodatna oprema:** – *inline-filter* (sito od nehrđajućeg čelika, bez mrtvog volumena) (1 kom)

- zrna i sita za narudžbu br. FK7400 (4 kom svaka).

**Potrebni LC moduli:** – *autosampler* (s funkcijom hlađenja, 4 °C)

- izokratna HPLC pumpa 1 (SPE-pufer)
- izokratna HPLC pumpa 2 (mobilna faza)
- ventil sa 6 priključaka-3-kanalnim prekidačem (npr. RECIPE, narudžbeni br. FK1102)
- grijač kolone (40 °C).

**Za ručnu obradu uzorka potrebno je:** – pipete

- nastavci pipeta
- stolna centrifuga
- *vortex* mikser.

#### **Postupak:**

Priprema uzorka započinje pipetiranjem 50 µl uzorka i dodavanjem 150 µl precipitacijskog reagensa (sadrži interni standard). Zatim slijedi miješanje 30 sekundi na *vortex* mikseru i inkubiranje 10 minuta na 4 °C te ponovno miješanje 10 sekundi na *vortex* mikseru i centrifugiranje na 10.000 x g u trajanju od 5 minuta. Alikvot supernatanta prenosi se u posudu za uzorke koja je prikladna za *autosampler*, a volumen injekcije varira između 10 – 50 µl. LC sustav isprao se mješavinom voda/metanol (1 + 1). Uzorci zatim ulaze u ionizacijsku jedinicu masenog spektrometra, gdje sastavnice uzorka isparavaju i ioniziraju djelovanjem APCI. Ioni se prenose u ionski put tandemskog masenog spektrometra koji se sastoji od tri kvadrupola. Kvadrupol čine 4 paralelne elektrode koje su različitog naboja i koje su postavljene na jednakoj udaljenosti jedna od druge. Kada ioni prolaze električnim poljem kvadrupola, traženi analit selektivno se odjeljuje pomoću odgovarajućih napona na kvadrupolu, pri čemu prolaze samo ioni određene mase. Mjerenje analita, 25-OH hidroksivitamina D3 u ovoj metodi provodi se MRM načinom. U ovoj metodi samo traženi ioni (prekursorski ioni) s definiranim omjerom mase i naboja ( $m/z$ ) prolaze u prvom kvadrupolu, prenose se u kolizijsku ćeliju, gdje se djelovanjem inertnog plina (argona) fragmentiraju, a nastali fragmenti (produkt ioni) s definiranim omjerom  $m/z$  prolaze kroz treći kvadrupol za konačnu detekciju (30, 31).



**Slika 3.** Uređaj LCMS-8050, Shimadzu.



**Slika 4.** Prikaz uređaja NEXERA X2 HPLC koji je povezan sa LCMS-8050.



#### 3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci bit će predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci bit će opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bit će testirana Shapiro-Wilk testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina bit će testirane Studentovim t-testom. Sve P vrijednosti bit će dvostrane. Razina značajnosti bit će postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu bit će korišten statistički program MedCalc Statistical Software, inačica 18.11.3.

#### 4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na uzorku od 59 ispitanika, od čega je 27 (45,8 %) muškaraca i 32 (54,2 %) žene. Ispitanicima je krv izvađena na prostoru Medicinskog fakulteta Osijeka te zatim analizirana na prostoru Kliničkog bolničkog centra Osijek. Aritmetička sredina dobi žena je 22 godine (standardna devijacija(SD) = 1,6 godina), a muškaraca 23 godine (standardna devijacija(SD) = 2,15)(Tablica 2.).

**Tablica 2.** Prikaz ispitanika prema dobi i spolu.

|  |                      |
|--|----------------------|
| Ukupan broj ispitanika                     | 59                   |
| Muškarci                                   | 27                   |
| Žene                                       | 32                   |
| Dob (M) (AS(SD))                           | 23 (2,15)            |
| Dob (Ž) (AS( SD))                          | 22 (1,6)             |
| Omjer broja ispitanika prema spolu (M : Ž) | 1:1,18               |
| Dob (AS( SD)) M : Ž                        | 23 (2,15) : 22 (1,6) |

(AS = aritmetička sredina, SD = standardna devijacija, M = muškarci, Ž = žene)

Koncentracija 25-OH vitamina D3 pokazuje širok raspon, a srednja vrijednost iznosi 16,36 ng/ml i niža je od referentne vrijednosti (20 – 100 ng/ml)(Tablica 3).

**Tablica 3.** Dob ispitanika i koncentracija 25-OH vitamina D

| Varijable                       | Srednja vrijednost (x) | Standardna devijacija (SD) | Raspon             | Ukupan broj ispitanika (N) |
|---------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|
| Godina                          | 23                     | 1,89                       | 20-28 godina       | 59                         |
| Koncentracija 25-OH vitamina D3 | 16,36 ng/ml            | 5,68                       | 4,90 – 28,60 ng/ml |                            |

(N = ukupan broj ispitanika,  $\bar{x}$  = srednja vrijednost, SD = standardna devijacija)

Ispitali smo razliku u razinama koncentracije 25-OH vitamina D u odnosu na spol. Rezultati su pokazali da muškarci imaju statistički značajno više razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u odnosu na žene (Studentov t-test,  $P=0,01$ ). Pearsonovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost dobi i koncentracije i uočeno je da povezanost nije značajna ( $r = 0,09$ ;  $P > 0,05$ ).

**Tablica 4.** Prikaz rezultata ispitivanja spolnih razlika u razinama koncentracije 25-OH vitamina D3

|                                 | Aritmetička sredina( $\bar{x}$ )<br>ng/ml |       | Standardna devijacija (SD) |      | Razlika izražena u postotcima | Studentova t-distribucija ( $t$ ) | Stupnjevi slobode ( $df$ ) | P*   |
|---------------------------------|---|-------|----------------------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|------|
|                                 | M   | Ž     | M                          | Ž    |                               |                                   |                            |      |
| Koncentracija 25-OH vitamina D3 | 18,96                                     | 14,18 | 5,76                       | 4,66 | 23,9 %                        | 3,52                              | 58                         | 0,01 |

(M=muškarci, Ž=žene, t = Studentova t-distribucija, df = stupnjevi slobode , \*Studentov t-test)

Aritmetička sredina vrijednosti vitamina D u uzorku iznosila je 16,36 ng/ml. Aritmetička sredina kod muškaraca je 18,96 ng/ml, a kod žena 14,18 ng/ml. Pregledom kumulativnih postotaka može se iščitati da 28,8 % ispitanika ima razine koncentracije 25-OH vitamina D3 više od 20 ng/ml, od toga 44,4 % muškaraca i 15,6 % žena. Značajno je odstupanje od referentnih vrijednosti 25-OH vitamina D u skupini žena (Studentov t-test,  $P = 0,01$ ), i na cijelom uzorku ispitanika (Studentov t-test,  $P = 0,01$ ), dok u skupini muškaraca nema značajnog odstupanja (Tablica 5).

**Tablica 5.** Prikaz rezultata ispitivanja razlika u razinama koncentracije 25-OH vitamina D3 u odnosu na referentnu vrijednosti i podatke iz literature.

|                                 | Ispitanici | Aritmetička sredina x (ng/ml) | Referentni interval za KBC Os, podatci iz literature (4) | % ispitanika s 25(OH) D3 > 20 ng/ml | Prosječno odstupanje (postotak) | Rezultati t testa |             |
|---------------------------------|------------|-------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------|
|                                 |            |                               |  |                                     |                                 | t (df)            | P*          |
| Koncentracija 25-OH vitamina D3 | M          | 18,96                         | 20 – 100 ng/ml   | 44,4 %                              | 5,2%                            | -0,94 (24)        | 0,36        |
|                                 | Ž          | 14,18                         |  | 15,6 %                              | 29,1 %                          | -7,07 (31)        | <b>0,01</b> |
|                                 | U          | 16,36                         |  | 28,8 %                              | 18,2 %                          | -4,92 (58)        | <b>0,01</b> |

(M = muškarci, Ž = žene, U = ukupno, t = Studentova t-distribucija, df= stupnjevi slobode;

\*Studentov t-test)

## 5. RASPRAVA

Otkrićem povezanosti niskih razina vitamina D i raznih bolesti omogućen je napredak u razumijevanju i istraživanju patogenezi bolesti te poboljšanju zdravlja svakog pacijenta. U ovom istraživanju analizirani su rezultati ispitivanja koncentracije 25-OH vitamina D3 u muškaraca i žena u dobi od 18 do 28 godina u zimskom razdoblju. Istraživanje je provedeno na uzorku od 59 ispitanika, od čega je 27 (45,8 %) muškaraca i 32 (54,2 %) žene. Aritmetička sredina vezano uz godinu rođenja ispitanika je 1996. godina, što prosječnog ispitanika čini starim 23 godine. Aritmetička sredina dobi žena je 22 godine (standardna devijacija (SD)=1,6 godina), a muškaraca 23 godine (standardna devijacija(SD)=2,15). Kao i u ostalim istraživanjima, i u ovom je istraživanju dobiven širok raspon koncentracija 25-OH vitamina D3 (4,90 – 28,60 ng/ml). Muškarci su imali statistički značajno više razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u odnosu na žene, gdje je aritmetička sredina vitamina D za muškarce iznosila 18,96 ng/ml, a za žene 14,16 ng/ml. Ispitanici su imali značajno niže razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u serumu u odnosu na referentne vrijednosti i podatke iz literature, gdje je aritmetička sredina koncentracije 25-OH vitamina D3 iznosila 16,36 ng/ml. . Značajno je odstupanje od referentnih vrijednosti 25-OH vitamina D u skupini žena (Studentov t-test, P = 0,01), i na cijelom uzorku ispitanika (Studentov t-test, P = 0,01), dok u skupini muškaraca nema značajnog odstupanja od referentnih vrijednosti. Postotak ispitanika koji su dostigli ciljanu vrijednost > 20 ng/ml iznosio je samo 28,8 %,od toga 44,4 % muškaraca i 15,6 % žena.

Godine 2016. na području Republike Hrvatske izdane su smjernice za prepoznavanje, liječenje i prevenciju deficita vitamina D, koje su u skladu preporukama Nacionalne zaklade za osteoporozu (engl. *National Osteoporosis Foundation*), Endokrinološkog društva (engl. *Endocrine Society*), Međunarodne zaklade za osteoporozu (engl. *International Osteoporosis Foundation*) i Američkog gerijatrijskog društva (engl. *American Geriatric Society*), a preporučena populacijska koncentracija vitamina D3 u krvi iznosila je 30 – 100 ng/ml, ovisno o metodi određivanja i laboratoriju (7). Srednja vrijednost vitamina D u ovom istraživanja iznosila je 16,36 ng/ml te je bila niža u odnosu na preporučene koncentracije iz smjernica.

Deficit vitamina D sve je češća pojava, a kod populacije proizlazi iz raznih uzroka, obuhvaćajući neadekvatno izlaganje sunčevoj svjetlosti ili neadekvatan unos hranom. U sklopu istraživanja Euronut-SENECA predstavljeni su rezultati za koncentraciju 25-OH vitamina D3 na području Europe, gdje je prosječna razina za južnu Europu iznosila 10 ng/ml,

dok je za sjevernu Europu ona iznosila 20 ng/ml. Deficit je češći u južnoj nego u sjevernoj Europi, a razlog visokih koncentracije vitamina D u sjevernoj Europi velika je konzumacija masne ribe i jetre bakalara, koja je ekvivalentna koncentraciji 400 IU vitamina D dnevno (32). Naši ispitanici imali su niže razine 25-OH vitamina D<sub>3</sub> zbog sezonskih varijacija, iako se u obzir može uzeti i prehrana jer je prema podacima Ministarstva poljoprivrede – Uprave ribarstva konzumacija masne ribe u Hrvatskoj vrlo niska (33). Maxwell je u svom istraživanju potvrdio Haddadovu tvrdnju iz 1973. godine koji je uočio postojanje sezonskih varijacija 25-OH vitamina D<sub>3</sub>, dok je za izlaganje sunčevoj svjetlosti ustanovljeno da je najvažniji faktor za sintezu i stvaranje zaliha vitamina D (34).

Tangpricha i dr. u svojem su istraživanju uočili da je 36 % muškaraca i žena u dobi od 18 do 29 godina na području Bostona, Massachusetts imalo deficit vitamina D krajem zime. Zaključili su da su dobivene razlike u koncentracijama 25-OH vitamina D<sub>3</sub> tijekom zime i ljeta nastale zbog toga što su većina ispitanika u ovom istraživanju bili studenti koji su duže vremena tijekom dana provodili u zatvorenom prostoru zbog nastave ili učenja (35). Rezultati našeg istraživanja usko su povezani s ovim istraživanjem jer su i u našem istraživanju većina ispitanika bili studenti koji su provodili većinu dana u zatvorenim prostorima zbog fakultetskih obveza.

U istraživanju sezonskih varijacija vitamina D, ovisno o dobi i spolu uočene su razlike u srednjim razinama 25-OH vitamina D<sub>3</sub> tijekom godine bez obzira na dob i spol, a kod žena uočena je niska razina 25-OH vitamina D<sub>3</sub> u odnosu na muškarce za vrijeme zimskog razdoblja (36). U istraživanju Montemayora i dr. žene su imale više razine 25-OH vitamina D<sub>3</sub> u odnosu na muškarce, a razina 25-OH vitamina D<sub>3</sub> bila je zamjetno niža u zimskom razdoblju u odnosu na ljetno (37). Rezultati studije provedene u Švedskoj pokazali su da su žene imale značajno više razine 25-OH vitamina D<sub>3</sub> u serumu od muškaraca (38). U našem istraživanju koncentracije su također bile niže u zimskom periodu u odnosu na preporučene vrijednosti gdje je ukupna srednja vrijednost iznosila 16,36 ng/ml. Muškarci su imali više razine 25-OH vitamina D<sub>3</sub> u odnosu na žene, gdje je srednja vrijednost za muškarce iznosila je 18,96 ng/ml, a za žene 14,16 ng/ml.

Pludowski i dr. u svom preglednom članku prikazuju rezultate brojnih istraživanja koncentracija vitamina D u Europi. Kod djece i mladih na području srednje Europe vrijednosti vitamina D u zimskom razdoblju kretale su se od 9 ng/ml do 23 ng/ml. Uočeno je da su se koncentracije vitamina D za sve dobne skupine krenule smanjivati početkom rujna, a povećanje koncentracija uočeno je krajem svibnja. Visoke koncentracije vitamina D povezane

su sa smanjenim rizikom za razvoj raka te zbog toga Pludowski smatra da se povećanjem koncentracija vitamina D iznad 40 ng/ml stopa smrtnosti na području Europe smanjuje za 15 % te da se životni vijek produžuje za 2 godine (39).

Povećane koncentracije 25-OH vitamina D3 povezane su sa smanjenim rizikom obolijevanja od multiple skleroze, a tome doprinosi unos vitamina D prehranom ili vitaminskim dodacima te provođenje vremena vani. Rizik za relaps kod multiple skleroze smanjen je pri koncentracijama 25-OH vitamina D3 u rasponu od 20 do 40 ng/ml. (24, 40, 41, 42). Svjetska zdravstvena organizacija također je utvrdila povezanost između raka debelog crijeva i deficita vitamina D pri koncentraciji 25(OH)D3 manjom od 12 ng/ml (43). Vitamin D može imati utjecaj na razvoj, napredovanje te prevenciju raka dojke. Deficit vitamina D povećava rizik za rak dojke kod žena prije i nakon menopauze, a učestalost se može smanjiti povećanjem koncentracije 25-OH vitamina D3 iznad 20 ng/ml (44). Većina znanstvenika u svojim je istraživanjima dokazala da visoke koncentracije vitamina D smanjuju rizik za razvoj dijabetesa tipa 2, ali dosad najveće randomizirano istraživanje Pittasa i dr. iz 2019. godine pokazalo je da se, iako su se koncentracije vitamina D povećale, učestalost dijabetesa između placebo skupine i skupine ispitanika s vitaminom D nije razlikovala (45). Uočena je povezanost niske razine vitamina D u serumu i pretilosti kod ljudi, odnosno da bi pretile osobe trebale uzimati veće doze vitamina D kako bi postigle iste razine vitamina D kao i vitke osobe (46). Martineau i dr. u svom su članku prezentirali pozitivan učinak suplementacija vitaminom D na prevenciju akutnih infekcija dišnog sustava (47). Ebi i dr. ispitivali su utjecaj sezonskih varijacija na zdravlje pojedinaca te su uočili da su na području Kalifornije hospitalizacije zbog virusne upale pluća svoj vrhunac dostigle tijekom zime. Preporučene koncentracije za sprječavanje akutnih respiratornih infekcija u zimskom razdoblju one su koje su postignute izlaganjem suncu u ljetnom razdoblju i iznose 50 ng/ml (48). Vitamin D ima važnu ulogu u regulaciji apsorpcije kalcija i fosfata te je zbog toga jedan od važnijih čimbenika u prevenciji i liječenju rahitisa i osteomalacije. Osteoporoza je bolest koja je povezana sa smanjenjem koštane mase, mineralizacijom kostiju te poremećajem u strukturi koji dovode do smanjenja čvrstoće te prijeloma kostiju. Kod osoba s koncentracijom 25-OH vitamina D3 < 12 ng/ml uočen je povećan rizik od prijeloma kuka ili kralježnice (43, 49, 50, 51, 52, 53, 54). Studija Vimalleswarana i dr. dokazala je da su povišene koncentracije 25-OH vitamina D povezane sa sniženim krvnim tlakom i smanjenim rizikom od hipertenzije (55). Najnovija istraživanja dovode do boljeg razumijevanja uloge vitamina D u etiologiji raznih bolesti te tako olakšavaju liječenje i prevenciju tih bolesti.

## 6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem i dobivenim rezultatima vezano uz koncentraciju vitamina D u muškaraca i žena u dobi od 18 do 28 godina u zimskom razdoblju utvrđeno je sljedeće:

- 1) Muškarci imaju statistički značajno više razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u odnosu na žene.
- 2) Ispitanici su imali značajno niže razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u serumu u odnosu na referentne vrijednosti i podatke iz literature. Značajno odstupanje od referentnih vrijednosti 25-OH vitamina D i podataka iz literature uočeno je u skupini žena i na cijelom uzorku ispitanika, dok u skupini muškaraca nema značajnog odstupanja.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s većinom istraživanja u kojima se analizira koncentracija vitamina D u zimskom razdoblju. Ograničenje naše studije manji je broj ispitanika. U nekoj idućoj studiji istraživanje je potrebno provesti na većoj populaciji te pratiti koncentraciju vitamina D tijekom dužeg razdoblja.



## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoje li razlike u koncentraciji 25-OH vitamina D3 kod ispitanika u dobi od 18 do 28 godina u zimskom razdoblju prema spolu te usporediti dobivene rezultate s referentnim vrijednostima i podacima iz literature.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje je provedeno na uzorku od 59 ispitanika, od čega je 27 (45,8 %) muškaraca i 32 (54,2 %) žene. Krv je izvađena te centrifugirana pri 3.000 okretaja tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja izdvojen je serum, a uzorak je analiziran metodom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) na analizatoru LCMS-8050.

**Rezultati:** Dobiveni rezultati pokazali su da muškarci imaju statistički značajno više razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u odnosu na žene. Srednja vrijednost koncentracije vitamina D u serumu za muškarce iznosila 18,96 ng/ml, a za žene 14,16 ng/ml. Značajno je odstupanje od referentnih vrijednosti 25-OH vitamina D uočeno je u skupini žena i na cijelom uzorku ispitanika (Studentov t-test,  $P=0,01$ ). Postotak ispitanika koji su dostigli ciljanu vrijednost ( $> 20$  ng/ml) iznosio je 28,8 %, od toga 44,4 % muškaraca i 15,6 % žena.

**Zaključak:** Muškarci su imali statistički više razine koncentracije 25-OH vitamina D3 u odnosu na žene. Značajno je odstupanje od referentnih vrijednosti 25-OH vitamina D uočeno je u skupini žena i na cijelom uzorku ispitanika. Kod ispitanika je uočen deficit 25-OH vitamina D3 u zimskom razdoblju, što je u skladu s podacima o vitaminu D koji se mogu pronaći u literaturi.

**Ključne riječi:** 25-OH vitamin D, deficit, zimsko razdoblje

## 8. SUMMARY

### **Vitamin D concentration in males and females aged 18 to 28 in winter period**

**Research objective:** The aim of this research was to examine whether there are differences in the concentration of 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> in subjects aged 18 to 28 by sex during winter and to compare the results obtained in this research with reference values and data from the literature.

**Subjects and methods:** The research was conducted on a sample of 59 subjects, of which 27 (45.8%) were male and 32 (54.2%) were female. The subjects' blood was extracted and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. After centrifugation, the serum was separated and the samples were analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS) using an LCMS-8050 mass spectrometer.

**Results:** Men were found to have statistically significantly higher concentrations of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> than women. Average concentrations of vitamin D in the serum were 18.96 ng/mL for men and 14.16 ng/mL for women. Significant deviation from the 25-OH vitamin D reference values was detected in the group of women and in the entire sample of subjects (Student's t-test,  $P=0,01$ ). The percentage of subjects who reached the target value ( $> 20$  ng/mL) was 28,8 %, of which 44,4 % men and 15,6 % women.

**Conclusion:** Men had statistically higher levels of 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> when compared with women. Significant deviation from the 25-OH vitamin D reference values was detected in the group of women and in the entire sample of subjects. A deficit of 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> during winter was observed in the subjects, which is in accordance with the data on vitamin D that can be found in the literature.

**Key words:** 25(OH) vitamin D<sub>3</sub>, deficit, winter period

**9. LITERATURA**

1. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
2. Stryer L, Berg J, Tymoczko J. Biokemija. 6. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
3. DeLuca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEY Reports*. 2014;3:479. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3899558/>
4. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CA, Hanley DA, Heaney RP. i sur. Evaluation, Treatment and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. July 2011;96(7): 1911–1930.
5. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull*. 2014;39(4):332-350. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288313/>
6. Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr J*. 2010;9:65. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019131/>
7. Vranešić Bender D, Giljević Z, Kušec V, Laktašić Žerjavić N, Bošnjak Pašić M, Vrdoljak E, i sur. Smjernice za prevenciju, prepoznavanje i liječenje nedostatka vitamina D u odraslih. *Liječnički vjesnik*. 2016;138:121–32.
8. Bikle D. Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action. *Endotext* [Internet]. 2017. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/>
9. Christakos S, Ajibade DV, Fechner AJ i Mandy LJ. Vitamin D: Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):243-253. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2879391/>.

10. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L i Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev.* 2016;96: 365–408.
11. Battault S, Peltier S, Whiting SJ, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: From science to health claims. *European Journal of Nutrition.* 2013;52(2):429-41.
12. Bhan I. Review article: Vitamin D Binding Protein and Bone Health; *International Journal of Endocrinology.* Volume 2014. Article ID 561214, 5 stranica. Dostupno na stranici: <https://www.hindawi.com/journals/ije/2014/561214/>.
13. Pilz S, Zittermann A, Trummer C, Theiler-Schwetz V, Lerchabum E, Keppel MH i sur. Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocr Connect* 2019;8(2): R27-R43. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365669/>.
14. Pike JW, Meyer MB. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(2):255-269. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2879406/>
15. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients.* 2016;8(3):135. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808864/>
16. Haussler MR, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominquez CE, Jurutka PW. The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *JBMR.* 1998;13(3):325-349. Dostupno na adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1359/jbmr.1998.13.3.325>
17. Guyton AC, Hall JE, Kukulja Taradi S, Andreis I. *Medicinska fiziologija.* 11. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
18. Sizar O, Givler A. Vitamin D Deficiency. *StatPearls [Internet].* 2019. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532266/>

19. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D Deficiency in Adults: When to Test and How to Treat. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(8):752-758. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912737/>
20. Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbanska M, Lukaszewicz J, Puldowski P, Jones G. Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:550. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158375/>
21. Mheid IA, Quyyumi AA. Vitamin D and Cardiovascular Disease Controversy Unresolved. *JACC.* 2017. Dostupno na adresi: <http://www.onlinejacc.org/content/70/1/89>
22. Kheiri B, Abdalla A, Osman M, Ahmed S, Hassan M, Bauchwa G. Vitamin D deficiency risk of cardiovascular diseases: a narrative review. *Clin Hypertens.* 2018;24:9. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6013996/>
23. Katičić D, Josipović J, Pavlović D. Vitamin D i srčanožilne bolesti. *Cardiologia Croatica,* Vol. 9; No. 5-6. 2014.
24. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol Ther.* 2018;7(1):59-85. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5990512/>
25. Wang H, Chen W, Li D, Yin D, Zhang X, Olsen N, Zheng SG. Vitamin D and Chronic Diseases. *Aging Dis.* 2017;8(3):346-353. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440113/>
26. Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, Urashima M. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes.* 2016;7(5):89-100. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781904/>
27. Somma CD, Scarano E, Barrea L, Zhukouskava VV, Savastan S, Mele C, Scacchi M, i sur. Vitamin D and Neurological Diseases: An Endocrine View. *Int J Mol Sci.*

2017;18(11):2482. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5713448/>

28. Gruber-Bzura BM. Vitamin D and Influenza-Prevention or Therapy? *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2419. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121423/>

Datum pristupa: 20.5.2019.

29. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene (engl. *Hyphenated techniques liquid chromatography-mass spectrometry: basic methodology and applications*). *Medicina Fluminesis.* 2009; 45; 218–232.

30. Korisnički priručnik: ClinMass®LC-MS/MS Complete Kit,25-OH-Vitamin D2/D3 in plasma and serum: automated on-line Analysis.

31. Shimadzu Corp. Application Handbook-Clinical.

Dostupno na adresi: <https://www.shimadzu.eu/>

Datum pristupa: 28.1.2019.

32. Lips P. Vitamin D status in Europe. International Osteoporosis Foundation. Dostupno na adresi: <https://www.iofbonehealth.org/>

Datum pristupa: 5.7.2019.

33. Ministarstvo poljoprivrede – Uprava ribarstvo: Izvještaj o konzumaciji ribe u Hrvatskoj. 2017. Dostupno na adresi:

[https://ribarstvo.mps.hr/UserDocsImages/Final\\_hrvatski\\_Eurofish\\_Izvje%C5%A1taj\\_Konzumacija%20ribe%20u%20Hrvatskoj\\_2017.pdf](https://ribarstvo.mps.hr/UserDocsImages/Final_hrvatski_Eurofish_Izvje%C5%A1taj_Konzumacija%20ribe%20u%20Hrvatskoj_2017.pdf)

Datum pristupa: 10.8.2019.

34. Maxwell JD. Seasonal variation in vitamin D. *Proceedings of the Nutrition Society.* 1994;53:533–543.

35. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D Insufficiency among Free-Living Healthy Young Adults. *Am J Med.* 2002;112(8):659-662. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3091001/>

36. Heidari B, Mirghassemi MB. Seasonal variations in serum vitamin D according to age and sex. *Caspian J Intern Med.* 2012;3(4):535-540. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755860/>
37. Montemayor LE, Castillo EC, Rodriguez-Lopez C, Villarrela-Calderon JR, Gomez-Carmona M, Tenorio-Martinez S, Nieblas B, Garcia-Rivas G. Seasonal Variation in Vitamin D in Association with Age, Inflammatory Cytokines, Anthropometric Parameters and Lifestyle Factors in Older Adults. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5719461. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618765/>
38. Klinberg E, Olerod G, Konar J, Petzold M, Hammarsten O. Seasonal variations in serum 25-hydroxy vitamin D levels in a Swedish cohort. *Endocrine.* 2015;49(3):800-808. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512566/>
39. Pludowski P, Grant WB, Bhattoa HP, Bayer M, Povoroznyuk V, Rudenka E, i sur. Vitamin D status in Central Europe. *International Journal of Endocrinology.* Volumen 2014, Article ID 589587. 12 stranica. Dostupno na adresi: <https://www.hindawi.com/journals/ije/2014/589587/>
40. Kampman MT, Brustad M. Vitamin D: A Candidate for the Environmental Effect in Multiple Sclerosis-Observations from Norway. *Neuroepidemiology.* 2008;30:140–146.
41. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol.* 2007;254:471–477.
42. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, Willet WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;62:60–65.
43. Bouillon R. Vitamin D and extraskeletal health. 2019. Dostupno na adresi: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
44. McDonnell SL, Baggerly CA, French CB, Baggerly LL, Garland CF, Gorham ED, i sur. Breast cancer risk markedly lower with serum 25-hydroxyvitamin D concentrations  $\geq 60$  vs  $< 20$  ng/ml (150 vs 50 nmol/L): Pooled analysis of two randomized trials and a prospective

cohort. PLOS ONE. 2018. Dostupno na adresi:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0199265>

45. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Sheehan P, Ware JH, Knowler WC, Aroda VR, i sur. Vitamin D Supplementation and Prevention of Type 2 Diabetes, *The New England Journal of Medicine*, 2019;381(6):520-530.

46. Mai XM, Chen Y, Camargo A, Langhammer A. Cross-Sectional and Prospective Cohort Study of Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Obesity in Adults: HUNT Study. *American Journal of Epidemiology*. 2012;10:1029-1036. Dostupno na adresi:  
<https://academic.oup.com/aje/article/175/10/1029/89477>

47. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P. i sur. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*. 2017;356:I6583. Dostupno na adresi:  
<https://www.bmj.com/content/356/bmj.i6583>

48. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*. 2006;134(6):1129-1140. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870528/>

49. Van den Bergh JPW, Bours SPG, Van Geel TACM, Geusens PP. Optimal Use of Vitamin D When Treating Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2011;9(1):36-42. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026680/>

50. Sunyecz JA. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(4):827-836. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2621390/#b52-tcrm-4-827>.

51. Geeds JA, Inderjeeth CA. Evidence for the Treatment of Osteoporosis with Vitamin D in Residential Care and in the Community Dwelling Elderly. *Biomed Res Int*. 2013;2013:463589. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766590/>



52. Cosman F, Beur SJ, LeBoff MS, Lwiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2014;25(10): 2359-2381. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176573/>

53. *International Osteoporosis Foundation.* Dostupno na adresi: <https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletaldisorders/osteoporosis/prevention/vitamin-d>.

Datum pristupa: 9.8.2019.

54. Rosen HN. Calcium and vitamin D supplementation in osteoporosis. 2019.

Dostupno na adresi: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).

Datum pristupa: 20.2.2019.

55. Larsen T, Mose FH, Bench JN, Hasen AB, Pedersen EB. Effect of Cholecalciferol Supplementation During Winter Months in Patients With Hypertension: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *American Journal of Hypertension.* 2012; 25(11): 1215–1222.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Jelena Šarić

**Datum rođenja:** 28. siječnja 1996.

**Mjesto rođenja:** Vinkovci

**Obrazovanje:** 2002. – 2010. Osnovna škola Zrinskih, Nuštar

2010. – 2014. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2014. – 2017. Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na  
Medicinskom fakultetu Osijek

2017. – 2019. Diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na  
Medicinskom fakultetu Osijek

**Kontakt:** saricjelena286@gmail.com

## 11. PRILOG

### INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

Poštovani,

pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem se ispituje koncentracija vitamina D u muškaraca i žena u dobi od 18 do 28 godina u zimskom razdoblju.

Voditelj istraživanja je Jelena Šarić pod mentorstvom Tatjane Bačun. Istraživanje će se provesti u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Istraživanje se provodi u svrhu izrade diplomskog rada.

Istraživanja su pokazala da koncentracija vitamina D ovisi o dobi, spolu, boji kože, prehrani, navikama te da postoje jake sezonske varijacije. Dosadašnji objavljeni podaci upućuju na veliko kliničko značenje vitamina D, kao i na učestalost deficita vitamina D u populaciji. Nedostatak vitamina D povezujemo s brojnim bolestima i to ne samo s bolestima kostiju, već i s autoimunim, kardiovaskularnim, malignim i neurološkim bolestima.

Na uzorku krvi neće pisati Vaše ime, već šifra koja omogućuje zaštitu Vaših osobnih podataka tijekom istraživanja. Uzorak Vaše krvi koji je uzet za analizu neće biti korišten u druge svrhe, a nakon analize bit će uništen.

Ovo istraživanje ne uključuje nikakve druge invazivne pretrage. Svi uključeni istraživači obavezuju se na potpunu zaštitu Vaših osobnih podataka te se Vaši osobni podaci neće pojavljivati niti u jednom drugom znanstveno-istraživačkom dokumentu.

Molimo Vas da pažljivo pročitate ovaj informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ispitivanje provodi i koji bi mogli biti rizici za Vaše zdravlje ako pristanete sudjelovati. U slučaju da ne razumijete bilo koji dio informiranog pristanka, molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču u istraživanju. Vaše sudjelovanje u ovom istraživanju je dobrovoljno i možete se povući u bilo kojem trenutku.

**Cilj istraživanja:** Istražit će se postoje li razlike u koncentraciji 25(OH)D kod ispitanika u dobi od 18 do 28 godina prema spolu. Dobiveni rezultati također će se usporediti s referentnim vrijednostima i podacima iz literature.

**Način provođenja istraživanja:** Ispitanicima će se uzorak krvi izvaditi u Kliničkom bolničkom centru Osijek tijekom travnja 2019. godine te će se uzorak zatim analizirati metodom tekućinske kromatografije na analizatoru LCMS-8050. Dobiveni rezultati usporedit će se međusobno (ispitivanje razlike u koncentraciji vitamina D između muškog i ženskog spola) te će se provesti usporedba dobivenih rezultata s referentnim vrijednostima i podacima iz literature.

**Mogući rizici sudjelovanja u istraživanju:** Postoji rizik od laganog krvarenja prilikom vađenja krvi ili nastajanja podljeva.

**Prednost ovog istraživanja:** Ovim istraživanjem dobit ćete uvid u vlastite koncentracije vitamina D te mogućnost korištenja rezultata istraživanja za poboljšanje vlastitog zdravlja.

**Zaštita identiteta sudionika:** Prikupljeni podatci o identitetu sudionika bit će poznati samo voditelju istraživanja te se neće objavljivati izvan istraživačkog konteksta.

**Istraživanje je odobreno od strane:** Odbora za završne i diplomske radove Medicinskog fakulteta Osijek.

**Dobrovoljno sudjelovanje:** Sudjelovanje u ovome istraživanju u potpunosti je dobrovoljno. Vaša odluka o tome želite li ili ne želite sudjelovati u ovom istraživanju ni na koji način neće utjecati na Vaše zdravlje. Ako se odlučite sudjelovati u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u istom.

Svojim potpisom potvrđujem da sam informiran/a o ciljevima, prednostima i rizicima ovog istraživanja i pristajem sudjelovati u njemu.

U Osijeku, \_\_\_\_\_ (datum).

\_\_\_\_\_  
Potpis sudionika

\_\_\_\_\_  
Potpis voditelja istraživanja