



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Оливера З. Миловановић**

**ПОПУЛАЦИОНА ФАРМАКОКИНЕТИКА  
25-ХИДРОКСИ ВИТАМИНА Д КОД СТУДЕНАТА**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2014. година**

Неизмерну захвалност упућујем свом ментору **доц. др Јасмини Миловановић** на стручној помоћи, саветима и огромној подршци током израде дисертације.

Искрену захвалност упућујем **проф. др Слободану Јанковићу** на стручним саветима, корисним сугестијама и подршци.

Захваљујем се колективу Клинике за ендокринологију Клиничког центра Крагујевац на подршци и разумевању, а анрочиту захвалност упућујем медицинској сестри Данијели Јовановић.

Велико хвала мојој породици, која је током целокупне израде дисертације била уз мене.

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	5
1.1. Историјски осврт на витамин Д.....	5
1.2. Хемијска структура витамина Д и његова синтеза.....	6
1.3. Фармакокинетика витамина Д.....	8
1.3.1. Апсорпција витамина Д.....	8
1.3.2. Дистрибуција витамина Д.....	9
1.3.3. Метаболизам витамина Д.....	10
1.3.4. Екскреција витамина Д.....	12
1.4. Процена статуса витамина Д у хуманом организму.....	12
1.5. Преваленца дефицијенције и инсуфицијенције витамина Д – дистрибуција у односу на старосну доб и географско подручје.....	15
1.6. Физиолошки ефекти витамина Д.....	17
1.6.1. Скелетни ефекат витамина Д.....	17
1.6.1.1. Улога витамина Д у минералној хомеостази.....	17
1.6.1.2. Улога витамина Д у „коштаном здрављу“ - рахитис, остеопороза.....	18
1.6.2. Нескелетни ефекат витамина Д.....	20
1.6.2.1. Улога витамина Д у превенцији карцинома.....	20
1.6.2.2. Улога витамина Д у превенцији кардиоваскуларних обољења.....	21
1.6.2.2.1. Улога витамина Д у регулацији хипертензије.....	22
1.6.2.2.2. Улога витамина Д у превенцији дијабетеса.....	23
1.6.2.3. Улога витамина Д у аутоимуним обољењима.....	24
1.6.2.4. Улога витамина Д у психичким обољењима.....	25
1.7. Популациона фармакокинетика.....	27
<b>2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>30</b>
2.1. Циљеви истраживања.....	30
2.2. Хипотезе истраживања.....	31
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>32</b>
3.1. Врста студије.....	32

3.2. Испитаници.....	32
3.3. Анализа крви.....	34
3.4. Биохемијске анализе.....	35
3.5. Фармакокинетичка анализа.....	36
3.6. Упитници- инструменти за процену анксиозности, депресивности, меморијског функционисања.....	39
3.6.1. Епидемиолошки упитник.....	39
3.6.2. Упитници за процену анксиозности.....	40
3.6.3. Упитници за процену депресивности.....	40
3.6.4. Упитници за процену меморије, когниције и памћења.....	41
3.7. Статистичка обрада података.....	42
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>44</b>
4.1. Изградња базног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д.....	44
4.2. Изградња пуног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д.....	45
4.3. Изградња коначног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д.....	47
4.4. Валидација добијеног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д.....	50
4.5. Основне карактеристике испитаника.....	52
4.6. Структура испитаника према студијском смеру и години.....	52
4.7. Статус витамина Д у испитиваној популацији.....	54
4.8. Присуство и степен анксиозности код студената.....	55
4.9. Присуство и степен депресивности код студената.....	55
4.10. Анализа меморије, когниције и памћења код студената.....	56
4.11. Анализа утицаја одређених фактора на ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д код студената.....	59
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>63</b>
<b>6. ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>77</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>78</b>

## 1. УВОД

### 1.1. Историјски осврт на витамин Д

Витамин Д је витамин из групе липосолубилних витамина који се уназад више деценија налази у жижи научних истраживања услед великог опуса ефеката који остварује у људском организму. Првобитна испитивања улоге витамина Д започета још почетком 20. века су указивала на значај овог витамина у минерализацији и развоју скелетног система, тј. превенцији губитка коштане масе и последичног настанка фрактура. Даљим спровођењем бројних експерименталних и клиничких студија у различитим популационим структура је доказана повезаност са другим патолошким стањима (Autier et al. 2014; Hossein-nezhad et al. 2013).

Прва сумња научника на постојање супстанце која може да спречи прогресију коштаног деформитета тј. рахитиса датира још од 1919. год. када је британски научник Edward Mellanby индуковао рахитис код паса хранећи их оброцима који нису садржали маст, млеко и хлеб и држећи их у затвореном простору. Даљим истраживањем Mellanby је утврдио да је превенција рахитиса могућа одређеним дијететским изменама, додавањем путера или још значајније рибљег уља. До сличног закључка је дошао Chick са својим сарадницима три године након Mellanby-ија радећи са потхрањеном децом у периоду након Првог светског рата. Најзначајнији период у открићу витамина Д уследио је 1922. год када је амерички биохемичар McCollum са сарадницима вршећи експеримент на пацовима оболелим од рахитиса показао да рибље уље садржи одређени фактор који утиче на превенцију и лечење рахитиса и доделио му назив витамин Д (Wolf, 2004; DeLuca, 2014).

Паралелно са претходно поменутих открићем немачки физичар Huldschinsky је 1919. год. утврдио корисно дејство излагања ултравиолетном зрачењу (УВ) деце оболеле од рахитиса. Наведена сазнања јако су заинтригирала научну јавност да прецизно детерминишу факторе који доводе до превенције и излечења рахитиса. Даљим радом на том пољу професор биохемије на Универзитету Висконсин у Медисону, Steenbock, је излагао УВ зрачењу и експерименталне животиње и њихову храну и долазио до позитивних закључака, тј. да у храни и кожи постоји одређена липидна фракција који под утицајем УВ зрака прелази у супстанцу која остварује терапијски ефекат. Hess-е, немачки физичар, са својим тимом 1925. год. поставља хипотезу да је супстанца која се активира под УВ зрацима можда холестерол а како би

доказао хемијску структуру тада непознате супстанце 1926. год. започиње сарадњу са Windaus-ом, немачким хемичарем, и Rosenheim-ом, биохемичарем из Лондона. Већ током 1926. год. након извршених експеримената показали су да испитивана супстанца није холестерол већ супстанца која је хемијски јако сродна холестеролу. Ову супстанцу означили су прекурсором витамина Д Структура витамина Д је остала непознаница још пар година након проналаска прекурсора витамина Д након чега је дефинисана структура витамина Д<sub>2</sub> а након четири године детерминисана је најпре структуру 7-дехидрохолестерола а затим је уследила и детерминација структуре витамина Д<sub>3</sub> (Wolf, 2004; DeLuca, 2014).

## 1.2 Хемијска структура витамина Д и његова синтеза

Витамин Д је секостеродни молекул. Под термином витамин Д подразумева се више различитих форми једињења који су деривати холестерола а од којих најзначајнији физиолошки ефекат остварују две форме: витамин Д<sub>2</sub> тј. ергокалциферол и витамин Д<sub>3</sub>, тј. холекалциферол (Јанковић, 2011). Ове две најзначајније форме витамина Д разликују се међусобно по хемијској структури, пореклу и биолошкој активности. Витамин Д<sub>2</sub> је „богатији“ за једну двоструку везу између угљеникових Ц атома на позицији 22 и 23 и једну метил групу на позицији Ц<sub>24</sub>. Поред структурне, разлика постоји и у пореклу, ергокалцифеол потиче од биљака док холекалциферол настаје у људској и животињској кожи након излагања сунчевој светлости тј. ултравиолетном зрачењу Б типа (УВБ) при распону таласне дужине ( $\lambda$ ) зрачења од 290 до 315 nm. Резултати спроведених студија су показали да услед постојећих структурних и метаболичких разлика холекалциферол показује ефекат који је 3 до 4 пута потентнији у односу на ефекат ергокалциферола (Vieth, 2005; Kimball et al. 2008). Особина витамина Д да поред егзогених поседује и ендогени извор чини га јединственим у групи витамина (German Nutrition Society, 2012). Витамин Д без икаквог нумеричког суфикса представљају холекалциферол и/или ергокалциферол (Moorthi et al. 2011). Квантитет витамина Д може бити изражен тежинским јединицама или ИЈ, при чему је потврђено да је 1 ИЈ витамина Д еквивалента 0,025  $\mu\text{g}$  (Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, 1997).

Након структурне идентификације витамина Д3 током 30. год. ХХ. века научна јавност је сматрала да витамин Д3 настаје директном реакцијом из 7-дехидрохолестерола (7-ДХЦ). Ова тврдња је побијена када је запажени да након излагања раствора 7-ДХЦ-а ултраљубичастом зрачењу на температури од 0° С не долази до издвајања витамина Д3 већ непознатог једињења које је тада названо превитамин Д3 (прехолекалциферол) (Holick, 2010). Поступно појашњење свих фаза етапног процеса синтезе холекациферола у кожи широј јавности изложено је 1980. год. од стране Holick-а са сарадницима (Holick et al. 1980).

Са хемијског аспекта посматрања након излагања 7-ДХЦ УВБ зрачењу долази до кидања везе између угљеникових (Ц) атома на позицији 9 и 10 и последичног формирања двоструке везе на позицији Ц10 и Ц19 тј. формирања превитамина Д3 (Vitamina D [editorial], 2008). Провитамин Д3, тј. 7 ДХЦ, се налази у свим слојевима коже при чему треба истаћи да је његова дистрибуција таква да се око 2/3 налази у епидермису а остатак у дермису. Након синтезе превитамина Д3 изомеризацијом под утицајем телесне температуре настаје витамин Д3 који је за разлику од превитамина Д3 термостабилан. Оптимална телесна температура за формирање витамина Д3 јесте 37 °С. Спроведена истраживања су показала да се током временског периода од приближно 8h чак 80% превитамина Д3 конвертује у витамин Д3 (Holick, 1995). Позитивна карактеристика превитамина Д3 је способност апсорбовања соларних УВБ фотона што као последицу код продуженог излагања УВБ зрачењу даје фотолитичку реакцију стварања биолошки неактивних продуката, лумистерола и тахистерола, услед чега не може доћи до прекомерне синтезе витамина Д3 и појаве токсичних реакција. Данас је познато да од укупне количине 7-ДХЦ у кожи око 15% се конвертује у превитамин Д3 (Wacker and Holick 2013a; 2013b).

Након синтезе у кожи, витамин Д3 прелази у екстрацелуларни простор одакле везујући се за витамин Д везујући протеин (DBP) бива процесом дифузије дистрибуиран у циркулацију. Мишићно и масно ткиво у одређеној мери представљају депо за синтетисани витамин Д током неког периода и у случају недовољне синтезе витамина Д може бити отпуштено из наведених депоа али подаци о количини витамина Д која се ту складишти нису још увек са сигурношћу прецизно дефинисани (Cipriani et al. 2014)

Синтеза витамина Д2 се састоји из идентичних етапа као и синтеза витамина Д3, при чему је полазна супстанца ергостерол који под утицајем УВБ зрачења подлеже

фотолитичкој реакцији при којој се формира превитамин Д<sub>2</sub> који је попут превитамина Д<sub>3</sub> термо-нестабилан и чијом изомеризацијом настаје витамин Д<sub>2</sub> (Wacker and Holick 2013a).

Три основна извора витамина Д, као што се из горе наведених механизма настанка може закључити, јесу прехранбени производи тј. храна која садржи витамина Д, излагање коже сунчевим зрацима и суплементи. Како већина нутритивних извора садржи витамин Д у траговима веома битан извор јесте људска кожа. Чак 80% серумске концентрације витамина Д јесте ендеогеног порекла. Како је сунце један од есенцијалних фактора у синтези витамина Д не тако ретко у литератури се може срести још један синоним за овај витамин а то је „витамин Сунца“. Храна која се издаваја по садржају витамина Д од других врста јесте путер, млеко, морска риба, рибље уље, жуманце, цигерица, печурке (Holick, 2007; Carbone et al. 2008; Wacker and Holick 2013b).

### **1.3. Фармакокинетика витамина Д**

Фармакокинетика витамина Д је данас позната захваљујући бројним студијама спроведеним са радиообележеним витамином Д<sub>3</sub> на основу чега је извршена детерминација апсорпције, дистрибуције, метаболизма и елиминације витамина Д и код животиња и код људи.

#### **1.3.1. Апсорпција витамина Д**

Процес апсорпије витамина Д, било да је унет путем хране или синтетисан у кожи, се одвија већински у проксималном делу танког црева. Услед липофилне структуре витамина Д неопходан фактор за апсорпцију јесте нормална жучна секреција тј. инкорпорирање неполарних молекула витамина Д у мицеле жучних соли након чега се могу нормално апсорбовати у течној фази. Апсорпција витамина Д је мултифакторијални процес, осим секреције жучних соли и мицеларног формирања зависи и од желудачне и панкреасне секреције, процеса дифузије кроз водене слојеве и мембрану четкастог покрива тј. транспорта из интестиналних ћелија. Мицеле жучних соли представљају агрегате жучних киселина са холестеролом и лецитином (Lo et al. 1985; Tsiaras and Weinstock, 2011).



Литературни подаци указују на смањење апсорпције витамина Д код пацијената са одређеним интестиналним обољењима као што су билијарна опструкција (Fisher et al. 2009), хронични панкреатитис (Duggan et al. 2012), инсуфицијенција јетре, цистична фиброза (Mailhot, 2012), Кронова болест (Avioli, 1967).

Први експериментални подаци о апсорпцији витамина Д вршени су на животињама, да би након тога уследила испитивања на хуманом организму (Heumann, 1937; Norman and DeLuca, 1963). Утицај интестиналног синдрома малапсорпције на апсорпцију витамина Д показао је Clifford са сарадницима у студији која је подразумевала једнократну суплементацију витамина Д<sub>2</sub> у дози од 50000 IU код 14 испитаника, при чему је након 24h серумска концентрација витамина Д код 7 здравих испитаника била изнад 50 ng/ml док је тај ниво код преосталих 7 испитаника који су имали дијагностикован неки од облика интестиналне малапсорпције био испод 10 ng/ml, што је указало на значајан степен смањења апсорпције витамина Д<sub>2</sub> (Lo et al. 1985). Студија која је испитивала апсорпцију витамина Д<sub>3</sub> је показала да је код здравих испитаника износила у опсегу од 62,4% до 91,3% док су код пацијената са малапсорпционим синдромом забележене вредности у опсегу од 0 до 47,6% (Thompson et al. 1966).

### **1.3.2. Дистрибуција витамина Д**

Егзогени витамина Д након апсорпције у танком цреву се преноси у лимфу, где је присутан у облику хиломикрона, путем које се преноси у циркулацију и везује за витамин Д везујући протеин (vitamin D binding protein- DBP- ДВП) путем чега се даље преноси у јетру. За разлику од егзогеног, ендогени витамин Д се након синтезе у кожи преноси путем крви до јетре помоћу везивних фракција. Транспорт ендогеног витамина Д се врши након његовог везивања за витамин Д везујући протеин, у великом проценту, и за албумине плазме, у знатно мањем проценту. Синоним за ДВП је ГЦ-глобулин. Концентрација албумина у циркулацији је и до 15 пута већа од концентрације ДВП (Radlovic et al. 2012; Holick, 2013; Kennedy et al. 2013). Витамин Д везујући протеин показује различите афинитете за сам витамин Д и његове метаболите, литературни подаци указују да афинитет опада посматрано од 25-хидроксивитамина Д преко 1,25-дихидроксивитамина Д до витамина Д (Dusso et al. 2005). Негативан утицај на ниво ДВП-а је показан код обољења јетре, нефротског синдрома и малнутриције а

насупорт томе позитиван утицај постоји током трудноће и естрогенске терапије (Dusso et al. 2005).

### 1.3.3. Метаболизам витамина Д

Метаболизам витамина Д се врши кроз два ступња који се дешавају у јетри и бубрезима. Метаболички пут обухвата две реакције хидроксилације које се одвијају у присуству ензима цитохрома П450 који функционишу као оксидазе. Одвијање реакција хидроксилације је од суштинског значаја за испољавање биолошких ефекат витамина Д услед стварања биолошки активних облика витамина Д из неактивних форми витамина Д<sub>2</sub> и Д<sub>3</sub> иако се након откривања витамина Д сматрало да је то биолошки активан облик који не захтева даљу трансформацију што је даљим истраживањем помоћу радиообележеног витамина Д<sub>3</sub> показало нетачном информацијом. Студија спроведена на свињама код којих је примењиван витамин Д<sub>3</sub> је хроматографском анализом крви животиња показала да постоји поларније једињење које је идентификовано као први метаболички продукт витамина Д (DeLuca, 1979).

Метаболизам витамина Д започиње у јетри хидроксилацијом у присуству митохондријалне 25 $\alpha$ -хидроксилазе, изоформе 27А1 цитохрома П450 (ЦИП27А1), на 25 Ц атому калциферола чиме се формира 25-хидрокси витамина Д (25(ОН)Д) тј. калцидиол или 25-хидроксихолкалциферол, који је такође биолошки неактивна форма. Дефинисање хемијске структуре и изолација 25(ОН)Д<sub>3</sub> је извршена од стране Blunta и сарадника 1968. године (Blunt et al. 1968; Kimball et al. 2008).

Иако је присуство 25-хидроксилазе највеће у јетри, треба напоменути да је доказано њено постојање и у кожи, бубрезима и цревима. Испитивања су показала да се карактерише кинетиком првог реда тј. интензитет хидроксилације је пропорционалан доступној концентрацији витамина Д. Од укупне количине синтетисаног и унетог витамина Д чак 75% се метаболише приликом првог проласка кроз јетру (Kimball et al. 2008).

Након формирања 25(ОН)Д везан за ДВП се транспортује у бубреге где се најпре филтрира и реапсорбује у проксималним бубрежним тубулима. Према доступним подацима доказано је присуство површинског ћелијског рецептора, мегалин-кубулин који олакшава процес ендоцитозе 25(ОН)Д везаног за ДВП коју врше како бубрежне ћелије тако и друге ћелије организма (Jones et al. 2014). У бубрезима се хидроксилацијом 25(ОН)Д у присуству 1 $\alpha$ - хидроксилазе (ЦИП27Б1) формира

поларније једињење 1,25-дихидроксивитамин Д (1,25(OH)<sub>2</sub>Д) тј. калцитириол који представља физиолошки активан облик витамина Д и на основу чијих физиолошких ефеката витамин Д се не класификује само као витамин већ и као хормон, што јесте још једна карактеристика која ово једињење разликује од других витамина. Хемијска структура калцитриола и његова изолација извршио је Holick са сарадницима 1971. године (Holick et al. 1971).

Реакције хидроксилације које се одвијају у јетри и бубрезима се осим по врсти ензима који су неопходни за њихову реализацију разликују и по условљености ендокриним механизмима. Формирање 1,25(OH)<sub>2</sub>Д у бубрезима се налази у негативној повратној спрези са паратиroidним жлездама тј. индуковано је паратиroidним хормон (ПТХ), хипокалцијемijом и хипофосфатемijом, док инхибиторни ефекат на синтезу показује хиперфосфатемija, фактор раста фибробласта 23 и сам 1,25(OH)<sub>2</sub>Д. Индуктивни и инхибиторни ефекат наведени фактори остварују мењањем интензитета активности ензима 1- $\alpha$  хидроксилазе. Реакција формирања про-хормона, 25(OH)Д, није ендокрино регулисана и зависи искључиво од присутне концентрације витамина Д унетог путем хране или синтетисаног у кожи (Hosseini-nezhad and Holick, 2013). Наведено својство калцидиола јесте један од разлога консензуса да се статус витамина Д у организму индивидуе процењује на основу концентрације калцидиола а не на основу концентрације калцитриола (Brandi and Minisola, 2013).

Експерименталним испитивањима је показано да поред реналне локализованости ензима 1 $\alpha$ -хидроксилазе она може да се детектује и у другим ткивима, остеобластима, плаценти, простати, кератиноцитима, макрофагима, Т-лимфоцитима, канцерогеним ћелијама, хипоталамусу, церебелуму и црној супстанци (*substantia nigra*) па и самој паратиroidној жлезди (Miller and Portale, 2000; Hosseini-nezhad and Holick, 2013). Подаци из студија спроведеним на животињама указују на постојање позитивног утицаја естрогена, прогестерона и пролактина на активност 1 $\alpha$ -хидроксилазе (Pike et al. 1978; Robinson et al. 1982; Spedding, 2014).

Осим поменутих 25 $\alpha$  и 1 $\alpha$ -хидроксилазе, у метаболизму витамина Д учествује и 24-хидроксилазом (ЦИП24А1) која је задужена за катаболизам оба метаболита витамина Д, при чему је показано да настају биолошки неактивни, хидросолубилни, метаболити попут билијарних метаболита, калцитронске киселине или 26,23-лактон и др. Други ензим који врши катаболичке реакције у јетри и танком цреву је ЦИП3А4 (Jones et al. 2014).

Иако су метаболички путеви ергокалциферола и холекалциферола подударни клиничка испитивања су показала контроверзне резултате у вези разлике у серумској концентрацији примарног метаболита, 25(ОН)Д, након њихове оралне ингестије. Резултати двонедељене студије у којој је прва група од 17 испитаника узимала 4000 IU ергокалциферола а друга од 55 испитаника исту дозу холекалциферола су показали да је примена витамина Д<sub>3</sub> довела до 1,7 пута већег пораста серумске концентрације 25(ОН)Д (Trang et al. 1998). Слично претходној студији, Armas са сарадницима је 2004. год, показао скоро троструку већу потентност витамина Д<sub>3</sub> са појединачном дозом од 50000 витамина Д<sub>2</sub> и Д<sub>3</sub> IU (Armas et al. 2004). Четири године након ове студије Holick са сарадницима у плацебо контролисаној студији која је трајала 11 недеља и у којој су испитаници у експерименталним групама примали дневно 1000 IU витамина Д<sub>2</sub>, 1000 IU витамина Д<sub>3</sub> или комбинацију од 500 IU витамина Д<sub>2</sub> и 500 IU витамина Д<sub>2</sub> износи резултате да не постоји статистички значајна разлика у серумском нивоу 25(ОН)Д (Holick et al. 2008).

Биолошки активан метаболит, 1,25(ОН)<sub>2</sub>Д, може да оствари свој ефекат тек након везивања за нуклеусни витамин Д рецептор (ВДР) путем чега бива транспортован до циљаног ткива у хуманом организму (Bikle, 2010).

#### **1.3.4. Екскреција витамина Д**

Витамин Д и његови метаболити излучује се већинским делом путем жучи и фецеса, док се један мањи део излучује путем урина (DeLuca, 1976). Експериментална студија која је испитивала метаболизам 24,25-дихидрооксивитамина Д<sub>3</sub> код паса је опсервирала да је 90% екскретованог метаболита детектовано у фецесу (Shimoyamada et al. 1997).

#### **1.4. Процена статуса витамина Д у хуманом организму**

Вишегодишњим радом научници су закључили да је серумска концентрација 25(ОН)Д најпоузданији маркер статуса витамина Д код појединца при чему су се сложили да је концентрација 25(ОН)Д одражава збир ендогено синтетисаног и егзогеног витамина Д било да је унет путе хране, обогаћених продуката или суплемената. Сумње које су постојале у вези релевантности детерминације

витаминоског статуса мерењем концентрације 25(OH)Д а не 1,25(OH)<sub>2</sub>Д су разрешене када је показано да синтеза калцидиола није ендокрино регулисана за разлику од синтезе калцитриола и да се карактерише знатно дужим временом полуелиминације које се креће у опсегу од 10 дана до око 3 недеље док је код калцитриола свега од 4 до 6h (Zerwekh, 2008). Литературни подаци указују на то да је концентрација 25(OH)Д и до хиљаду пута већа од концентрације активног метаболита, 1,25(OH)<sub>2</sub>Д (Holick, 2009). Серумска концентрација 1,25(OH)<sub>2</sub>Д није повољан индикатор за процену статуса услед постојања компензаторних механизма који у случају постојања дефицијенције витамина Д доводи до појачане синтезе ПТХ што резултује појачаном продукцијом 1,25(OH)<sub>2</sub>Д у бубрезима и тиме би постојећа дефицијенција била маскирана и неоткривена (Holick, 2004). Јединична вредност 25(OH)Д се може изразити као ng/ml или nmol/L при чему 1 ng/ml еквивалент 2,5 nmol/L (Nutritional and environmental medicine, 2010).

Како би се што прецизније дефинисао **пожељан** ниво серумске концентрације 25(OH)Д као граничне вредности првобитно су узете вредности које су превенирале остеомалацију и рахитис. У студијама појава рахитиса је везана за концентрацију 25(OH)Д која је < 25 nmol/L.

Иако је дуго испитиван витамин Д је стварао енигму научницима поводом детерминисања прецизних вредности које ће верификовати постојање дефицијенције, инсуфицијенције или суфицијенције код појединца.

Детерминисање концентрације 25(OH)Д која одваја „неадекватну“ (дефицијенција или инсуфицијенција) од оптималне концентрације најчешће је вршена уз праћење односа концентрације ПТХ и 25(OH)Д, уз већ познато постојање негативне корелације између ова два параметра. Инверзна корелација је доказана у студијама све до тачке када ниво 25(OH)Д достигне вредност од 75-100 nmol/L након чега следи стабилизација нивоа ПТХ до референтних вредности (Charuy et al. 1997; Holick et al. 2005; Lips, 2007).

Поред нивоа ПТХ да би се дефинисао пожељан ниво 25(OH)Д посматран је и пораст интестиналне апсорпције калцијума, што је једна од основних улога витамина Д у хуманом организму, при чему је запажено да тек када концентрација 25(OH)Д достигне опсег од 50 до 80 nmol/L долази до поспешивања апсорпције калцијума са 45 на 65% (Heaney et al. 2003).

До жељене концентрације дошло се и помоћу студије које су прочавале ефекат суплементације витамина Д на ПТХ код здравих одраслих испитаника који су примали витамин Д<sub>2</sub> у недељној дози од 50 000 IU током периода од осам недеља након чега су аутори закључили да је дошло до пада концентрације ПТХ за 35% код испитаника који су имали ниво 25(ОН)Д <20 ng/ml, након чега је предложено да тај ниво буде дефинисан као дефицијенција витамина Д (Malabanan et al. 1998).

Након вишегодишњих научних дебата и контраверзи о адекватном нивоу 25(ОН)Д који ће да одражава абнормалност већина еминентних стручњака је прихватила класификацију статуса витамина Д на основу следећих вредности: дефицијенција представља ниво 25(ОН)Д који је <20 ng/ml (50 nmol/l), инсуфицијенција је у опсегу вредности од 21 до 29 ng/ml (од 50 nmol/l до 75 nmol/l), док је суфицијенција праћена опсегом од 30 до 100 ng/ml (од 75 nmol/l до 250 nmol/l). Интоксикације витамином Д су детековане при нивоу 25(ОН)Д > 150 ng/ml (Holick, 2004; Dawson-Hughes et al. 2005; Pludowski et al. 2013; Weisman, 2013).

Препоруке америчког Института за медицину из 2010. год. су да дефицијенцијом витамина Д треба сматрати ниво 25(ОН)Д који је <20 ng/ml што је у складу са претходно предложеном референтном вредношћу (Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, 2010).

Препоруке Интернационалног удружења за остеопорозу су подударне претходним и пожељан ниво 25(ОН)Д је ниво > 30 ng/ml (Dawson-Hughes, 2010), до подударне вредности је дошао и Bischoff-Ferrari (2008) анализирајући резултате других студија.

Адекватност предложених нивоа концентрације 25(ОН)Д су оправдане спроведеним експерименталним и клиничким студијама које су доказале повезаност предложених нивоа са одређеним патолошким стањима. Feskanich са сарадницима је у проспективној студији типа „случај-контрола“ 2004. године показао да се ризик од настанка колоректалног карцинома код пацијената женског пола увећава чак неколико пута када је концентрација 25(ОН)Д испод 20 ng/ml (50 nmol/l) (Feskanich et al. 2004). Компаративне резултате показала је студија чији су резултати публиковани 2014. год. (Song et al. 2014). У студији спроведеној на Иранској популацији која је испитивала повезаност серумске концентрације 25(ОН)Д са појавом дијабетеса мелитуса типа 2 аутори су дошли до закључка да постоји инверзна корелација између

ова два параметра и да је концентрација  $25(\text{OH})\text{D} < 10 \text{ ng/ml}$  праћена значајним ризиком од настанка дијабетеса мелитуса тип 2 (Tohidi et al. 2013).

Постизање концентрације  $25(\text{OH})\text{D} > 80 \text{ nmol/l}$  је есенцијална не само за одржавање хомеостазе калцијума већ и за продукцију биолошки активног метаболита витамина Д услед утицаја на продукцију екстрареналне  $1\alpha$ -хидроксилазе (Holick, 2004).

### **1.5. Преваленца дефицијенције и инсуфицијенције витамина Д – дистрибуција у односу на старосну доб и географско подручје**

Појам дефицијенције и инсуфицијенције витамина Д датира од давнина, још из периода Индустијске револуције када са миграцијом становништва из села у град долази до развоја драстичних промена животног стила (Holick, 2007).

Дефицијенција и инсуфицијенција витамина Д попримају пандемијске размере широм света и може се срести у различитим старосним популацијама. Пандемијска појава дефицијенције витамина Д у многим крајевима није препозната и није адекватно третирана. Алармирајући податак је да тренутно у свету код 1 билиона људи постоји дефицијенција или инсуфицијенција витамина Д (Holick, 2007). Тачан проценат је јако тешко дефинисати собзиром да поједине лабораторије дефинишу дефицијенцију и инсуфицијенцију по критеријума различитим од већине других и поред договорених препоручених вредности за њихово дијагностиковање. Одређене старосне структуре као што су адолесценти, хронични болесници, труднице и старија популација могу имати значајне последице услед плејаде физиолошких ефеката витамина Д.

Иако је пол често несигнификанта варијабла за настанак дефицијенције/инсуфицијенције витамина Д спроведена истраживања говоре у прилог томе да се чешће јавља код особа женског пола што се донекле објашњава већим садржајем масти код жена што утиче на стварање депоа витамина Д у организму (Novserian et al. 2011).

Два основна узрочника настанка дефицијенције јесу недовољна изложеност сунчевим зрацима или неадекватан нутритивни унос витамина Д. Осим наведених бројним студијама је доказано да постоји велики број фактора који доприносе овој појави попут старости, типа коже, индекса телесне масе, географског подручја

становања, употреба крема за суначање са заштитним фактором и други (Engelsen et al. 2005; Engelsen, 2010; Tsiaras and Weinstock, 2011).

Дефицијенција у дечијем периоду је повезана са појавом рахитиса док је у периоду одраслих и старијих везана за појаву остеомаластије, остеопорозе и последично настанка фрактура. Постојање дефицијенције витамина Д се повезује са повећањем морбидитета за кардиоваскуларна, канцерогена, имунолошка, сихолошка и друга хронична обољења.

Висока преваленца дефицијенције витамина Д, од 50% до 97%, се према спроведеним студијама може наћи у земљама које се лоциране на нижим географским ширинама (Bandeira, 2006). Литературни подаци указују да код 30-50% деце и одраслих постоји ризик за настанак хиповитаминозе витамина Д (Holick and Chen, 2008).

Преваленца дефицијенције витамина Д је висока у земљама широм света у Италији преваленца у општој популацији износи 17%, у Шпанији 33.9%, Немачкој 50% док је у Великој Британији 87,1% (Carnevale et al. 2001; Нуррönen and Power, 2007; Hintzpeteter et al. 2008; González-Molero et al. 2011).

Тренутно доступни подаци указују на преваленцу дефицијенције витамина Д у обиму 20-100% код старије популације која живи у заједницама у САД-у, Канади и Европи (Holick et al. 2011).

У САД-у у периоду од 2001-2006 год. према извештају великог истраживања The National Health and Nutrition Examination Surveys преваленца дефицијенције витамина Д износила је чак 33%, дистрибуција серумске концентрације је била следећа: 8% популације старије од 1 године је имала ниво 25(ОН)Д < 30 nmol/l, 24% у распону 30-49 nmol/l, 67% у распону 50-125 nmol/l, а само 1% >125 nmol/l (Looker et al. 2011; Holick et al. 2012).

Извештај Интернационалног удружења за остеопорозу указује на учесталост присуства дефицијенције витамина Д на Европском подручју где је преваленца варијабилна а концентрација 25(ОН)Д < 25 nmol/l се среће код 2 до 30% одраслих, при чему је истакнуто да код геријатријске популације тај проценат показује тенденцију раста и до 75% (Mithal et al. 2009).

Присуство дефицијенције код младе здраве популације, старости 18-29 година, у Бостону, је показано код 36% испитаника на крају зимског периода током 1999. године (Tangpricha et al. 2002). Дефицијенција/инсуфицијенција витамина Д међу Европским



адолесцентима је такође висока, студија пресека која је обухватала адолесценте из десет Европских градова је показала да је ниво  $25(\text{OH})\text{D} < 75 \text{ nmol/l}$  имало скоро 80% испитаника док је ниво  $<50 \text{ nmol/l}$  забележен код 40% (González-Gross et al. 2012).

Према резултатима студије у Кореји, чак 58,6% деце је имало дефицијенцију витамина Д а 38,5% инсуфицијенцију, при чему је наведено да је преваленца дефицијенције на крају периода лето-јесен била мања у односу на крај зимског периода 43,1% и 75,1%, респективно (Chung et al. 2014). Резултати мултицентричне студије у Француској показују присуство дефицијенције код 37,5% деце на крају зимског периода (Mallet et al. 2014). Висока преваленца дефицијенције и инсуфицијенције забележена је и у Индијској дечијој популацији, 40.24%, 25.44%, респективно (Kumar et al. 2014).

Висока преваленца дефицијенције витамина Д забележена је код студената медицине у Саудијској Арабији и Шпанији (González-Padilla et al. 2011; Al-Elq, 2012).

Дефицијенција/инсуфицијенција витамина Д у трудноћи је честа појава па је према резултатима спроведених студија њена преваленца код трудница у Ирану 5,7%, Грчкој 19,5% , Индији 31% док је у Пекингу код чак 90% била присутна дефицијенција витамина Д (Nicolaidou et al. 2006; Salek et al. 2008; Sahu et al. 2009; Song et al. 2013).

## **1.6. Физиолошки ефекти витамина Д**

Број студија које показују ефекат витамина Д на хуманом или анималном моделу из дана у дан расте указујући широј јавности на велики значај овог нутритивног агенса. Физиолошки ефекат витамина Д се може поделити у две велике категорије а то су скелетни ефекат и ван скелетни ефекти.

### **1.6.1. Скелетни ефекат витамина Д**

#### **1.6.1.1. Улога витамина Д у минералној хомеостази**

Основна улога витамина Д у људском организму јесте одржавање хомеостазе калцијума и фосфора. Како су ова два минерала есенцијална за одржавање коштане минерализације то имплицира значај витамина Д у коштаном систему.

Услед неадекватног статуса витамина Д у организму апсорпција калцијума и фосфора унетог путем хране је оскудна, свега 10-15% и 60%, респективно, док је при

адекватном статусу апсорпција знатно ефикаснија, и то 30-40% калцијума се апсорбује и чак 80% фосфора. Током одређених периода када постоји повећана потреба организма за  $\text{Ca}^{2+}$ , као што је развој, гравидитет и лактација, може се апсорбовати чак 60-80% количине  $\text{Ca}^{2+}$  унете храном ако је статус витамина Д суфицијентан, тј. током поменутих периода концентрација циркулишућег  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  расте што се одражава и на степен апсорпције (Holick, 2004). Смањење серумске концентрације  $\text{Ca}^{2+}$ , који се најчешће дешава услед смањеног уноса путем хране, делује као окидач на паратиреоидне жлезде доводећи до секреције ПТХ који утиче позитивно на активност  $1\alpha$ - хидроксилазе имплицирајући повећање обима продукције калцитриола у бубрезима који се затим везује за ВДР и доводи до повећање апсорпције калцијума и фосфора из интестиналног тракта. Настали комплекс  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ - ВДР доводи до повећане експресије епителних  $\text{Ca}^{2+}$  канала и калцијум везујућег протеина. Лабораторијска испитивања су показала да ПТХ смањује уринарну екскрецију  $\text{Ca}^{2+}$  а поспешује уринарну елиминацију фосфора. Још једна особина ПТХ битна за коштани систем а која карактерише и  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  при малом уносу  $\text{Ca}^{2+}$  путем хране јесте њихов утицај на активацију остеобласти које доводе до формирања остеокласта из преостеокласта након чега остеокласти утичу на разарање коштаног матрикса доводећи до преузимања калцијума из коштаног депоа што може резултовати најпре појавом остеопеније која даљом прогресијом доводи до појаве остеопорозе и настанка прелома костију (Holick, 2004; 2007).

#### **1.6.1.2. Улога витамина Д у „коштаном здрављу“- рахитис, остеопороза**

Дефицијенција витамина Д, сходно горе неведеним ефектима на одржавању минералне хомеостазе, код деце у периоду раста и развоја доводи до појаве рахитиса док код одраслих изазива секундарни хиперпаратиреоидизам, остеомалацију и остеопорозу.

Прве информације о рахитису као коштаном обољењу које се јавља у дечјем узрасту датирају још од средине 17. века када је у Северној Европи примећено ово обољење након Индустријске Револуције (Holick, 2010). Edward Mellanby, британски научник, је међу првима показао забринутост услед велике преваленце рахитиса у Великој Британији, због чега ова болест добила познати епитет „Енглеска болест“. Након завршетка Индустријске револуције преваленца рахитиса је код деце у Северној

Европи је износила 90% док је у Бостону била 80%. У патолошком смислу рахитис се карактерише поремећајем раста, обликовања и ремоделовања док се остеомалација не карактерише деформацијом, осим у случају настанка фрактуре, услед завршетка процеса раста и обликовања костију, већ поремећајем у ремоделовању па је клинички и радиолошки теже препознатљива од рахитиса. Рахитис се највише манифестује на костима које су и интензивном расту, тако да зависно од старости детета симптоми и знаци могу варирати (Whyte and Thakker, 2013).

Остеопороза је често обољење које представља водећи здравствени проблем. Патологијски се карактерише губитком коштане масе и нарушавањем коштане микроархитектуре. На основу спроведених епидемиолошких истраживања сматра се да тренутно остеопорозу има дијагностиковано око 200 милиона људи широм света, при чему преваленца остеопорозе код жена старости од 60-70 год. је 33% а код старијих од 80 год. чак 66%. Европска Унија је за 2000. год. број остеопоротичних фрактура прерачунала на 3,79 милиона а директне трошкове на 32 билиона еура, услед тенденције раста преваленце остеопорозе очекује се да ће трошкови бити двоструки 2050. год. што указује на важност превенције овог обољења како у земљама у развоју, као што је наша, тако и у развијеним земљама (Reginster and Burlet, 2006).

Значај витамина Д у превенцији коштаних обољења испитиван је на различитим старосним популацијама. Мета-анализа која је испитивала ефекат и дозну зависност витамина Д са или без суплементације калцијумских препарат, код старијих пацијената, на појаву невертебралних фрактура и фрактура кука је указала на редукцију ризика од невертебралних фрактура за 29% а фрактура кука за 15% код примене високих доза витамина Д независно од примене  $Ca^{2+}$ , што подразумева минимум 400IU/дневно. Три године након објављивања ових резултата група истраживача на челу са Bischoff-Ferrari, који је ординирао претходном мета-анализом, долази до закључка да суплементација витамина Д у дози од 800 IU/дневно ефикасна у превенцији фрактура кука и невертебралних фрактура (Bischoff-Ferrari et al. 2009; 2012). Конфронтирајући подаци се могу срести у испитивањима ефекта суплементације витамина Д у знатно већим дозама (20000 - 50000 IU/недељно), што се може и очекивати услед постојања разлика у основним карактеристикама испитаника, тј. доза витамина Д која ће показати утицај на минералну густину костију је индивидуална (Rastelli et al. 2011; Steffensen et al. 2011).

Резултати студија пресека потврђују постојање корелације између нивоа 25(ОН)Д и минералне густине костију (БМД- bone mineral density) и инциденце фрактура, при чему је гранична вредност 25(ОН)Д за остваривање позитивне корелације са БМД варијабилна у опсегу од 20 ng/mL до 36 ng/mL (50 nmol/L - 90 nmol/L) у зависности од испитиване популације и географског подручја становања испитаника којима је одређивана БМД док је за негативну корелацију 25(ОН)Д и инциденце фрактура неопходна серумска концентрација 25(ОН)Д > 12 ng/mL (30 nmol/L) (Cândido and Bressan, 2014).

### **1.6.2. Нескелетни ефекат витамина Д**

Плејада ванскелетних ефеката витамина Д објашњава се присуством ВДР у већини ткива и органа у организму. Осим присуства ВДР једна од потенцијалних теорија за настанак овако широког спектра дејства је да, након што серумска концентрација 25(ОН)Д достигне вредност > 30 ng/ml, постоји довољно супстрата за локалну продукцију активног хормона, 1,25(ОН)<sub>2</sub>Д, у кожи, колону, простати, плућима и другим ткивима а данас је познато да наведени облик витамина Д врши инхибицију ћелијске пролиферације и индукцију терминалне диференцијације као и да поседује способност дешифровања генетских информација за више од 200 гена (Holick, 2008).

#### **1.6.2.1. Улога витамина Д у превенцији карцинома**

Канцерогена обољења су један од водећих узрочника морталитета у свету. Број дијагностикованих случајева се драстично увећава у свим крајевима света, а према подацима Светске Здравствене Организације (СЗО) за 2012. год. број оболелих је био 32,6 милиона популације старије од 15 год. док је само током 2012. год. број ново дијагностикованих случајева био 14,1 милион са леталним исходом код 8,2 милиона случајева што је значајно већи број о односу на 2008. год. када је било 12,7 милиона новорегистрованих а стопа морталитета износила 7,6 милиона. Најчешће дијагностиковани су канцер плућа, дојке, колоректални, простате са преваленцама 13,0%, 11,9% и 9,7%, 7,9%, респективно. Забрињавајући податак је да се до 2025. год. очекује 19,3 милиона ново дијагностикованих случајева сваке године (World Health Organisation, 2014).

Епидемиолошка испитивања о утицају сунчеве светлости на превенцију канцерогених обољења датирају још из 1936. год. што је 1942. год. Apperly потврдио уочивши да је смртност услед карцинома мања у сунчаним пределима САД-а а тек 1989. Garland са сарадницима доказује корелацију између 25(ОН)Д и ризика од канцера (Mohr, 2009). Тренутно доступни литературни подаци, из различитих студија типа случај-контрола, проспективних или ретроспективних, потврђују негативну корелацију између витамина Д, тј. изложености УВБ зрачењу и скоро 15 врста карцинома (Wacker and Holick, 2013). Објашњење за антиканцерогени механизам дејства витамина Д јесте да калцитриол путем ВДР-а регулише процесе пролиферације, диференцијације, апоптозе и ангиогенезе нормалних и малигнух ћелија (Laktasic-Zerjavic et al. 2011).

Ризик од карцинома дојке, једног од најчешћих облика овог обољења, се може смањити и до 58% при концентрацијама 25(ОН)Д >38 ng/mL (95 nmol/L) (Garland et al. 2007). Резултати опсервационе студије показују корелацију између серумске концентрације 25(ОН)Д и преживљавања код пацијената са канцером дојки, колоне, плућа и лимфома при чему је концентрација < 46 nmol/L у тренутку дијагностиковања праћена ниском стопом преживљавања, РР (релативни ризик) 1, за разлику од опсега концентрације 46–61 nmol/L, 62–81 nmol/L и >81 nmol/L, где су вредности РР 0,40-0,55; 0,34-0,61; 0,19-0,40 респективно за наведене серумске концентрације (Tretli et al. 2012). Ефекат суплементације показан је у двоструко слепој, плацебо контролисаној четворогодишњој студији код постменопаузалних жена где је употреба витамина Д3 у дози до 1100 IU/дневно са калцијумом у дози од 1400-1500mg/дневно показала смањење релативног ризика од канцера за око 60% (Lappe et al. 2007).

#### **1.6.2.2. Улога витамина Д у превенцији кардиоваскуларних обољења**

Кардиоваскуларна обољења су примарни узрочник смртог исхода у свету према извештају СЗО, 2008. год. летални исход је забележен код 17,3 милиона људи а претпоставља се да ће се до 2030. тај број увећати на 23, 3 милиона (World Health Organisation, Cardiovascular disease).

Присуство ВДР на ендотелу, васкуларним глатким мишићима и кардиомиоцитима омогућава антиатеросклеротични ефекат витамина Д услед инхибиторног ефекта на формирање пенастих ћелија и пролиферацију глатких

мишићних ћелија, експресије адхезионих молекула на ендотелним ћелијама и ослобађања инфламаторних медијатора.

#### **1.6.2.2.1. Улога витамина Д у регулацији хипертензије**

Протективни ефекат витамина Д у хипертензији се објашњава инхибиторним дејством на ренин-ангиотензин систем (РАС) у јукстаголруларном апарату бубрега и то нисходном регулацијом транскрипције гена за ренин од стране 1,25(OH)<sub>2</sub>Д тј. ВДР са лигандом, калцитролом, инхибира експресију ренина услед везивања за транскрипциони фактор цАМП (циклични аденозин монофосфат)-ЦРЕ-везујући протеин (Cyclic AMP-Response Element –CRE, ЦРЕ) онемогућавајући реналну транскрипцију. Поред утицаја на ренин, хипотензиван ефекат настаје и услед директног ефекта на васкуларне ћелије и метаболизам калцијума и првенције примарног хиперпаратиреоидизма (Pilz et al. 2009; Ajabshir et al. 2014). Наведени утицај 1,25(OH)<sub>2</sub>Д на ренин експериментално је потврдио Li са сарадницима на „knock-out” мишевима са дефицијенцијом ВДР-а (Li et al. 2002).

Према литературним подацима утврђена је негативна корелација између серумске концентрације витамина Д и висине крвног притиска (Schmitz et al. 2009). Примена витамина Д<sub>3</sub> у дози од 100000 IU/месечно током периода од 1,5 године код здравих одраслих пацијената је довела до снижења систолног и дијастолног крвног притиска за 0,6mmHg и 0,5mmHg, респективно, при вредностима 25(OH)Д >100nmol/L (Scragg et al. 2014), а примена истог облика витамина Д у дози од 33000 IU/двонедељно у краћем временском року, током три месеца, код хипертензивних пацијената довела је до значајне редукације систолног крвног притиска (СБП-SBP- systolic blood pressure) у односу на примену хипертензивне терапије, 7,5 и 3,6mmHg, респективно (Goel and Lal, 2011). Епидемиолошка студија у трајању од 8 недеља која је испитивала ефекат суплементације витамина Д у комбинацији са калцијумом на крвни притисак у односу на ефекат суплементације калцијума код старијих жена указал је на значај наведених суплементација на снижење систолног крвног притиска, при чему је комбинована суплементација витамина Д и калцијума изазвала већу редукацију систолног крвног притиска за 5,2% (Pfeifer et al. 2001). Резултати мета-анализе, спроведене од стране Wu-а и сарадника, која је обухватла четири рандомизирана, двоструко слепа, клиничка испитивања били су конзистентни са претходно поменути резултатима истичући да је

суплементација витамина Д доводила до пада вредности систолног крвног притиска за 2,44mmHg у односу на суплементацију калцијумом и плацебом, али без ефекта на снижење дијастолног крвног притиска у свим групама (Wu et al. 2010).

#### 1.6.2.2.2. Улога витамина Д у превенцији дијабетеса

Ефекат витамина Д у превенцији дијабетеса мелитуса заснован је на експресији ВДР-а на бета ћелијама панкреаса и стимулативном утицају калцитриола на секрецију инсулина, услед редукције инсулинске резистенције у мишићима, као и услед утицаја витамина Д на пораст ниво остеокалцина синтетисаног у остеобластима који повећава глукозну толеранцију стимулацијом синтезе инсулина у панкреасу и редукције инфламације која је присутна у инсулинској резистенцији.

Спроведена истраживања су показала да примена витамина Д може у одређеној мери да редукује ризик од настанка дијабетеса. Афирмативне резултате показала је опсервациона студија у Данској чији су 9841 испитаник били део великог истраживања под називом „Copenhagen City Heart Study“ која их пратила током периода од 29 година и који нису боловали од дијабетеса, а где су испитаници који су имали просечну вредност 25(ОН)Д < 12.5 nmol/L имали 22% већи ризик од настанка дијабетеса тип 2 у односу на испитанике где је серумска концентрација 25(ОН)Д  $\geq 50$  nmol/L, испитаници код којих је 25(ОН)Д  $\geq 75$  nmol/L су имали 8% мањи ризик обољевања у односу на испитанике код којих је 75 nmol/L  $\geq 25(ОН)Д \geq 50$  nmol/L (Afzal et al. 2013). До позитивног закључака дошао је и Shankar са сарадницима (Shankar et al. 2011). Позитивна корелација хиповитаминозе витамина Д и смањене инсулинске секреције и глукозне толеранције показана је у *in vivo* испитивању на анималном моделу (Cade and Norman, 1986). Употреба холекалцеферола у дози од 10000 IU недељно током 4 недеље код 11 пацијената са преддијабетесним статусом и серумском концентрацијом 25(ОН)Д  $\leq 30$  ng/mL довела је до смањења инсулинског одговора на глукозу и раста инсулинске сензитивности за 37% након третмана код 87,5% испитаника (Nazarian et al. 2011). Дупло слепа, рандомизирана, плацебо контролисана студија спроведена на 118 пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и витамин Д инсуфицијенцијом показала је да је осмонедељна комбинована примена витамина Д у дози 50000 IU/недељно и 1,000 mg/ дневно калцијума знатно ефикаснија у смањену нивоа инсулина и гликолизираног хемоглобина (HbA1c) у односу на ефекат примене појединачних

компоненти или плацеба (Tabesh et al. 2014). Наспрам претходно наведених позитивних резултата о утицају витамина Д на дијабетес мелитус суплементација витамина Д3 током 12 недеља у дози од 280 µg дневно током 2 недеље а затим 140 µg наредних 10 недеља као и мета анализа која је обухватала 35 студија нису показали позитиван ефекат примене витамина Д на глукозну хомеостазу и превенцију дијабетеса (Kampmann et al. 2014; Seida et al. 2014).

Претпоставка истраживача је да инконзистентност доступних података о ефектима витамина Д на дијабетес мелитус потиче услед релативно кратког временског трајања већине студија и услед малог броја испитаника, додатна мултицентрична испитивања могу пружити прецизније податке.

### **1.6.2.3. Улога витамина Д у аутоимуним обољењима**

Улога витамина Д у превенцији настанка и модификовању тока аутоimunих болести екпериментално је објашњена утицајем витамина Д на продукцију цитокина, смањење инфламације, индуковање имуних ћелија и утицаја на интеракцију између лимфоцита и антиген презентујућих ћелија. Витамин Д утиче на повећање квантитета Th2 лимфоцита и индукује пролиферацију дендритичних ћелија делујући имунорегулаторно и антиинфламаторно (Zhang and Naughton, 2010). Као што је претходно наведено ћелије имуног система врше екстрареналну продукцију 1,25(OH)<sub>2</sub>D који паракриним утицајем на Т и Б- лимфоците остварује имуномодулаторни ефекат. Прекомерена секреција калцитриола од стране макрофага, која није хормонски регулисана већ зависи од присуства супстрата, скопчана је са појавом нежељеног дејства, тј. Хиперкалцемије. Најчешће је испитиван утицај витамина Д на аутоимунa обољења попут дијабетеса мелитуса тип 1, мултипле склерозе, реуматоидног артритиса (РА) и Кронове болести (Antico et al. 2012).

Ефекат суплементације калцитриола на смањење прогресије РА показан је у *in vivo* испитивању на животињама (Cantorna, 1998).

Резултати кохортне студије спроведене од стране Kostoglou-Athanassiou и сарадника показују негативну корелацију између дефицијенције витамина Д и реуматоидног артритиса (Kostoglou-Athanassiou, 2012).

Код пацијената женског пола старости од 55-69 год. кохортним испитивањем је утврђена инверзна удруженост уноса витамина Д, путем хране и суплемената, и ризика



од РА, дневни унос у дози од  $\geq 467.7$  IU је праћен за 33% мањим ризиком од уноса у дози од  $< 221.4$  IU (PP=0,67) при чему сама суплементација витамина Д у дневној дози од  $\geq 400$  IU је праћена смањењем ризика PP=0,66, што истиче значај суплементације у редукцији ризика у односу на унос путем хране (Merlino et al. 2004). До компаративних резултата је дошао и Song са сарадницима 2012. год. вршећи мета анализу испитујући повезаност уноса витамина Д и ризика од РА (Song et al. 2012).

Негативну корелацију између серумске концентрације витамина Д и активности Кронове болести показао је Nam са сарадницима а Wingate је упоређивао ефекте суплементација витамина Д3 код деце са Кроновом болешћу у дневној дози од 400 или 2000 IU током 6 месеци подржава и закључио да је доза од 2000 IU повезана са бржим постизањем серумске концентрације  $25(\text{OH})\text{D} > 30$  ng/mL али да активност болести није под утицајем примењене дозе (Nam et al 2014; Wingate et al. 2014).

Тренутно доступни епидемиолошки и експериментални подаци показују да је хиповитаминоза витамина Д један од незаобилазних фактора ризика за мултиплу склерозу (Dudani et al. 2011). Mahon са сарадницима је у шестомесечној, рандомизираној, плацебо контролисаној студији закључио да примена витамина Д у дневној дози од 1000 IU утицала не са само на пораст нивоа витамина Д код испитаника са мултиплом склерозом ( $17 \pm 6$  ng/ml на почетку студије,  $28 \pm 8$  ng/ml након 6 месеци) већ и до пораста нивоа трансформишућег фактора раста (ТГФ)- $\beta 1$  који је антиинфламаторни цитокин (Mahon et al. 2003). Ниво  $25(\text{OH})\text{D} > 99.1$  nmol/L у проспективној студији типа случај контрола био је повезан са смањењем ризика од мултипле склерозе за 62% (Munger et al. 2006).

Мета-анализа коју је спровео Zipitis са сарадницима је показала да суплементација витамина Д код новорођенчади доводи до редукције ризика за настанак дијабетес мелитуса за 29% (Zipitis et al. 2008). Ризик од настанка дијабетеса тип 1 је скоро два пута већи код деце чије су мајке током трудноће имале серумску концентрацију  $25(\text{OH}) \leq 54$  nmol/L (Sørensen et al. 2012).

#### **1.6.2.4. Улога витамина Д у психичким обољењима**

Присуство  $1\alpha$ -хидроксилазе и ВДР-а у мозгу јесу фактори захваљујући којима витамина Д има улогу у развоју и физиолошком остваривању можданих функција.

Епидемиолошка испитивања спроведена на европској и америчкој популацији су показала корелацију хиповитаминозе витамина Д са слабљењем когнитивне функције,

при чему је отежавајућа околност за добијање реалне слике о постојећој ситуацији употреба различитих тестова за процену когнитивне функције и различити критеријуми за њено дијагностиковање (Lee et al. 2009; Soni et al. 2012; Brouwer-Brolsma et al. 2013; Wilson et al. 2014).

Серумска концентрација  $25(\text{OH})\text{D} \leq 46 \text{ nmol/L}$  током трудноће резултује поремећајем у говору код потомства (Whitehouse et al. 2012).

Присуство тешке дефицијенције витамина Д ( $25(\text{OH})\text{D} < 25 \text{ nmol/L}$ ) носи четвороструки ризик за настанак поремећаја когниције код Европљана старости 65 и више година, док је концентрација  $25 \text{ nmol/L} \leq 25(\text{OH})\text{D} < 50 \text{ nmol/L}$  праћена 1,4 пута већим ризиком у односу на популацију у суфицијентном статусу (Llewellyn et al. 2011) Мета анализе вршене током 2012. и 2013. год. указале су на статистички значајно смањење једне или више когнитивних функција или повећање инциденце деменција и Алцхајмера код пацијената са ниском серумском концентрацијом витамина Д (Balion et al. 2012; van der Schaft et al. 2013; ). Шестонедељна употреба витамина  $\text{D}_3$  у дневној дози од 5000 IU код младих одраслих испитаника није утицала на когнитивно и емотивно функционисање (Dean et al. 2011). Како су литературни подаци о ефекту витамина Д на когницију младих одраслих особа јако оскудни тек будућа опсежнија плацебо контролисана испитивања би могла да пружи релевантније информације.

Утицај витамина Д на депресију и анксиозност је испитиван у различитим популацијама. Антидепресивни ефекат витамина Д посредством ВДР-а остварује се услед утицаја на хипоталамусно-хипофизну-адреналну спрегу што последично регулише продукцију адреналина, норадреналина и допамина (Spedding, 2014). Корелација између анксиозности и витамина Д потврђена је у *in vivo* испитивању на *knock out* мишевима (Kalueff et al. 2004). Black са сарадницима је закључио да пораст серумске концентрације  $25(\text{OH})\text{D}$  за  $10 \text{ nmol/L}$  код младих одраслих мушкараца доводи до смањења скорa депресивности за 9% али да не постоји корелација са анксиозношћу и нивоом стреса (Black et al. 2014). Корелација између нивоа  $25(\text{OH})\text{D}$  и депресије је показана и у другим испитивањима али без значајног ефекат суплементације (Kjærgaard et al. 2012; Milaneschi, 2014). Код пацијената са депресијом препоручени терапијски опсег  $25(\text{OH})\text{D}$  је од 50 до  $85 \text{ nmol/L}$  (Maddock et al. 2013).

## 1.7. Популациона фармакокинетика

Настанак популационе фармакокинетике (ПФК) индукован је употребом лекова у клиничкој пракси који су показали велику варијабилност у терапијском одговору након примене препоручених доза и који се карактеришу малом терапијском ширином, као што су антиепилептици, антидепесиви, кардиотонички гликозиди, теофилин, поједини антибиотици, имуносупресиви и други (Миловановић и Јанковић, 2009). Иако прва научна спознаја о популационој фармакокинетички датира још из седамдесетих година XX века, након тог периода су уследила бројна усавршавања ове методе али и званично признање постулата популационе фармакокинетике од стране стручне јавности. Афирмативна улога популационе фармакокинетике у процесу развоја и терапијске примене неког лека је након вишегодишњих разматрања од стране државних регулаторних институција је уследила 1999. год. од стране Америчке управе за лекове и храну (ФДА) након објављивања „Водича за индустрију: популациона фармакокинетика“ (Food and Drug Administration, 1999; Williams and Ette, 2000). Данас је популациона фармакокинетика често коришћена метода у фармацеутској индустрији и то како у процесима клиничког испитивања лекова тако и њиховој клиничкој примени а употребљана је и од стране државних регулаторних агенција (Миловановић и Јанковић, 2005).

Основни циљ примене популационе фармакокинетике јесте откривање фактора тј. узрока варијабилности примењеног лека тј. супстанце код одређеног испитаника који може да буде из групе здравих добровољаца или пацијената оболелих од одређеног обољења при чему узроци варијабилности могу бити везани за сам лек или за испитаника (Aarons 1991; Aarons 1999; Williams & Ette, 2000). Фактори варијабилности везани за лек могу бити доза лека, формулација лека, интеракција између два или више лека док фактори варијабилности везани за пацијента могу бити генетичке, патолошке или физиолошке природе, као и сам стил живота појединца тј. његове навике у конзумирању одређених нутритивних и додатних супстанци као и демографски фактори. При свакој популационој фармакокинетичкој анализи тежи се да се открију и квантификују што већи број поменутих фактора који доводе до промене терапијског одговора примењене дозе супстанце тј. лека како би се смањила величина интериндивидуалне и интраиндивидуалне варијабилности. Интериндивидуалне варијабилности подразумева варијабилност фармакокинетичких параметара међу испитаницима у популационој групи тј. разлика у односу на средњу вредност и важан

је индикатор безбедности одређене супстанце а интраиндивидуалне варијабилности, која се другачије назива и резидуална грешка, представља варијабилности унутар истог испитаника и представља скуп неколико фактора попут грешака приликом одређивања концентрације лека, поузданост података добијених од испитаника, одабир адекватног модела за детерминисање фармакокинетице супстанце и део резидуалне необјашњиве варијабилности. Један од циљева популационе фармакокинетице јесте и процена интер- и интра- индивидуалне варијабилности. Индивидуални терапијски приступ настаје као исход процене и модификације интериндивидуалне варијабилности код испитаника употребом популационе фармакокинетице на основу само једног биолошког узорка што резултује безбеднијом и ефикаснијом применом одређене супстанце или лека у испитиваној популацији (Миловановић и Јанковић, 2005).

Популациона фармакокинетика врши процену и одређивање средњих вредности фармакокинетичких параметара у одређеној популацији. Од фармакокинетичких параметара најчешће се у овој врсти анализе одређују клиренс и волумен дистрибуције.

Оно што популациону фармакокинетику издваја од осталих метода јесте што се подаци који су ретки могу прикупити током рутинског клиничког рада са испитаницима, један узорак по испитанику, и уз употребу одговарајућих софтверских програма могу се добити клинички релевантне информације (Yukawa, 1999). Потреба за само једним узорком је знатно олакшала вршење фармакокинетичких испитивања у посебним популацијама као што су геријатријска, педијатријска, неонатолошка и друге где је вишеструко узимање узорка због специфичности наведених популација често онемогућавало спровођење анализа до краја (Миловановић, 2006). Узимање само једног узорка од испитаника за ову фармакокинетичку анализу није експлицитни захтев и у случају постојања могућности да се уради вишеструко узорковање од пацијента то ће допринети порасту квалитета анализе јер би тада интраиндивидуална варијабилност била реалније приказана и смањена услед прецизнијег и поузданијег прикупљања података и анализирања серумске концентрације испитиване супстанце. Репрезентативност популације испитаника је још једна предност популационе фармакокинетице услед већ познатих фармакокинетичких особености код различитих популација (Миловановић и Јанковић, 2007).

Популациони фармакокинетички модел се састоји од три следбене етапе које започињу најпре дефинисањем популације која се испитије и квантификовањем броја

испитаника након чега се овај корак наставља прикупљањем података неопходних за вршење анализе у одређеној популацији. Другу етапу представља развијање модела да би последњи корак била валидација коначног модела. Демографски подаци као и подаци о постојећој терапији и коморбидитетима се могу добити анамнестички од самих испитаника или хетеронамнезом.

Популациони фармакокинетички модел се најчешће добија употребом софтверског пакета под називом НОНМЕМ (NONlinear Mixed-Effects Modelling, NONMEM) тј. приступом нелинеарног моделовања комбинованих ефекта који су креирали Beal и Sheiner (1998. год) иако су доступни и други програми за спровођење популационих фармакокинетичких анализа (Aarons, 1999; Lindbom, 2004; Ette & Williams, 2004). Неке од суштинских карактеристика програмског пакета НОНМЕМ је да је написан у програмском језику Фортран и да је због тога употребљив на рачунарским системима који подржавају овај програмски језик као и да овај програм садржи сет субрутина које су у вези са субрутином која дефинише извршни фајл (Schoemaker & Cohen, 1996). Овај програмски пакет је специфичан и по томе што садржи велику библиотеку субрутина ПРЕДПП (PRED Population Pharmacokinetics) за одређивање модела за фармакокинетичку примену. Субрутина ПРЕД квантификује вредности опсервација на основу математичког модела и услед тога је добила назив од израза „prediction for observation”. У случају да постојећи модели не задовољавају потребе корисника добра страна је да се могу изменити или могу бити дефинисани од стране корисника (Миловановић и Јанковић, 2005).

Иако гледајући наведене информације о популационој фармакокинетичкој анализи она надмашује друге фармакокинетичке анализе у поузданости и ефикасности ова метода има одређене недостатке као што су велики број испитаника који је неопходан да би се постигла репрезентативност циљне популације а самим тим и одређени временски период како би се прикупили потребни подаци од испитаника. Још једна негативна страна ове методе јесте везана за сам софтверски пакет НОНМЕМ а то су цена пакета и не тако једноставан процес коришћења овог софтверског програма.

Према литературној претрази постојећих истраживања о фармакокинезици 25-хидрокси витамина Д тренутно нема доступних истраживања на тему популационе фармакокинетичке анализе 25-хидрокси витамина Д на младој, здравој, студентској популацији.

## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 2.1. Циљеви истраживања

Циљеви овог истраживања су:

1. Одређивање средњих, популационих вредности фармакокинетичких параметара (клиренса и волумена дистрибуције) 25-хидрокси витамина Д у популацији младих, здравих испитаника у Србији, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
2. Развијање популационог фармакокинетичког модела клиренса витамина Д и откривање и квантификација фактора који у значајној мери утичу на клиренс и интра- и интериндивидуалну варијабилност 25-хидрокси витамина Д у популацији младих, здравих испитаника у Србији, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
3. Испитивање корелације серумских концентрација витамина Д у популацији младих, здравих испитаника у Србији, студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу са постигнутим успехом на студијама, тј. просечном оценом оствареном током дотадашњег студирања.
4. Процена анксиозности, депресије, као и мишљења и меморије код испитиване популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу и утврђивање њихове повезаности са измереном серумском концентрацијом витамина Д у испитиваној популацији.

## 2.2. Хипотезе истраживања

Хипотезе овог истраживања су:

1. Одређивање средње, популационе вредности ФК параметара 25-хидрокси витамина Д у младој, здравој популацији студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу и одступање добијених вредности за фармакокинетичке параметре у односу на друге популације
2. Претпоставља се да значајан утицај на коначни фармакокинетички модел клиренса 25-хидрокси витамина Д у младој, здравој популацији студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу могу испољити просечна доза витамина Д унета храном и серумска концентрација фосфата.
3. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и оствареног успеха учења код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
4. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и анксиозности код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
5. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и депресивности код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
6. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и когниције (мишљена и меморије) код младе, здраве популације студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу.
7. Начин исхране повезан је са настанком хипо- или хипервитаминозе код испитиване популације.
8. Временски период изложености сунчевој светлости повезан је са настанком хипо или хипервитаминозе код испитиване популације.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Врста студије

Истраживање је спроведено као опсервациона, проспективна студија по типу серије случајева, у периоду од јуна 2012. до августа 2012.године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Спровођење истраживања је одобрено од стране Етичког одбора Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, под евиденционим бројем 0 1-958 од 08.02.2012. год.

#### 3.2. Испитаници

Популација испитаника је обухватала здраве добровољце из групе студената Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, старости од 19 до 30 година. Испитаници су били студенти са три различита студијска смера Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, фармације, медицине и стоматологије као и са различитих студијских година од 1 до 5. Сви испитаници су били упознати са студијским процедурама усменим и писаним путем а након потписивања формулара за Информативни пристанак испитаника су укључивани у студију.

У спроведеном истраживању је добровољно учествовало 86 испитаника, оба пола чије су основне карактеристике (пол, просечна старост и средња вредност индекса телесне масе (ИТМ)) представљене у табели 1.

**Табела 1. Демографски подаци испитаника**

Параметар		Испитаници
Пол	мушки	15 (17,44%)
	женски	71 (82,56%)
Старост (године) (Средња вредност±СД)		22.39±1.82
ИТМ (kg/m <sup>2</sup> ) (Средња вредност±СД)		21.31±2.69

СД- стандардна девијација



Критеријуми за укључење у студију су били: старост од 19. до 30. године живота, здраве особе без присуства акутних и хроничних обољења, избалансиран, мешовити режим исхране, не постојање промена начина исхране последњих 6 месеци. Искључујући критеријуми су били: употреба било којих витаминских суплемената или олигоелемената, придржавање специјалних дијететских режима исхране, гладовање, анорексија, употреба допинг средстава односно анаболика, употреба хормонских препарата, акутно или хронично хепатично или ренално обољење, хронична обољења попут респираторних (bronхијална астма, туберкулоза), ендокринолошких (дијабетес, хипо- или хипертиреодизам), неуролошких (епилепсија, мултипла склероза, тумори ЦНС-а, цереброваскуларна обољења), психијатријских (депресија, шизофренија), кардиоваскуларних (хипертензија, срчана инсуфицијенција, инфаркт миокарда), реуматског, имунолошког и гастроинтестиналног обољења, као и вирусних обољења, гравидитет и лактација, као и самоиницијативно одустајање испитаника од даљег учешћа у студији.

Временски период посматрања испитаника је био 30 дана. Током наведеног периода испитаници су водили Дневник исхране где су за сваки дан уносили прецизне податке о врсти, количини и времену конзумирања намирница у току дана као и податке о временском периоду излагања сунчевој светлости у току појединачног дана. Излагање сунчевој светлости је изражавано као број минута у току дана проведених на природној светлости. Количину нутријената или производа конзумирану у току дана испитаници су наводили у тежинским јединицама (g, mg, итд.) или „кухињским“ мерама (кашика, шоља итд.). На основу наведених информација из Дневника исхране је рачуната просечна унета доза витамина Д из хране и просечно излагање сунчевој светлости за сваког појединачног испитаника током периода посматрања. Истраживачи су током наведеног периода бележили временске прилике на територији Крагујевца, јер висока облачност или киша значајно смањују апсорпцију витамина Д. Садржај витамина Д у намирницама које су испитаници конзумирали су прерачунате на основу препорука америчког Националног нутритивног центра, одсека за пољопривреду (U.S. Department of Agriculture, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 2011), а за „готове“ производе количина витамина Д је рачуната према декларацијским наводима о садржају витамина Д у одређеној грамажи производа.

За сваког испитаника је одређиван тип коже коришћењем Fitzpatrick скале (Fitzpatrick, 1988).

### 3.3. Анализа крви

Након завршетка вођења дневника исхране испитаницима је вађена крв у Центру за ендокринологију, Клиничког центра Крагујевац. Сваком испитанику је у раним јутарњим часовима, око 7:00h, наште, венепункцијом узето по 20 ml крви. Од укупне количине узете крви за одређивање серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д је коришћен узорак крви од 5 ml који је центрифугиран 10 минута на 3000 обртаја након чега је издвојен серум и пребачен у полипропиленску епрувету за ХПЛЦ анализу. Остатак узорка крви је коришћен за биохемијску анализу.

Мерење концентрације 25(ОН)Д у серуму вршено је изократским ХПЛЦ (High Performance Liquid Chromatography) системом са УВ детектором у аналитичкој лабораторији Катедре за фармакологију и токсикологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Апаратура за ХПЛЦ анализу се састоји од Chrompack ISOS/GRAS пумпе (Chrompack, Middelburg, Netherlands), UV-VIS Chrompack детектора (Chrompack, Middelburg, Netherlands) и Spectra Physics 4600 Data Jet интегратора (Spectra Physics, San Jose, California). The Chromsystem реагенсни кит (порудбина-налог бр.38033) је коришћен за екстракцију на чврстој фази и одвајање према упутству произвођача при чему реагенсни кит обухвата, интерни стандард, контроле нивое (I и II), мобилну и стационарну фазу односно колону на којој се врши раздвајање (Meier, 2007). Поступак припреме узорка започињао је узимањем 500  $\mu$ l серума и 50  $\mu$ l интерног стандарда који су стављани у обележену бочицу која је држана ван домета светлости и кратко се вршило мућкање бочице, након тога је додато 500  $\mu$ l реагенса за преципитацију протеина, извршено вортексовање (тј. вртложно мешање) током 20 секунди да би затим бочица била остављена 10 минута на температури +4<sup>0</sup>С. Центрифугирање је вршено на 13000 обртаја у минути у трајању од 5 минута, а потом издвојени слој нанео на колону са чврстом фазом за екстракцију и поново центрифугирао 3 мин на 1500 обртаја у минути. Испирање је вршено наношењем 2 x 1 ml пуфера1 кроз колону и центрифугирањем 1 минут 1500 обртаја у минути, а потом је поново додато 75  $\mu$ l пуфера1 и центрифугирано 1 минут 1500 обртаја у минути. Бочица за прикупљање је промењена и додато је 200  $\mu$ l пуфера за елуацију у колону и центрифугирано 1 минут 1500 обртаја у минути. Прикупљање елуата је вршено у стакленим бочицама. Еулат је разблажен са 20  $\mu$ l дестиловане воде након чега је промешан. Запремина од 20  $\mu$ l

елуата ињектује се у ХПЛЦ систем, сепарација је вршена на аналитичкој колони са брзином протока од  $0,7 \text{ mlmin}^{-1}$ , при таласној дужини УВ детектора 265 nm, при температури аналитичке колоне приближно  $25^{\circ} \text{ C}$ . Ретенциони време 25-хидрокси витамина Д је било 4,2 минута док је граница квантификације износила  $1.4 \mu\text{g l}^{-1}$ . Интра- и интериндивидуална варијабилност је била  $< 3 \%$  и  $3.3\%$ , респективно (Erlenfeld, 2004).

### 3.4. Биохемијске анализе

Код испитаника је од биохемијских параметара одређиван ниво урее, креатинина, укупних протеина, калцијума и неорганских фосфата а од хормонских анализа ФТ4 (слободни тироксин), ТСХ (тиреостимулирајући хормон, тиреотропин), ПТХ (паратиреоидни хормон), анти-ТПО (антитела- тироидна пероксидаза).

Претходно наведени параметри су одређивани у биохемијској лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу и Центру за нуклеарну медицину, Клиничког центра у Крагујевцу. У табели 2 су наведене референтне вредности за посматране параметре.

**Табела 2. Референтне вредности биохемијских параметара**

Параметар	Референтне вредности
Уреа	3,0 - 8,0 mmol/l
Креатинин	49 – 106 $\mu\text{mol/l}$
Укупни протеини	64 – 83 g/l
Калцијум	2,20 – 2,65 mmol/l
Неоргански фосфати	0,80 – 1,60 mmol/l
ФТ4	7 – 18 pg/ml
ТСХ	0,3 – 5,5 mIU/l
ПТХ	8 – 70 pg/ml
Анти-ТПО	0 – 70 IU/ml

### 3.5. Фармакокинетичка анализа

Три основна дела сачињавају популациону фармакокинетичку анализу.

У првом делу ПФК анализе врши се **анализа података** која започиње прикупљањем великог броја података од испитаника, тј. студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Након прикупљања података анализа истих је вршена коришћењем ПФК програма НОНМЕМ (верзија 5, ниво 1.1, дупла прецизност) (Beal and Sheiner, 1998) из чије ПРЕДПП библиотеке коришћена субрутина АДВАН 1 што у процесу израде модела означава употребу једнопросторног модела тј. кинетику првог реда и без апсопрције тј. моноекспоненцијални модел за израчунавање средњих популационих вредности клиренса и волумена дистрибуције код младих, здравих студената као и израчунавање њихове интра- и интериндивидуалне варијабилности. Овај први корак у ПФК анализи карактерише дуготрајност услед прикупљања великог броја података од већег броја испитаника.

Незаобилазни део овог корака ПФК анализе јесте процена интериндивидуалне и резидуалне варијабилности клиренса у циљној популацији, што је вршено коришћењем одговарајућег адитивног или експоненцијалног модела грешке (Chan et al. 2001).

Адитивни модел:  $CL_{ij} = \bar{CL}_{ij} + \eta_j$

Експоненцијални модел:  $CL_{ij} = \bar{CL}_{ij} * \exp(\eta_j)$

Значење скраћеница:

$CL_{ij}$  - „i“-та вредност клиренса код „j“- тог испитаника

$\bar{CL}_{ij}$  - предвиђена вредност клиренса „j“- тог испитаника регресионом методом

$\eta_j$  - представља независну, случајну грешку са нормалном дистрибуцијом и варијансом  $\omega_{CL}^2$ .

Адитивни и експоненцијални модел су такође коришћени и за утврђивање интраиндивидуалне варијабилности тј. резидуалне грешке у концентрацији (Chan et al. 2001).

Адитивни модел:  $C_{ij} = \bar{C}_{ij} + \epsilon_{ij}$

Експоненцијални модел:  $C_{ij} = \bar{C}_{ij} * \exp(\epsilon_{ij})$

Значење скраћеница:

$C_{ij}$  – „i“-та измерена серумска концентрација 25-хидрокси витамина Д код „j“-тог испитаника

$\bar{C}_{ij}$  – одговарајућа предвиђена концентрација

$\epsilon_{ij}$  – независна, нормално дистрибуирана грешка (између предвиђених и измерених концентрација 25-хидрокси витамина Д) са варијансом  $\sigma^2$ .

У другом делу ПФК анализе се приступа **изградњи популационог фармакокинетичког модела** клиренса 25(ОН)Д. Ово је вишефазни процес и доста је сложенији од претходног корака.

Први корак у изградњи популационог фармакокинетичког модела је **изградња базног модела** коме се приступило након дефинисања популације и прикупљања свих неопходних података од циљне популације тако што су подаци уношени одређеним редоследом у НОНМЕМ програм. Редослед и број података у овој ПФК анализи је био:

- ИТМ - Индекс телесне масе испитаника
- ГОД - Старост пацијента
- ПОЛ - Пол испитаника
- ДД - Просечна доза витамина Д унета храном
- Ца - Серумски ниво калцијума код испитаника
- ПРО - Серумски ниво укупних протеина код испитаника
- ФОС - Серумски ниво фосфата код испитаника
- ТК - Тип коже испитаника
- СУН - Просечно излагање сунчевој светлости (<1 сата/ >1 сата)
- РИБА - Конзумирање рибе у исхрани испитаника ( да/не)
- ПУС - Конзумирање никотина (да/не)
- КАФА – Унос кофеина у току дана ( $\leq 3$  шољице кафе дневно/  $> 3$  шољице кафе дневно)

Након уношења наведених података употребом већ поменуте субрутинне АДВАН 1 из НОНМЕМ библиотеке добијена је процена типчних, средњих вредности  $CL$  и  $V_d$  (популациони параметри  $\Theta_1$  и  $\Theta_2$ ), процене варијанси ( $\omega^2$  за

интериндивидуалну варијабилност и  $B^2$  за интраиндивидуалну варијабилност) као и стандардне грешке. У овом делу се не испитује утицај коваријанти а добијени модел се назива базни модел.

Следећи корак у изградњи популационог фармакокинетичког модела представља *изградња пуног модела*. И овај корак има неколико подетапа које су међусобно повезане. Коваријанте које су испитиване, индекс телесне масе, пол, старост, просечан унос витамина Д путем хране, серумски нивои калцијума, фосфата и укупних протеина, тип коже, просечно излагање сунчевој светлости, конзумирање рибе, никотина и кафе укључиване су појединачно у базни модел и то на линеаран и нелинеаран начи, на тај начин је вршена униваријантна селекција. Исход униваријантне селекције је добијање већег броја униваријантних модела између којих је испитивано постојање статистичке значајности за сваку испитивану коваријанту. Истовремено укључивање појединачних коваријанти које су испуниле статистичке критеријуме доводи до формирања пуног модела. Употреба софтверског пакета даје процену утицаја појединачних коваријанти. Основни статистички критеријум у овим процесима јесте добијена односно процењена минимална објективна функција. Минимална вредност објективне функције (МОФ) се дефинише као негативни двоструки логаритам вероватноће података ( $-2 \log\text{likelihood}$ ,  $-2LL$ ) при чему је њена редукција од најмање 6.64 ( $\chi^2=3.841$  for  $p<0.01$ ,  $df=1$ ) била неопходна између базног и појединачних, униваријантних модела да би се утицај испитиване коваријанте сматрао статистички значајним (Sheiner and Beal, 1981).

Последњи део изградње популационог фармакокинетичког модела представља *изградња коначног модела*. Ова фаза је праћена одвијањем тзв. уназадне делеције током које је свака добијена коваријанта избацивана из пуног модела и при томе је поново процењивана статистичка значајност за сваку коваријанту. У односу на претходну фазу статистички захтеви су били ригорознији и тражена редукција МОФ-а за сваку посебну коваријанту је била више од 10.83 for  $p<0.001$ ,  $df=1$ . Након овога се врши селекција и само коваријанте које су задовољиле наведени услов су остале из пуног модела и образовале коначни фармакокинетички модел клиренса 25(ОН)Д у испитиваној популацији.

Осим редукције МОФ-а као статистичког критеријума у спроведеним корацима је било неопходно и испуњење следећих додатних услова:

- редукција у интер- и интраиндивидуалне (резидуалне) варијабилности
- побољшање распореда података представљених на графиконима који приказују однос између предвиђених (израчунатих) (PRED) *vs.* измерених (DV) концентрација калцидиола
- побољшање распореда података представљених на графиконима који приказују однос између вредности кориговане разлике (WRES) наспрам предвиђених концентрација калцидиола.

Трећи и завршни део популационе фармакокинетичке анализе јесте **валидација** финалног модела како би се извршила процена предиктивних перформанси и могућност за клиничку имплементацију добијених, крајњих фармакокинетичких модела клиренса 25-хидрокси витамина Д. Да би се извршила валидација употребљава се валидациони сет који представља контролну групу испитаника, тј. њихових података, који нису били укључени у процес изградње фармакокинетичког модела за клиренс 25-хидрокси витамина Д. Демографски и клинички значајни подаци испитаника из валидационог сета су приказани у табели 5. у делу Резултати. Предиктивне грешке (МПЕ, МСПЕ, РМСЕ) за процену биаса и прецизности коначног ПФК модела CL се, по предлогу Шајнера и Бела, израчунавају из овог сета података (Sheiner and Beal, 1981).

### **3.6. УПИТНИЦИ- ИНСТРУМЕНТИ ЗА ПРОЦЕНУ АНКСИОЗНОСТИ, ДЕПРЕСИВНОСТИ, МЕМОРИЈСКОГ ФУНКЦИОНИСАЊА**

#### **3.6.1. Епидемиолошки упитник**

Епидемиолошким упитником су од испитаника прикупљени подаци о полу, старости, телесној висини, телесној тежини, етничкој припадности, здравственом стању тј. присуству акутних и хроничних обољења, употреби лекова, просечном дневном конзумирање кафе, цигарета и алкохола. Путем епидемиолошког упитника су добијени и подаци о години уписа на студије, тренутној години студија, просечној оцени постигнутој током дотадашњег студирања, броју обновљених година као и подаци о години која је обновљена и броју колико је пута одређена година обновљена.

### 3.6.2. Упитници за процену анксиозности

За процену присуства и тежине анксиозности у испитиваној популацији студената коришћена су два упитника, Цунгова и Бекова скала за самопроцену анксиозности. Цунгова скала за самопроцену анксиозности садржи 20 питања у вези анксиозне симптоматологије где испитаник на свако питање може да одговори означавајући један од четири понуђена одговора која одражавају учесталост присуства одређених анксиозних симптома који су тако и скорирани на скали од 1 до 4. Укупан скор на скали се добија сабирање појединачних вредности одговора и може бити у опсегу од 20 до 80. Присуство и степен анксиозности се детерминишу на основу следеће расподеле скорa: скор 20-44 означава нормално стање без присуства анксиозности, 45-59 благу до умерену анксиозност, 60-74 озбиљну тј. значајну анксиозност док скор  $\geq 75$  означава екстремну анксиозност (Zung, 1971). Из претходно наведене расподеле скорa се може закључити да према Цунговој скали за процену анксиозности скор  $\geq 45$  означава присуство анксиозности. Бекова скала за процену анксиозности се састоји од 21 питања која су такође у вези анксиозне симптоматологије а на која испитаник бира један од четири понуђена одговора која се скорирају на скали од 0 до 3. Укупан скор који се добија сабирањем појединачних вредности одговора се креће у опсегу од 0 до 63. Категоризација тежине анксиозности према укупном скору је следећа: 0-7 минимални ниво анксиозности, 8-15 блага анксиозност, 16-25 умерена анксиозност, док скор 26-63 означава озбиљну тј. јаку анксиозност (Beck et al. 1988).

### 3.6.3. Упитници за процену депресивности

Процена присуства и степена тежине депресивности у циљној популацији вршена је употребом Цунгове и Бекове скале за самопроцену депресивности. Цунгова скала за самопроцену депресивности се састоји од 20 питања у вези депресивне симптоматологије на које испитаник одговара одабиром једног од четири понуђена одговора који су бодовани на скали од 1 до 4. Укупан скор скале добијен сабирањем појединачних одговора може бити на скали од 20 до 80, при чему скор од 20-49 не указује на присуство депресије код испитаника, 50-59 означава благу депресију, 60-69 умерену док скор  $\geq 70$  указује на присуство озбиљне депресије код испитаника (Zung, 1965). Бекова скала за самопроцену депресивности *BDI- IA* садржи 21 питање у вези



депресивне симптоматологије на које испитаник одговара одабиром једног од четири понуђена одговора која се скорирају на скали од 0 до 3 при чему укупан скор остварен сабирањем појединачних одговора може бити 0-63. Скор од 0-9 означава стање без постојања депресивности, 10-16 је благу депресију, 17-29 умерену депресију, 30-63 означава јаку депресију присутну код испитаника (Beck et al. 1961).

### **3.6.4. Упитници за процену меморије, когниције и памћења**

Детерминисање меморије, концентрације и памћења у испитиваној популацији је вршено употребом Упитника меморијског функционисања (Memory Functioning Questionnaire), Кратако преносивог упитника о менталном статусу (Short Portable Mental Status Questionnaire), Монреалске процене когниције (Montreal Cognitive assessment, MoCA) и Тестом перцепције разлике тј. тестом „Лица“. Упитник меморијског функционисања се састоји од 64 појмова за само процену свакодневне меморијске способности. Питања су структурирана тако да обухватају 7 сегмента тј. подскала а то су опште рангирање меморије, ретроспективно функционисање, фреквенцу заборављања, фреквенцу заборављања током читања, памћење прошлих догађаја, озбиљност тј. тежину заборављања и мненомичку употребу. Испитаник своје одговоре оцењује на седмостепеној Ликертовој скали при чему више вредности презентују позитивнији одговор у свим деловима осим у једној подскали где ниже вредности презентују позитивније резултате. Питања из упитника презентују четири домена: генералну фреквенцу заборављања, озбиљност тј. тежину заборављања, ретроспективну меморију и мнемоничку употребу. Генерална фреквенца заборављања обухвата 4 подскале: опште рангирање меморије, фреквенцу заборављања, фреквенцу заборављања током читања, памћење прошлих догађаја. Остала три домена обухватају по једну подскалу са истоименим називом. Висока вредност укупног сора презентује висок ниво самопроцењеног меморијског функционисања (Gilewski et al. 1990). Кратако преносиви упитник о менталном статусу се састоји од 10 питања на које испитаник треба да одговори у одређеном временском периоду без икаквих помоћних инструмената попут календар, сата и др. Структура питања је таква да се три питања односе на временску и просторну орјентацију, четири питања су у вези личних података испитаника, два су у вези тренутне политичке ситуације у испитаниковој земљи и једно питање је из области математике. Скорирање менталног статуса

испитаника помоћу овог упитника се врши на основу броја нетачних одговора. Процена менталног статуса је вршена на основу следеће класификације скова: 0-2 грешке означава интактно интелектуално функционисање, 3-4 грешке означавају благе интелектуалне сметње, 5-7 грешака умерене интелектуалне сметње, 8-10 грешака означавају тешке интелектуалне сметње код испитаника при чему код испитаника са високим образовањем је дозвољена једна грешка мање од наведених нивоа (Pfeiffer, 1975). Тест Монреалске процене когниције се састоји из осам различитих домена које пацијент треба да испуни у року од 10 минута. Осам домена које овај тест прати се детерминишу на основу способности алтернираног повезивања, визуелноконструкционе способности, именовања, меморије, пажње, понављања реченице, вербалне флуентности, апстраховања, одгођеног присећања и оријентације. Сабирање резултата за сваку од претходно наведених испитиваних способности скор на овој скали се креће од 0-30 при чему скор  $\geq 26$  означавају нормалну когницију а ниже вредности сугеришу на постојање смањења когнитивног функционисања (Nasrredinne. Montreal Cognitive assessment-MoCA, 2012) Тест перцепције разлике је конципиран тако да се састоји од 60 графичких елемената при чему се сваки елемент састоји од три лица са устима, очима, обрвама и косом где су два лица идентична а треће се по некој од наведених елемената која лица садрже разликује, од испитаника се очекује да у групи од три „лица“ препозна лице које се разликује и означи га прецртавањем. Временски период који је на располагању испитанику током којег треба да препозна што већи број различитих лица 3 минута. Скорирање се врши на основу бројања тачних одговора и креће се у опсегу од 0-60. Најнижи скор је када је број тачних одговора од 25-41, средња успешност означава скор 42-54, најбољи испитаници су имали скор од 55-60 (Глумбић и Ђорђевић, 2011).

### **3.7. Статистичка обрада података**

Подаци прикупљени и добијени спроведеним истраживањем су унети у компјутерску базу након чега су анализирани методама дескриптивне статистике уз одређивање мера централне тенденције (аритметичка средина) и стандардне девијације за континуиране варијабле а за категоричке варијабле су коришћене релативне фреквенце. Статистичка анализа је вршена помоћу SPSS софтверског пакета верзија 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US). Анализирање нормалности расподеле за

континуиране варијабле је вршено је помоћу *Kolmogorov-Smirno*-ов теста. У случају нормалне расподеле значајност разлике у континуираним варијаблама је испитивана параметријским Студентовим t тестом за две групе или анализа варијанси (ANOVA) за три и више група, код неправилне расподеле података коришћен је непараметријски Mann-Whitney-ев тест. Анализирање статистичке значајности категоријских варијабли вршено је употребом Pearson-овог  $\chi^2$  тест. Повезаност серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д са одређеним карактеристикама испитаника, животним навикама и оствареним скоровима на тестовима испитивања меморије, когниције и памћења испитивана је линеарном регресијом и корелацијом.

Статистичка значајност је постојала ако је  $p < 0,05$ . Добијени резултати су приказани табеларно и графички у делу Резултати.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

За спровођење овог истраживања прикупљени су подаци од укупно 86 студената Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Серумска концентрација 25-хидрокси витамина Д за потребе развијања популационог фармакокинетичког модела измерена је код 70 пацијената и то употребом аналитичких метода које су претходно детаљно наведене у делу Материјал и метод.

Валидациони сет је обухватио податке 16 испитаника чији подаци као што је претходно већ речено нису коришћени при ПФК анализи 25-хидрокси витамина Д у циљној популацији.

### 4.1. Израда базног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д

Израда базног модела, тј. модела без испитивања утицаја појединих фактора на клиренс 25-хидрокси витамина Д у испитиваној популацији вршена је одабиром субрутинe АДВАН1 из НОНМЕМ софтверског програма тј. употребом једнопросторног модела. Резултати испитиваних варијанси за модел су показали да експоненцијални модел грешке који описује интериндивидуалну варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина Д и резидуалну варијабилност је знатно бољи у односу на адитивни модел грешке у циљној популацији.

- ❖ Процењена средња вредност клиренса 25-хидрокси витамина Д је  $0,01 \text{ lh}^{-1}$
- ❖ Вредност минимума објективне функције је 383.468
- ❖ Интериндивидуална варијабилност је 37.68 %
- ❖ Интраиндивидуална варијабилност је 17.80 %
- ❖ Однос измерених и предвиђених серумских концентрација 25-хидрокси витамина Д базним моделом представљен је на графикону 1. (а)

#### **4.2. Изградња пуног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д**

Након добијања базног модела, свака од претходно поменутих 12 коваријанти је појединачно додавана у базни модел (на линеаран и нелинеарн начин) у циљу испитивања њеног утицаја на клиренс 25- хидрокси витамина Д. Током ове анализе добијени су многобројни, појединачни регресиони модели чије су вредности као и значајност утицаја сваке коваријанте представљена у Табели (Табела 2.). Резултати ове анализе показали су да само две коваријанте, просечан дневни унос витамина Д из хране и серумски ниво фосфата имају значајан утицај на клиренс 25-хидрокси витамина Д. Осталих 10 испитиваних фактора (индекс телесне масе, старост, пол, серумски ниво калцијума, серумски ниво укупних протеина, тип коже, просечно дневно излагање сунчевој светлости, конзумирање рибе, кафе и никотина) нису задовољиле потребан ниво статистичке значајности односно нису имале значајан утицај на клиренс испитиваног витамина.

Модели клиренса	МОФ	Разлике у МОФ-у	П-вредност **	Закључак
<b>БАЗНИ МОДЕЛ</b> $CL = \theta_1 * EXP(ETA(1))$	383.468			
<b>УНИВАРИЈАНТНИ МОДЕЛИ</b>				
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_3 * ИТМ$	383.468	0	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_4 * ГОД$	383.420	0.048	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_5 * ПОЛ$	381.778	1.69	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_6 * ДД$	314.252	69.216	<0.05	ДА
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_7 * Ца$	383.170	0.298	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_8 * ПРО$	383.379	0.089	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_9 * ФОС$	375.868	7.6	<0.05	ДА
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{10} * ТК$	383.264	0.204	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{11} * СУН$	382.750	0.718	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{12} * РИБА$	383.249	0.219	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{13} * ПУС$	382.513	0.955	>0.05	НЕ
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{14} * КАФА$	382.305	1.163	>0.05	НЕ
<b>ПУН МОДЕЛ</b> $CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_6 * ДД + \theta_9 * ФОС$			274.555	

**Табела 2.** Вредности МОФ-а у базном моделу, униваријантним моделима и пуном моделу за 25(ОН)Д.  $CL$  клиренс ( $lh^{-1}$ );  $\theta_1$  типична вредност  $CL$ ;  $ETA(1)$  интериндивидуална варијабилност  $CL$ ;  $\theta_3$  до  $\theta_{14}$  параметри коваријантних ефеката; ИТМ индекс телесне масе ( $kgm^{-2}$ ); ГОД године живота; ПОЛ при чему вредност 1 означава мушки пол а 0 женски; ДД просечан унос витамина Д из хране ( $\mu g$ ); Ца серумски ниво калцијума ( $mmol l^{-1}$ ); ПРО серумски ниво укупних протеина ( $gl^{-1}$ ); ФОС серумски ниво

фосфата ( $\text{mmol l}^{-1}$ ); ТК тип коже има вредност 0 за тип коже 2 и вредност 1 за тип коже 3; СУН има вредност 0 за дневно излагање сунчевој светлости мање од 1h и вредност 1 за излагање дуже од 1 h; РИБА има вредност 0 за не конзумирање рибе и вредност 1 за конзумирање ;ПУС има вредност 0 за непушаче и 1 за пушаче; КАФА има вредност 0 за конзумирање  $\leq 3$  шољице кафе дневно и вредност 1 за конзумирање  $> 3$  шољице кафе дневно.

\*\*P- вредност: статистичка значајност за МОФ разлику између базног и тестираног модела

### 4.3. Изградња коначног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д

Процесом уназадног избацивања коваријанти из пуног модела уз строжије статистичке критеријуме, наведене у делу Материјал и метод, изграђен је коначан популациони фармакокинетички модел за клиренс 25-хидрокси витамина Д.

- ❖ Коваријанте које су из пуног модела испољиле утицај на клиренс 25-хидрокси витамина Д у студентској популацији су: просечан унос витамина Д из хране и серумски ниво фосфата.
- ❖ Коначан модел који је изграђен и који описује вредност популационог клиренса 25-хидрокси витамина Д у зависности од специфичних карактеристика испитаника је:

$$\text{КЛИРЕНС (Lh}^{-1}\text{)} = 0.0711 + 0.738 * \text{ДД} + 0.618 * \text{ФОС}$$

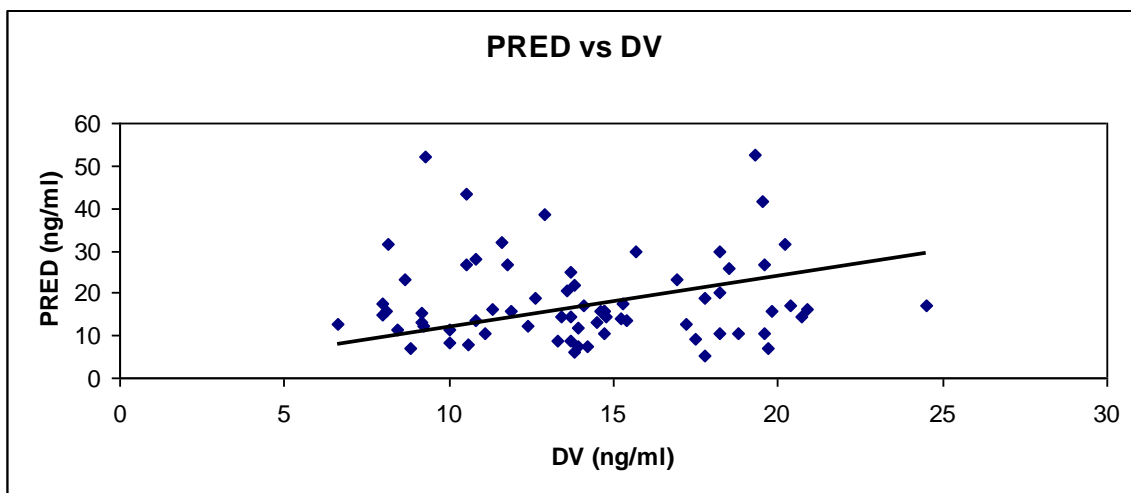
- ❖ Вредност минимума објективне функције добијеног, коначног модела је 274.555
- ❖ Интериндивидуална варијабилност је износи 27.401 %
- ❖ Интраиндивидуална варијабилност износи 10.61 %
- ❖ Сви популациони фармакокинетички параметри добијени за 25-хидрокси витамина Д у финалном моделу су приказани у табели 3.
- ❖ Однос измерених и предвиђених серумских концентрација 25-хидрокси витамина Д коначним моделом приказан је на графикону 1. (б)

**Табела 3.** Процене параметара коначним моделом за 25-хидрокси витамин Д у студентској популацији

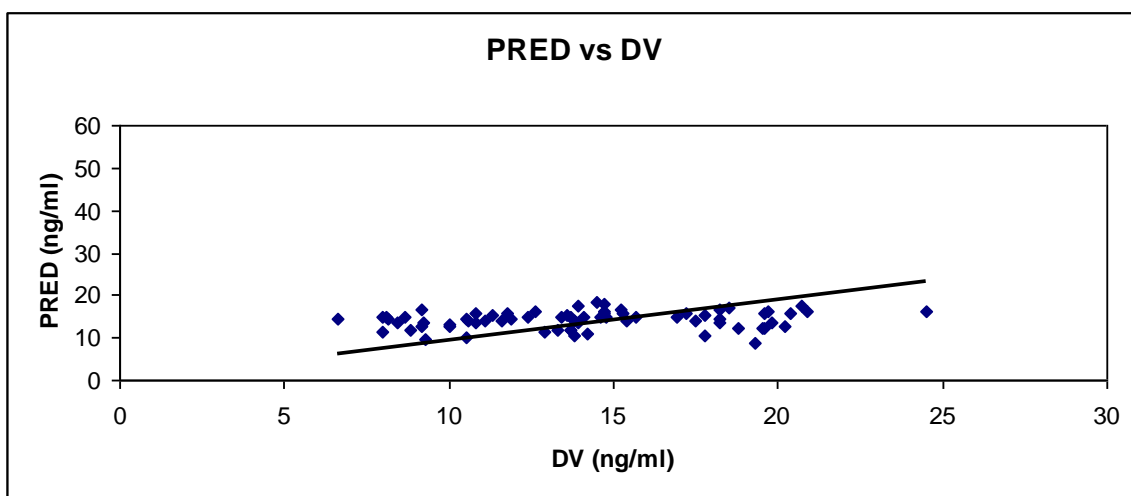
Параметри модела	Процењена вредност	Стандардна грешка (95% интервал поверења)
Клиренс ( $l\ h^{-1}$ ) - $\theta_1$	0.0711	0.0293 0.0137 – 0.1285
Волумен дистрибуције (l) – $\theta_2$	23.6	4.0 15.76 – 31.44
Ефекат ДД – $\theta_3$	0.738	0.134 0.475 – 1.001
Ефекат ФОС – $\theta_4$	0.618	0.131 0.361 – 0.875
Интериндивидуална варијанса CL - $\omega^2_{CL}$	0.0724	0.0157 0.0416 - 0.1032
Варијанса резидуалне грешке - $\sigma^2$	0.0112	0.0022 0.0069 – 0.0155



а)



б)



**Графикон 1.** а) Однос предвиђених (PRED) и измерених концентрација (DV) 25-хидрокси витамина Д у базном моделу у циљној популацији; б) Однос предвиђених (PRED) и измерених концентрација (DV) 25-хидрокси витамина Д коначним моделом у циљној популацији.

#### 4.4. Валидација добијеног ПФК модела 25-хидрокси витамина Д

Процес валидације ПФК модела за клиренс испитиваног витамина подразумева процену предиктивних перформанси добијеног коначног регресионог модела на валидационом сету. Контролна група на којој је вршена валидација је обухватила 16 испитаника, а њихови демографски и други релевантни подаци су приказани детаљно у табели 5.

Резултати спроведене валидације представљени су:

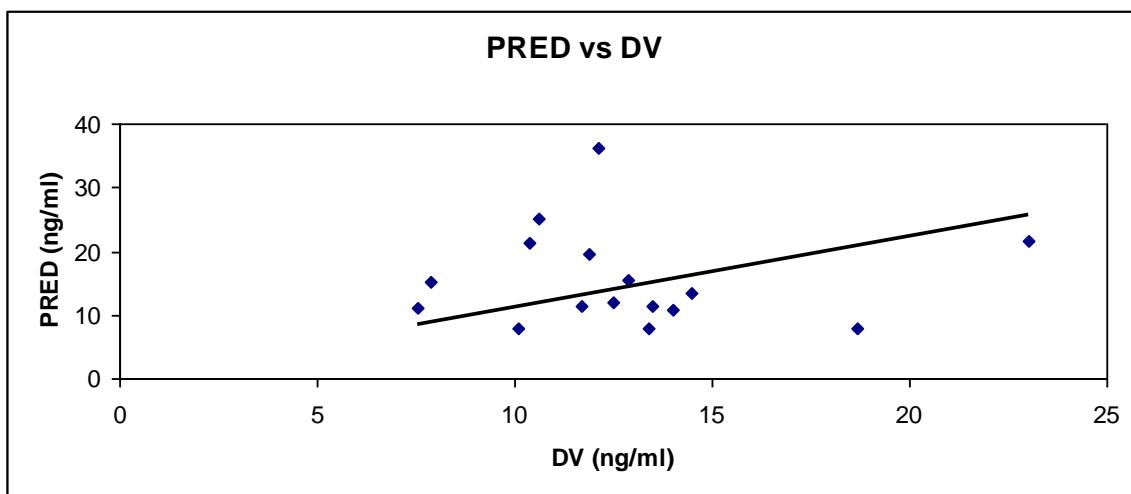
- ❖ графичким приказом који показују однос измерених и предвиђених концентрација 25-хидрокси витамина Д у базном и коначном моделу (графикон 2.)
- ❖ табелерно (Табела 4.) кроз израчунате предиктивне грешке.

Биас је израчунат кроз средњу предиктивну грешку (МПЕ), док је прецизност процењена путем средње квадратне предиктивне грешке (МСПЕ) и корен средње квадратне грешке (РМСЕ).

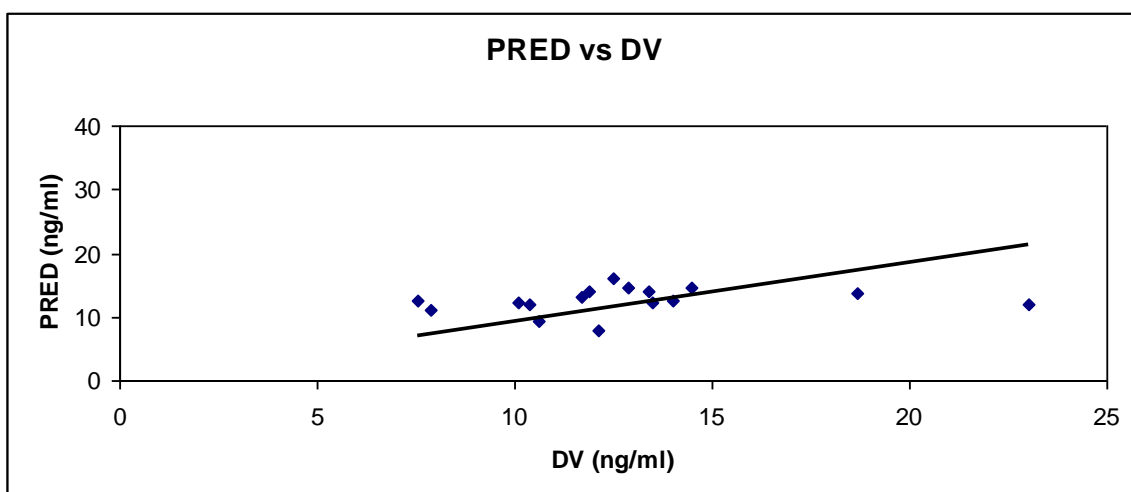
**Табела 4.** Предиктивне грешке и њихови интервали поверења за коначан модел 25-хидрокси витамина Д

Грешка	Коначни модел
МПЕ	-0.11 (-0.084 – 2.05)
МСПЕ	14.79 (0.58 – 29.07)
РМСЕ	3.85 (0.76 – 5.39)

a)



б)



**Графикон 2. а)** Однос предвиђених (PRED) и измерених (DV) концентрација 25-хидрокси витамина Д базним моделом валидационог сета у циљаној популацији

**б)** Однос предвиђених (PRED) и измерених (DV) концентрација 25-хидрокси витамина Д коначним моделом валидационог сета у циљаној популацији

#### 4.5. Основне карактеристике испитаника

Дистрибуција пола, просечна старост, стање ухрањености, серумски ниво 25-хидрокси витамина Д, лабораторијски параметри, нутритивне и животне навике као и тип коже испитаника укључених у ову популациону фармакокинетичку анализу приказани су у табели 5. И у испитиваном и у валидационом сету је већа заступљеност учесника женског пола, 82,86% и 81,25%, респективно. Просечна старост испитаника се налазила у границама младе, одрасле животне доби и то са нормалном телесном ухрањеношћу.

**Табела 5.** Демографске карактеристике и структура испитаника основног модела и валидационог сета

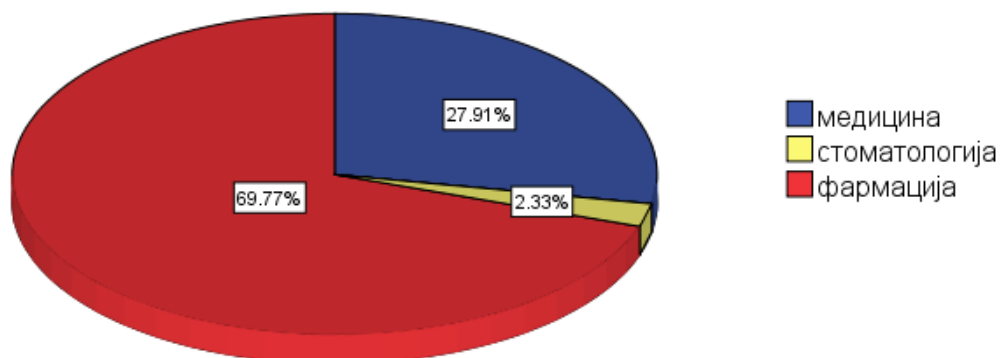
Параметар	Испитивани сет ± СД (распон)	Валидациони сет ± СД (распон)
Број испитаника	70	16
Број опсервација	70	16
Пол (мушки/женски)	12/58	3/13
Индекс телесне масе ( $\text{kgm}^{-2}$ )	21,31±2,69 (16,82-30,66)	21,18±2,08 (17,15-24,43)
Старост (године)	22,39±1,82 (19-27)	22,81±2,51 (20-30)
Пресечан унос витамина Д из хране ( $\mu\text{g}$ )	1,55±0,87 (0,46-4,47)	1,8±0,89 (0,89-4,2)
Серумска концентрација 25-хидрокси витамина Д ( $\text{ngml}^{-1}$ )	14,13±4,05 (6,63-24,48)	12,80±3,80 (7,55-23,02)
Серумски ниво калцијума ( $\text{mmol l}^{-1}$ )	2,42±0,15 (1,43-2,62)	2,43±0,10 (2,21-2,65)
Серумски ниво фосфата ( $\text{mmol l}^{-1}$ )	1,35±0,18 (0,9-1,84)	1,33±0,19 (1,03-1,72)
Серумски ниво укупних протеина ( $\text{gl}^{-1}$ )	73,64±3,99 (62-83)	75,63±3,52 (70-83)

Тип коже (тип 2/ тип 3)	18/52	2/14
Трајање просечног излагања сунчевој светлости (<1h / >1h)	19/51	6/10
Конзумирање рибе (да/не)	32/38	10/6
Конзумирање никотина (да/не)	13/57	2/14
Унос кофеина (>3 шољице кафе дневно/≤3 шољице кафе дневно)	5/65	2/14

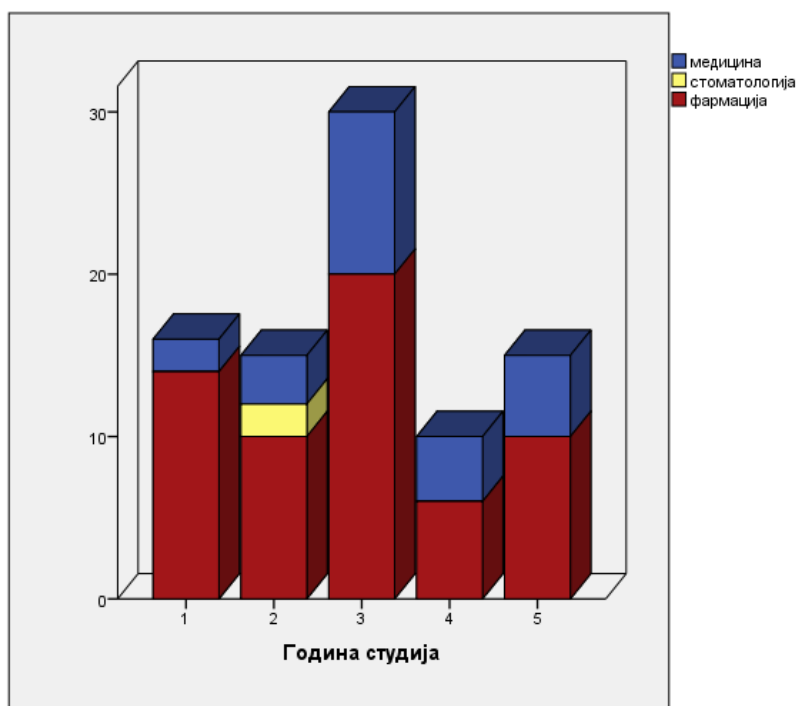
#### 4.6. Структура испитаника према студијском смеру и години

Истраживање је обухватило студенте од 1 до 5 године Факултета медицинских наука у Крагујевцу при чему је највећи број испитаника био на студијском смеру фармације (60), мањи медицине (24) и најмањи број на смеру стоматологије (2). (графикон 3. и 4.).

**График 3.** Дистрибуција испитаника према смеру студирања



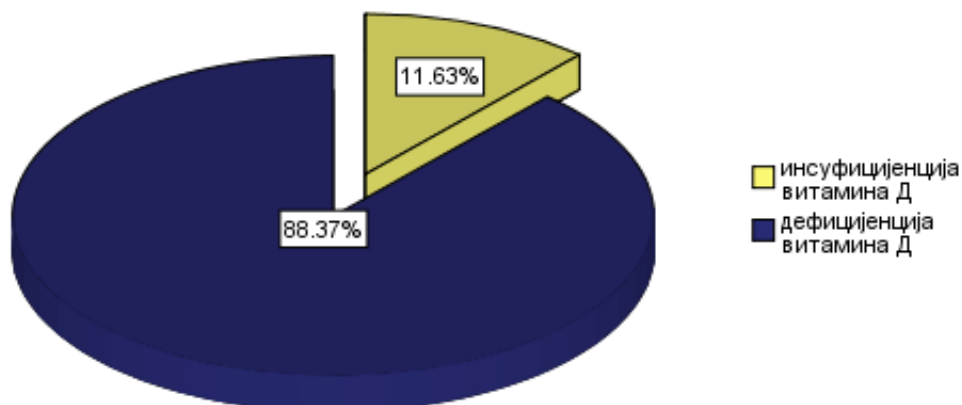
**Графикон 4.** Дистрибуција испитаника према смеру и години студирања



#### **4.7. Статус витамина Д у испитиваној популацији**

У испитиваној студентској популацији није било испитаника који су имали суфицијентан ниво витамина Д процењен на основу серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д. Дефицијенција витамина Д је забележена код највећег процента испитаника (76 испитаника) док је инсуфицијенција била присутна код мањег броја (10 испитаника) што се види на графику 5. Просечна вредност 25(ОН) у испитиваној популацији је била  $13,26 \pm 4,86$  ng/ml. Није било статистички значајне разлике у статусу витамина Д између полова ( $\chi^2=0,024$ ,  $p=0,821$ ).

**График 5.** Структура статуса витамина Д у испитиваној популацији



#### **4.8. Присуство и степен анксиозности код студената**

Према Цунговој скали за самопроцену анксиозности само 2 испитаника (2,3%) је било анксиозно, док код осталих 84 (97,7%) испитаника анксиозност није била присутна. Испитаници су имали благу до умерену анксиозност. Просечан скор анксиозности код испитаника са анксиозношћу је  $53,5 \pm 0,70$ , док је просечна вредност анксиозног скорa на целокупном узорку испитаника  $30,67 \pm 0,69$ . Разлика у анксиозности према скору на Цунговој скали у односу на годину студија није била статистички значајна ( $\chi^2=3,888$ ,  $p=0,421$ ). Резултати Бекове скале за процену анксиозности показују да код највећег дела испитаника, њих 40 (46,5%), није била присутна анксиозност док је блага анксиозност била присутна код 37 (43%) испитаника, умерена код 7 (8,1%) а тежак степен анксиозности код 2 (2,3%) испитаника. Просечан скор анксиозности код испитаника са анксиозношћу према Бековој скали је био  $12,24 \pm 4,66$ , а у укупном узорку испитаника  $8,81 \pm 5,21$ . Није била присутна статистички значајна разлика у анксиозном скору према Бековој скали између испитаника са различитих година студија ( $\chi^2=4,864$ ,  $p=0,302$ ).

#### **4.9. Присуство и степен депресивности код студената**

Присуство депресивности у испитиваној популацији према Бековој скали за процену депресивности је забележено код 9 (10,46%) испитаника док код 77 (89,54%) није забележена депресија. Од 9 испитаника који су имали позитиван депресиван скор,

код 4 испитаника је забележена блага депресија а код преосталих 5 умерени тип депресије. Просечан скор на Бековој скали код депресивних испитаника је износио  $16,78 \pm 4,23$ , док је скор у укупној испитиваној популацији био  $4,30 \pm 4,93$ . Kruskal Wallis-овим  $\chi^2$  тестом није утврђена статистички значајна разлика у погледу самопроцењеног степена депресије између студената различитих година студија ( $\chi^2=5,769$ ,  $p=0,217$ ). Депресивност према Цунговој скали је показана код 3 (3,5%) испитаника који су имали благу депресију са просечним скором  $52,67 \pm 1,53$  док је скор за Цунгову скалу депресивности у укупном узорку био  $33,24 \pm 6,36$ . Попут Бекове скале депресивности и за Цунгову скалу за самопроцену депресивности употребом Kruskal Wallis-овог  $\chi^2$  теста није утврђена статистички значајна разлика у погледу самопроцењеног степена депресије између студената различитих година студија ( $\chi^2=3,174$ ,  $p=0,529$ ).

#### **4.10. Анализа меморије, когниције и памћења код студената**

Просечна вредност укупног скорa Упитника меморијског функционисања у испитиваном узорку је био  $323,41 \pm 47,80$ . Минамална, максимална и просечна вредност, као и медијана скорa 4 домена, тј. подскале, која овај тест испитује приказани су у табели КЛ. Између студената различитих студијских година није постојала статистички значајна разлика у скору следећих домена Упитника меморијског функционисања: Генерална фреквенца заборављања ( $\chi^2=6,446$ ,  $p=0,168$ ), Озбиљност заборављања ( $\chi^2=9,317$ ,  $p=0,055$ ), Ретроспективна меморија ( $\chi^2=1,350$ ,  $p=0,853$ ) док је за Мнемоничку употребу потврђена статистичка значајност ( $\chi^2=13,432$ ,  $p=0,009$ ). Додатном Post Hoc анализом је утврђена статистички значајна разлика између друге и четврте године студија ( $p=0,011$ ).

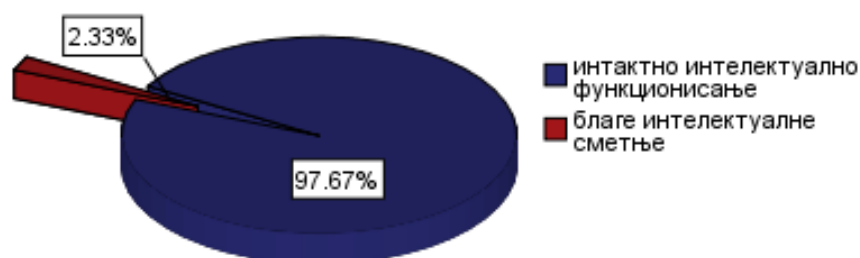


**Табела 6.** Остварени скорови на подскалама Упитника меморијског функционисања

Домен упитника меморијског функционисања	Минимална вредност	Максимална вредност	Медиана	Просечна вредност $\pm$ СД
Генерална фреквенца заборављања	111	242	190	188,26 $\pm$ 21,07
Озбиљност заборављања	30	220	73	75,90 $\pm$ 28,52
Ретроспективна меморија	10	35	27	25,92 $\pm$ 5,74
Мнемоничка употреба	13	56	33	32,48 $\pm$ 10,88

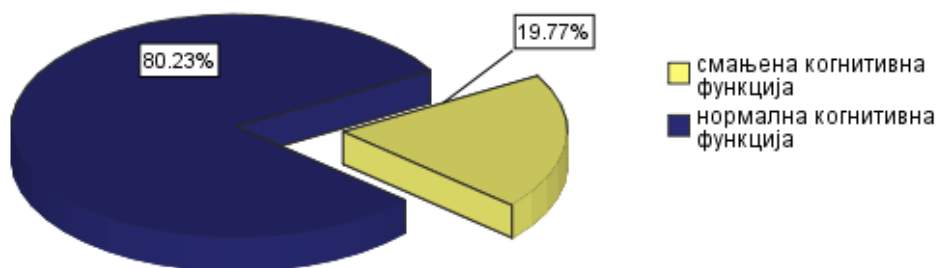
Резултати Кратко преносивог упитника о менталном статусу су приказани на графику 6., где се јасно може видети да су само код 2 испитаника забележене благе интелектуалне сметње. Просечна вредност скорa наведене скале на укупном узорку је 0,21 $\pm$ 0,46, док је код испитаника са благим интелектуалним сметњама скор износио 2,0. Између студената различитих година студија није постојала статистичка значајна разлика у скору на наведеном упитнику ( $\chi^2=3,057$ ,  $p=0,548$ ).

**График 6.** Присуство интелектуалних сметњи код испитаника према Кратко преносивом упитнику о менталном статусу (Short Portable Mental Status Questionnaire)



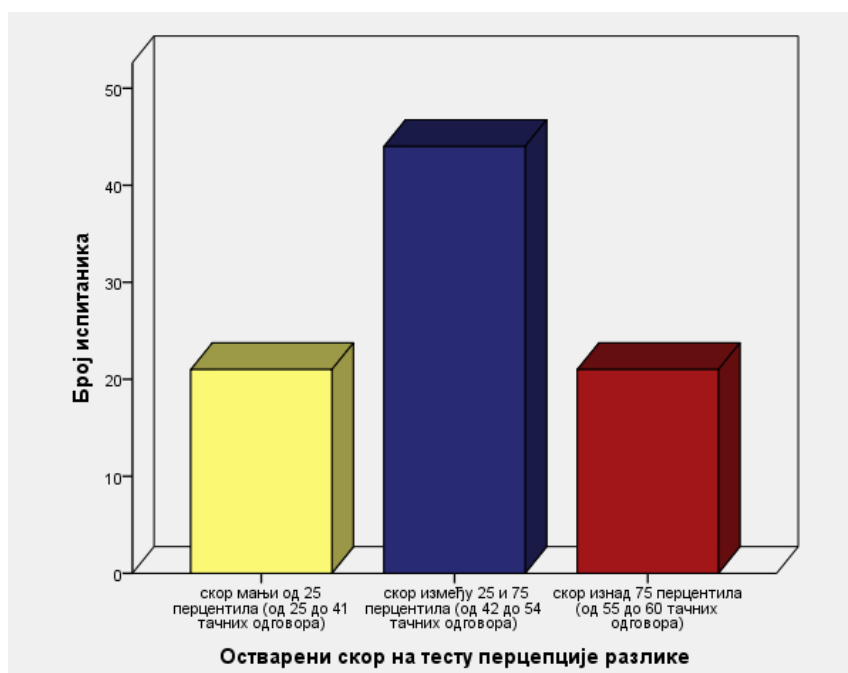
Резултати Монреалског теста когниције су приказани на графику 7. Смањена когнитивна функција је присутна код 17 (19,77%) испитаника код којих је просечна вредност Монреалског теста когниције  $24,29 \pm 0,68$ , док је просечна вредност на укупном узорку  $26,77 \pm 1,71$ . Статистички значајна разлика није утврђена у скору Монреалског теста когниције код испитаника различитих година студија ( $\chi^2=1,896$ ,  $p=0,755$ ).

**График 7.** Присуство когнитивних сметњи код испитаника према Монреалском тесту когниције (Montreal Cognitive assessment, MoCA)



Дистрибуција испитаника према скору оствареном на Тесту перцепције разлике показана је на графику 8. Просечан скор теста у укупном узорку износио је  $47,42 \pm 8,08$ . Просечан скор у групи која је имала скор мањи од 25 перцентила је  $36,62 \pm 4,12$ , у групи чији је скор био између 25 и 75 перцентила  $47,79 \pm 3,74$  док је у групи испитаника са скором преко 75 перцентила износио  $54,89 \pm 1,60$ . Укупан скор на тесту перцепције разлике се није статистички значајно разликовао између испитаника са различитих година студија ( $\chi^2=4,572$ ,  $p=0,334$ ).

**График 8.** Дистрибуција скова перцепције разлике у испитиваној популацији



#### **4.11. Анализа утицаја одређених фактора на ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д код студената**

Резултати испитивања утицаја одређених фактора тј. параметара на ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д у популацији студената Факултета медицинских наука у Крагујевцу приказани су у табели 7. За категоријске променљиве у зависности од броја категорија утицај на серумску концентрацију 25-хидрокси витамина Д одређиван је Студентовим t тестом или ANOVOM у случају нормалне дистрибуције променљиве или Kruskal- Wallis-овим тестом у случају да дистрибуција обележја није била нормална. За испитивање утицаја континуалних варијабли коришћена је линеарна корелација, Pearson-ов или Spearman-ов коефицијент корелације у зависности од нормалности дистрибуције испитиване променљиве. Из табеле се може видети да фактори који утичу на серумску концентрацију 25-хидрокси витамина Д у испитиваној популацији јесу година студија, серумска концентрација калцијума и употреба рибе. Додатним тестирањем је показано да је просечан ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д најнижи на трећој години студија ( $12,22 \pm 3,84 \text{ ngml}^{-1}$ ) у односу на просечну вредност на првој ( $16,92 \pm 3,12 \text{ ngml}^{-1}$ ), другој ( $12,60 \pm 3,41$

ngml<sup>-1</sup>), четвртој (13,62±3,45 ngml<sup>-1</sup>) и петој (15,40±4,10 ngml<sup>-1</sup>). Статистички значајна разлика у серумској концентрацији 25-хидрокси витамина Д је показана код испитаника који су конзумирали рибу (14,54±1,10 ngml<sup>-1</sup>) и оних који нису (12,15±5,24 ngml<sup>-1</sup>).

**Табела 7.** Анализа утицаја фактора на ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д

Параметар	Статистички тест	Сигнификантност нулте хипотезе
Пол	t=0,735в	p=0,464
ФТ4	r= -0,132 <sup>*</sup>	p=0,266
ТСХ	r= 0,120 <sup>**</sup>	p=0,306
ПТХ	r= 0,113 <sup>*</sup>	p=0,369
Цунговој скала за самопроцену депресије	r= -0,080 <sup>**</sup>	p=0,453
Цунгова скала за самопроцену анксиозности	r= -0,50 <sup>*</sup>	p=0,641
Бекова скали за самопроцену депресије	r= -0,190 <sup>**</sup>	p=0,073
Бекова скала за самопроцену анксиозности	r= -0,021 <sup>*</sup>	p=0,847
Генерална фреквенца заборављања <sup>а</sup>	r= 0,066 <sup>*</sup>	p=0,541
Озбиљност заборављања <sup>а</sup>	r= -0,153 <sup>*</sup>	p=0,153
Ретроспективна меморија <sup>а</sup>	r= 0,043 <sup>*</sup>	p=0,690
Мнемоничка употреба <sup>а</sup>	r= -0,099 <sup>*</sup>	p=0,355
Кратко преносиви упитник о менталном статусу	r= 0,031 <sup>**</sup>	p=0,771
Монтреалски тест когниције	r= -0,082 <sup>**</sup>	p=0,443
Тест перцепције разлике	r= -0,003 <sup>*</sup>	p=0,981

Просечна оцена постигнута током студирања	$r=0,068^*$	$p=0,527$
Број обновљених година	$r=0,061^{**}$	$p=0,571$
Година студија	$\chi^2=10,353^b$	<b><math>p=0,035</math></b>
Серумска концентрација $Ca^{2+}$	$r=0,228^{**}$	<b><math>p=0,030</math></b>
Серумска концентрација укупних протеина	$r=0,065^*$	$p=0,546$
Серумска концентрација фосфата	$r=-0,162^*$	$p=0,127$
Ниво урее	$r=0,130^*$	$p=0,224$
Серумски ниво креатинина	$r=-0,077^*$	$p=0,472$
Конзумирање никотина (да/не)	$t=0,649^b$	$p=0,518$
Унос кофеина (>3 шољице кафе дневно/ $\leq 3$ шољице кафе дневно)	$t=0,443^b$	$p=0,659$
Конзумирање рибе (да/не)	$t=2,381^b$	<b><math>p=0,019</math></b>
ИТМ	$r=0,083^*$	$p=0,437$
Просечан унос витамина Д из хране	$r=0,031^*$	$p=0,769$
Тип коже	$t=1,250^b$	$p=0,215$

\*- Pearson-ов коефицијент корелације

\*\* - Spearman-ов коефицијент корелације

а- Домени упитика меморијског функционисања

б- Kruskal- Wallis-ов непараметријски тест

в- Студентов t тест за независне узорке

Статистички значајна разлика је показана у просечној изложености сунцу (<1h /  $\geq 1h$ ) у односу на годину студија ( $\chi^2=9,956$ ,  $p=0,041$ ), при чему је показано да је највећи број студената који се излажу сунцу у трајању <1h на трећој години студија (14 (60,87%) од 23 испитаника).

Испитивање постојања статистичке значајне разлике просечне оцене током студија у односу на годину студија није потврђено ( $\chi^2=9,256$ ,  $p=0,055$ ). Статистички значајна разлика није забележена у конзумирању никотина (да/не) између различитих година студија ( $\chi^2=0,980$ ,  $p=0,913$ ) као ни значајност разлике нивоа ФТ4 ( $p=0,897$ ), ТСХ ( $p=0,999$ ), ПТХ ( $p=0,566$ ) у односу на годину студија. Статистичка значајност је показана за тип коже у односу на годину студија ( $p=0,018$ ), при чему је запажено да је на трећој години студија највећи број испитаника са типом коже 3 чак 27 (31,39%) испитаника.

## 5. ДИСКУСИЈА

Сходно броју доступних научних информација о значају витамина Д у одвијању одређених физиолошких процеса, као и учешћу у патогенези различитих обољења проистиче закључак о неопходности постизања препоручених нивоа витамина Д у различитим популацијама. Иако постоје препоручени ниво витамина Д, који су детерминисани за одређене старосне структуре и индикације од стране Америчких и Европских регулаторних агенција, постизање дефинисаних нивоа је комплексан процес услед постојања великог броја фактора који ограничавају постизање жељених нивоа витамина Д у крви. Идентификовање фактора и одређивање квантитета њиховог утицаја на клиренс 25-хидрокси витамина Д а самим тим и на серумску концентрацију витамина Д код људи јесте генератор у процесу индивидуализације суплементације витамина Д за постизања терапијских ефеката.

Основни циљ спроведене ПФК анализе је био да идентификује варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина Д у здравој, младој, студентској популацији и то кроз тачну идентификацију демографских, физиолошких као и одређених нутритивних и животних фактора као и да процени средњу, популациону вредност клиренса у поменутој популацији у нашој земљи. Подаци добијени из ове анализе могу представљати темељ за формирање рационалних дозних водича за суплементацију витамина Д у здравој, младој популацији чиме се могу превенирати одређена стања која могу настати услед хиповитаминозе. што може знатно утицати на квалитет живота појединца а тиме и на друштво у целини.

Одређивање серумске концентрације витамина Д код здравих, младих особа није поступак који се рутински спроводи у нашем систему здравствене заштите. Идентификовање постојања дефицијенције/инсуфицијенције витамина Д у здравој младој популацији може пробудити свест како здравствених радника тако и опште популације о значају овог проблема.

На основу претраге тренутно доступне литературе у медицинским базама података за сада не постоји популациона фармакокинетичка анализа 25-хидрокси витамина Д која је спроведена у нашој или некој другој земљи у свету што лимитира могућност компарације резултата спроведеног истраживања са резултатима других студија.

Спроведена ПФК анализа која је испитивала утицај дванаест фактора тј. коваријанти на средњу вредност клиренса код младе, здраве, српске популације студената је показала значајан утицај две од дванаест коваријанти, при чему је добијена просечна вредност клиренса 25-хидрокси витамина Д у испитиваној популацији од 2,05 L/h. Две коваријанте које су утицала на средњу популациону вредност клиренса су биле просечна доза витамина Д унета храном и серумски ниво фосфата код испитаника.

Постојање линеарног односа клиренса 25-хидрокси витамина Д са просечном дозом витамина Д унетом храном може се видети из формуле коначног модела клиренса испитиваног витамина у циљној популацији. Утицај просечне дозе витамина Д унете храном на клиренс доказује и смањење вредности МОФ за 69,216 јединица, а величина ефекта у спроведеној анализи била је  $+0,738 \text{ lh}^{-1}$ . Као што се из табеле 5. може видети просечна доза витамина Д унета храном је варијала код испитаника и кретала се у опсегу од 0,46 до 4,47 $\mu\text{g}$ , при чему је просечна доза витамина Д унета храном у испитиваној популацији износила  $1,59 \pm 0,87 \mu\text{g}$ . Код особа које не смеју да се излажу сунчевој светлости из здравствених разлога, попут алергијских реакција на сунчеву светлост или употребе лекова за које је доказана фотосензитивност, унос витамина Д путем хране или суплемената је битан начин постизања суфицијентног нивоа витамина Д. Храна иако је један од два есенцијална извора витамина Д услед оскудног садржаја витамина Д у већини намирница не пружа могућност постизања физиолошки адекватног нивоа, осим у случају редовног уноса намирница као што су рибље уље, одређене врсте риба попут лососа, скуше, сардине, цигерица, јаја, печурке, поједине врсте меса које су знатно сиромашније садржајем витамина Д у односу на претходно набројане намирнице или уноса готових намирница које су обogaђене витамином Д попут маргарина, житарица, млека и тестенина (Schmid & Walther, 2013). Препоруке Европске агенције SCF (Scientific Committee on Food) из 2002. године су дозу од 50  $\mu\text{g}$  витамина Д класификовале као максималну препоручену дозу коју одрасла особа може да унесе у току дана, да би у извештају Европске агенције за безбедност хране (European Food Safety Authority, EFSA) из 2012. године претходно поменута доза на основу публикованих епидемиолошких и експерименталних студија била промењена на 100  $\mu\text{g}$ /дневно. Максимална подношљива доза се рачуна на основу процене ризика од настанка хиперкалцемије након примене одређене дозе витамина Д. Напомена извештаја из 2012. године је била да је код великог дела европске популације



унос витамина Д из различитих извора, и хране и суплементације, доста испод максималних препоручених доза (European Commission. Scientific Committee on Food, 2002; EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2012). Литературни подаци о уносу витамина Д путем хране су варијабилни и за већину земаља се крећу испод препорученог нивоа што је према Америчком институту за медицину као ЕАР (Estimated Average Requirement- процењена просечна потреба) 10  $\mu\text{g}$ /дневно (400IU) а као РДА (Recommended Daily Allowance- препоручени дневни унос) 15  $\mu\text{g}$ /дневно (600 IU), док је Европска препорука у опсегу од 0 до 10  $\mu\text{g}$ /дневно за одрасле особе (Institute of Medicine, 2011; Commission of the European Communities RSCF, 1993). Унос витамина Д из хране код одраслих варира у Европским земљама при чему је најнижи у Шпанији, 1,1  $\mu\text{g}$ /дневно код жена и 1,5  $\mu\text{g}$ /дневно код мушкараца, док је највиши био у Финској, 4,9  $\mu\text{g}$ /дневно и 7,6  $\mu\text{g}$ /дневно код мушкараца, што се може објаснити режимом исхране који подразумева већу заступљеност рибљег меса богатог витамином Д у Финској популацији у односу на Шпанску популацију и већим бројем намирница које су обogaћене витамином Д а које се користе у свакодневној исхрани. Просечан унос витамина Д из хране код одраслих у Немачкој износи 2,8  $\mu\text{g}$ /дневно код жена и 3,5  $\mu\text{g}$ /дневно код мушкараца, у Италији 2,7  $\mu\text{g}$ /дневно код жена и 3,4  $\mu\text{g}$ /дневно код мушкараца, Данској 3,0  $\mu\text{g}$ /дневно и 3,7  $\mu\text{g}$ /дневно код жена и мушкараца, респективно (Flynn A et al., 2009). Истраживање спроведено на аустралијској популацији је показало да је унос витамина Д био у опсегу 1,2–2,6  $\mu\text{g}$ /дневно (Nowson and Margeterison, 2002). На основу доступних резултата спроведених истраживања се може видети да се просечан дневни унос витамина Д у већини Европских земаља креће у интервалу 2-5  $\mu\text{g}$ , близу ког интервала су и просечне вредности уноса витамина Д у нашем истраживању, што представља ниже вредности од горње границе Европских препорука за нутритивни и енергетски унос (Commission of the European Communities RSCF, 1993). Студија спроведена у Канади чији су млади, одрасли испитаници били различите етничке припадности, европске, источно- и јужноазијске, је показала да је просечан унос витамина Д током седмодневног периода био  $4,3 \pm 3,6 \mu\text{g}$  (Wu et al. 2009). Адекватност уноса препоручених доза витамина Д путем хране у Америчкој популацији такође није доказна (Pfeiffer et al. 2012). Добијена дозна зависност клиренса 25(ОН)Д у нашем истраживању није тренутно литературно поткрепљена чињеница и може представљати полазну тачку за наредна истраживања на широј популацији што може утицати на безбеднију и ефикаснију суплементацију витамина Д.

Индекс телесне масе је коваријанта која током процеса изградње пуног модела није показала утицај на клиренс 25-хидрокси витамина Д ни линеарним ни нелинеарним начином анализирања. Испитивање утицаја индекса телесне масе тј. статуса ухрањености на ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д у студијама даје контраверзне закључке. Постојање инверзне корелације ИТМ са серумском концентрацијом 25-хидрокси витамина Д је показана у одређеном броју студија (Arab et al. 2012; Didriksen et al. 2013; Vimalaswaran et al. 2013; Saneei et al. 2013; Stokić et al. 2014) и то и након оралног уноса витамина Д и након ендogene продукције услед излагања сунчевој светлости (Wortsmann et al. 2000), док одређени број студија показује опозитне резултате (Mansoor et al. 2010; Baradaran et al. 2012; Han et al. 2014). Масно ткиво представља једну врсту депоа витамина Д из којег може да се ослободи и даље метаболише у случају настанка хиповитаминозе што се најчешће дешава током зимских месеци услед смањења ендogene продукције витамина Д, што је и потврђено у студији која је испитивала статус витамина Д код субмаринаца након периода од 68 дана потпуног изостанка излагања сунчевој светлости током којег се ниво витамина Д смањило за половину почетних вредности указујући на значај претходно формираног депоа витамина код испитаника (Dlugos et al. 1995). Претходно наведена чињеница имплицира да код особа са  $ИТМ \geq 30 \text{ kgm}^{-2}$  услед повећане количине масног ткива се ствара предуслов за настанак дефицијенције витамина Д. У студији која је у *in vivo* и *in vitro* условима испитивала утицај гојазности на серумску концентрацију 25-хидрокси витамина Д показано је да иако није било разлике у концентрацији 7-дехидрохолестерола код гојазних и негојазних испитаника раст серумске концентрација 25(ОН)Д је био чак 57% мањи код гојазних испитаника након излагања УВБ зрачењу (Wortsmann et al. 2000). Истраживање спроведено у нашој земљи које је обухватило 155 испитаника са дијагностикованим дијабетесом тип 2 је показало инверзну корелацију између ИТМ и серумске концентрације 25(ОН)Д (Kavarić et al. 2013). Непостојање утицаја ИТМ на величину клиренса 25(ОН)Д и корелације између ИТМ и серумске концентрације 25(ОН)Д у нашем истраживању се донекле може објаснити нормалном вредношћу ИТМ у испитиваној популацији,  $21.31 \pm 2.69 \text{ kg/m}^2$ , при чему је  $ИТМ \geq 30 \text{ kgm}^{-2}$  забележен код само једног испитаника. На основу добијених резултата у овом истраживању може се приметити да дозирање витамина Д базирано на односу  $\mu\text{g/kg}$  неће утицати на безбедност и терапијски исход примене витамина Д у младој, одраслој, здравој популацији.

Услед значаја излагања сунчевој светлости у постизању суфицијентног нивоа 25(ОН)Д у хуманом организму у нашем истраживању испитаван је утицај просечног излагања сунчевој светлости (мање или више од 1h) у посматраном периоду. Резултати истраживања су показали да ова коваријанта није испољила утицај на просечну вредност клиренса 25(ОН)Д у студентској популацији и да не постоји корелација са серумском концентрацијом 25(ОН)Д. Из табеле 2. се може видети да испитивана коваријанта није испунила раније наведене популационе фармакокинетичке захтеве и самим тим није учествовала у изградњи коначног популационог модела.

Иако је утицај излагања ултравиолетном зрачењу из сунчеве светлости на синтезу витамина Д у кожи већ годинама уназад детаљно испитиван у различитим условима, не постоји униформна препорука о временском периоду неопходном да се проведе на сунчевој светлости како би се задовољиле потребе за витамином Д услед постојања великог броја фактора који детерминишу његову синтезу (Ovesen et al. 2003).

Holick, еминентан истраживач у области витамина Д, је закључио да је излагање сунчевој светлости у количини која представља  $\frac{1}{4}$  минималне еритемалне дозе (МЕД) еквивалент је оралној дози витамина Д од 1000 IU. Минимална еритемална доза је доза УВБ зрачења којом се постиже црвенкаста боја на кожи а четвртина дозе се остварује када се изложи 25% површине људске коже што представља излагање површине руку, рамена и лица (Holick, 2004). Иако је ова доза тачно дефинисана, не може се рећи за које време се може очекивати синтеза ове количине витамина Д услед утицаја бројних фактора популације која је изложена УВБ зрачењу и не може се генерализовати.

Доказ да просечно време проведено на сунчевој светлости није једини фактор који детерминише статус витамина Д у хуманом организму показује и студија чији су млади, одрасли испитаници били изложени сунчевој светлости у трајању од 3 и више часова дневно крајем пролећа и почетком лета, током 5 и више дана недељно, у континуитету од три месеца након чега је измерена просечна серумска концентрација 25(ОН)Д 31,6 ng/ml као и и студија из 1982. године где је 18 радника фарме недељно проводило на сунцу од 32-70h након чега је код двоје радника забележен серумски ниво 25(ОН)Д испод 30 ng/ml (Haddock et al. 1982; Binkley et al. 2007). Не остваривању суфицијентног нивоа у наведеним истраживањима аутори приписују генетском утицају и утицају фактора окружења. Резултати наведених истраживања донекле корелирају са нашим резултатима где упркос постојању великог дела испитиване популације, код 61

испитаника, постоји просечно излагање сунчевој светлости у трајању од >1h, је измерена серумска концентрација 25(OH)Д  $13,26 \pm 4,86$  ng/ml. Потенцијално образложење ниске вредности измерене серумске концентрације у испитиваној студентској популацији упркос већинској процентуалној заступљености просечног излагања сунчевој светлости у трајању >1h може бити период вршења истраживања. Иако је истраживање спроведено током летњег периода, јун-август 2012. године то је временски период када испитивана популација има велики број обавеза услед одвијања испитних рокова у поменутом периоду што може да утиче на излагање сунчевој светлости у неадекватном периоду дана, то јест у после подневним сатима. Како је просечна изложеност сунцу вршена самоизвештавањем од стране испитаника током периода од 30 дана проистиче питање о поузданости наведених временских интервала. Битна чињеница коју треба узети у обзир приликом разматрања утицаја сунчања на синтезу витамина Д је да пик серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д настаје 24 сата након излагања ултравиолетном зрачењу (Matsuoka et al. 1987).

Доба дана такође одређује који проценат УВБ зрачења ће допрети до површине коже. Претходна испитавања су показала да рано ујутру и увече УВБ зрачење пролази кроз знатно дужи атмосферски пут за разлику од дужине пута током поднева. Како током дана долази до промене соларног зенитног угла тако и током годишњих доба. Соларни зенитни угао се дефинише као угао између зенита и позиције сунца у датом моменту који је најмањи током летњег периода године када је највиши ниво УВ зрачења за разлику од зимског периода године када је УВ зрачење на најнижем нивоу (Kimlin, 2008).

Један од поменутих фактора који детерминишу синтезу витамина Д је географски положај тј. ширина одређеног подручја јер са удаљавањем од екватора ка половима долази до пада нивоа УВ зрачења. Доказ о јачини утицаја географске ширине на синтезу витамина Д је да државе чије се површине простиру на  $90^{\circ}$  немају ефективно зарчење за синтезу витамина Д током 8 од 12 месеци у години, док за разлику од њих на географској ширини од  $40^{\circ}$  до  $90^{\circ}$  најинтензивнија продукција витамина Д се дешава током летњих месеци (Kimlin et al. 2007; Kimlin, 2008). Европско подручје је позиционирано на високим вредностима географске ширине, од приближно  $35^{\circ}$  до  $70^{\circ}$  што онемогућава синтезу витамина Д из 7-дехидрохолестерола током зимског периода (Cashman et al. 2008). Балканско полуострво, на коме се простире и наша земља, се налази на географској ширини од  $41^{\circ}53'$  до  $46^{\circ}11'$  што значајно

ограничава фотопродукцију витамина Д током већег дела године, онемогућавајући синтезу у периоду од октобра до априла (Holick, 1995; Tsiaras & Weinstock, 2011).

Летњи период за већину географских подручја представља период током којег је најинтензивнија продукција витамина Д. Студија спроведена у Француској на групи од 54 адолесцената мушког пола, која је трајала 18 месеци са пресечним тачкама на сваких 6 месеци на тај начин обухватајући и јесен и зиму, је показала да је серумска концентрација 25(ОН)Д била значајно виша током летњег периода него током зимског, што се могло и очекивати услед испитивања на адолесцентској популацији за коју је карактеристично непостојање радних обавеза током летњег периода током којег се могу несметано излагати сунчевој светлости током својих уобичајених активности на отвореном простору (Guillemant et al. 2001). Сезонска варијација статуса витамина Д показана је и у другим студијама спроведеним у различитим крајевима света (Bolland et al. 2007; Kull et al. 2009; Maeda et al. 2013; van Schoor et al. 2014; Larose et al. 2014) који обухватају и Европску регију (Christensen et al. 2010; Bhattoa et al. 2013;). У истраживању које је спровела група аутора на челу са Terushkin-ом је експериментално показано да синтеза витамина Д зависи од географског подручја, годишњег доба и типа коже (Terushkin et al. 2010).

Поред наведених фактора на УВБ зрачење могу да утичу и озонски омотач, атмосферска загађења и облачност. Озонски омотач услед апсорбовања УВБ зрачења може значајно редуковати дозу УВБ зрачења која ће допрети до коже појединца. Постојећи подаци указују да облачност може редуковати УВБ зрачење у опсегу од 50 до 99% у зависности да ли је облачност делимична или потпуна (Ovesen et al. 2003; Engelsens, 2010).

При процени статуса витамина Д у популацији неопходно је да се истовремено разматра и животни стил индивидуе, култура и параметри понашања. Постојање различитих културолошких и верских норми ограничава проценат излагања коже сунчевој светлости код особа женског пола (Sayed-Hassan et al. 2014). Како су у испитиваној популацији студенти били исте етничке припадности овај фактор није значајан за наше истраживање. Интересантни подаци проистичу из студија спроведених у земљама попут Саудијске Арабије, Уједињених Арапских Емирата и Јордана, где поред климатских повољности за ендогену продукцију витамина Д3 током великог дела године код жена дефицијенција није реткост услед постојања културолошких норми облачење и прекривености великог дела од укупне површине

коже где је у појединим стилевима облачења дозвољено откривање само лица и шака. (Batieha et al. 2011; Christie and Mason, 2011).

Повећање свести о ризику од канцера коже услед прекомерне и неадекватне експозиције сунчевом зрачењу који је узрочник 20% меланома и чак 99% немеланомског канцера коже као и превременог старења коже позитивно утиче на епидемијски развој дефицијенције витамина Д (Longstreth et al. 2005; Uddin et al. 2013). Како би се умањио штетан ефекат сунчевог зрачења људска популација посеже за препаратима са заштитним фактором (СПФ-SPF-sun protection factor) који је постао саставни део многобројних козметичких препрата који велики део женске популације свакодневно користи. Препарати са СПФ 8 умањују синтезу витамина Д преко 95% , док они са СПФ 15 и преко 98% (Holick, 2004b). С'обзиром да је већина испитаника у нашем истраживању била женског пола, потенцијални садржај заштитног фактора у кремама за лице може бити један од узрочника хиповитаминозе.

Старост и пол су фактори чија је корелација са серумском концентрацијом витамина Д испитивана у различитим популација али који у нашем истраживању нису показали значајан ефекат на просечну вредност клиренса 25(ОН)Д у студентској популацији. Као што је већ напоменуто у Уводу женски пол је чешће погођен дефицијенцијом/инсуфицијенцијом витамина Д у односу на мушки пол што истраживачи објашњавају физиолошки већим садржајем масти код жена (Engelsen, 2010). Корелација старости и хиповитаминозе витамина Д се објашњава најпре смањеним излагањем УВБ зрачењу услед ограничене покретљивости у старијој животној доби као и услед физиолошког смањења способности коже да продукује витамин Д из прекурсора (Ovesen et al. 2003; Engelsen, 2010). Спроведена студија није показала корелацију старости испитаника и пола са серумском концентрацијом 25(ОН)Д што се могло очекивати с'обзиром на хомогену групу испитаника у погледу старости, ради се о младим испитаницима са просечном старошћу  $22,39 \pm 1,82$  година, где је већина женског пола.

Тип коже је коваријанта која значајно може да детерминише синтезу витамина Д у кожи услед варијабилности меланина у различитим типовима коже који представља природни заштитни фактор коже. Последице, услед различитог садржаја меланина је примећено да популација са тамнијом кожом не производи витамин Д3 у количини у којој то врши светлија кожа. Типови коже V и VI према Fitzpatrick-овој скали у односу на тип II и III захтевају више пута (чак 5-10) дужи временски период

излагања сунчевој светлости за синтезу одређене количине витамина Д3. Експериментално је показано да је конверзија 7-дехидрохолестерола у превитамин Д приближно 5-10 интензивнија код типа коже II у односу на тип коже V (Chen et al. 2007). Bogh са својим сарадницима код здравих одраслих особа, старости од 18 до 51 године, код који је 10 испитаника имало тип коже 1 према Fitzpatrick-у, 22 тип коже 2, 15 тип коже 3, 20 тип коже 4, 21 тип коже 5 и 8 тип коже 6, није доказао постојање утицаја типа коже на серумски ниво витамина Д. Валидност публиковане студије је умањена чињеницом да је студија спроведена у Холандији током зимског периода (јануар-март) (Bogh et al. 2010). Тип коже је коваријанта која није испунила статистичке захтеве у смањењу вредности МОФ тако да не предстаља део коначног модела. Није утврђена статистички значајна разлика у серумској концентрацији 25(ОН)Д између испитаника са типом коже II и III што се може објаснити пре свега присуством светлијих типова коже у испитиваној популацији, који се међусобно не разликују много по способности ендogene продукције витамина Д3.

Одређене животне навике, попут уноса кофеина и никота могу имплицирати настанак недовољног присуства витамина Д код људи. Никотин је давно препознати фактор ризика који у значајној мери делује деструктивно на здравствени статус, нарушавајући одвијање нормалних физиолошких функција у организму. Механизам негативног утицаја на рад појединих органа је детаљно описан у студијама. Утицај никота на статус витамина Д се може посматрати са више различитих аспеката сходно резултатима публикованих студија које су се тиме бавиле. Конзумирање никотина може да доведе до смањења серумског нивоа 25(ОН)Д за приближно 9-10%, а секрецију ПТХ може редуковати за 20% (Brot et al. 1999). У клиничкој студији коју је спровео Jorde са сарадницима о корелацији никотина са статусом витамина Д и утицају на ниво серумске концентрације ПТХ код испитаника, испитиван је и утицај престанка пушења на ниво ПТХ; резултати спроведеног истраживања су показали да је престанак конзумирања никотина утицао да ниво ПТХ буде компарабилан са нивом код непушача без обзира на дужину претходног периода конзумирања никотина, при чему број цигарета које је испитаник конзумирао током дана није значајно утицао на ниво ПТХ код пушача. Образложење аутора о потенцијалном механизму штетног дејства никотина је да он повећава ресорпцију калцијума из скелетног система на тај начин повећава серумску концентрацију калцијума која последично доводи до смањења нивоа ПТХ и 25(ОН)Д (Jorde et al. 2005). Како је познато да ниво ПТХ један

од фактора који утичу на експресију ензима који метаболишу витамина Д код пушача, можемо последично очекивати нижи ниво витамина Д.

Истраживање спроведено у Бугарској на младој, одраслој, градској популацији је показало да је разлика у серумској концентрацији 25(ОН)Д код пушача и непушача постојала само код испитаника мушког пола, док код жена то није био случај (Shinkov et al., 2014). Поред наведене студије која је вршена на Европском подручју и студија која је испитивала утицај старења и пушења на настанак хиповитаминозе витамина Д у југо-источној Европи је показала да је пушење значај фактор ризика, ОР(odds ratio)=1,8 (Cutillas-Marco et al. 2012). Позитивна корелација између конзумирања цигарета и дефицијенције витамина Д показан је у HUNT студији на Норвешкој популацији одраслих али током зимских месеци (Larose et al. 2014). Студија спроведена на становницима Атине, мушког пола, старости од 20 до 50 година је указала на значајну корелацију између серумске концентрације 25(ОН)Д и пушења, а мултиплом регресијом аутори су дошли до закључка да 58% већу шансу да развију дефицијенцију витамина Д имају пушачи од непушача за групу старости од 20 до 29 година (Kassi et al., 2014). Насупрот наведеним подацима резултати нашег истраживања нису показали статистички значајну разлику серумске концентрације 25(ОН)Д између пушача и непушача, што се може приписати малом боју испитаника у групи пушача (15 испитаника).

Кофеин попут никотина у нашем истраживању није показао значајан утицај на серумски ниво 25(ОН)Д што је утврђено статистичким поређењем ниво испитаника који су конзумирали до 3 шољице кафе дневно и оних који су конзумирали три и више шољица, а није показао ефекат ни на величину просечног клиренса 25(ОН)Д у испитиваној популацији. Спровођење испитивања утицаја конзумирања кафе и чаја у адолесцентској популацији Саудијске Арабије је показало занимљив податак, а то је да је са порастом конзумирања кафе и чаја растао и серумски ниво витамина Д, при чему треба истаћи да овај утицај испитиван са троструког аспекта количине унетог кофеина а то је 0-4 шољице недељно, 5-8 и 9-12 шољица дневно. Потенцијална објашњења за овај феномен су да се кофеин из наведених напитака метаболише у јетри посредством оксидазе цитохрома П450, чиме може конкурисати за метаболичке путеве калцидиола; друго објашњење је екпериментална *in vitro* потврда да кофеин инхибира конверзију калцидиола у калцитриол (Al-Othman et al. 2012). Rapuri са сарадницима је утврдио



дозно зависни ефекат кофеина на редукцију нивао калцитриола приметивши да кофеин смањује експресију ВДР протеина за 50-70% (Rapuri et al. 2007).

Укључивање конзумирања никотина и уноса кофеина у базни модел популационог фармакокинетичког модела у студентској популацији није било праћено статистички значајним смањењем вредности минималне објективне функције.

Код скоро половине испитаника (48,84%) обухваћених нашим истраживањем је регистрована употреба рибе у току тридесетодневног периода праћења. Конзумирање рибе као нутријента је битна због већ поменутог високог садржаја витамина Д код појединих врста као што су туна, сардина, лосос, харинга, скуша и др (Roos et al. 2012). Добијена статистички значајна разлика у нивоу витамина Д у односу на конзумирање рибе потврђује значај уноса рибе у постизању суфицијентног статуса витамина Д. Оваков исход се може објаснити исхраном одређеног броја испитиване популације у студентској мензи где програм исхране подразумева избалансирану мешовиту исхрану која подразумева и редовну употребу рибе. Литературни подаци показују да је риба главни дијететски извор витамина Д код одраслих у Франској, Јапану и Шпанији, док је у Холандији на последњем месту списка нутријената (Nakamura, 2002; Spiro and Buttriss, 2014). Конзумирање рибе није коваријанта која је испунила статистички постављење захтеве при изградњи популационог фармакокинетичког модела клиренса 25(ОН)Д.

Како је примарна улога витамина Д, као што је већ напоменуто у Уводу, одржавање минералне хомеостазе неизоставан део ПФК анализе у овом истраживању је био испитивање утицаја серумске концентрације калцијума и фосфата на популациону средњу вредност клиренса 25(ОН)Д у студентској популацији. Након изградње базног модела наведене коваријанте су засебно укључиване и њихов утицај испитиван на линеаран и нелинеаран начин. Изградњом пуних модела, као што се може видеи из табеле 2., серумска концентрација калцијума није показала утицај на клиренс 25(ОН)Д у испитиваној популацији док је серумска концентрација фосфата испољила свој ефекат на испитивани клиренс 25(ОН)Д. Ефекат серумске концентрације фосфата на клиренс верификује смањење вредности МОФ за 7,6 јединица док добијена величина ефекта у истраживању била  $+0.618 \text{ lh}^{-1}$ .

Клиничким испитивањима је детаљно објашњена постојећа комплексна релација између калцијума, фосфора, ПТХ и витамина Д (Tsiaras & Weinstock, 2011). Као што је претходно речено, метаболизам 25(ОН)Д се одвија највећим делом у

бурезима посредством ензима 1- $\alpha$  хидроксилазе, изоформе 27B1 цитохрома P450. Активност ензима 1- $\alpha$  хидроксилазе је уско повезана са минералним индикаторима, тј. серумским нивоом фосфата и калцијума тј. нивоом ПТХ који је одраз серумског нивоа калцијума у хуманом организму (Miller & Portale, 2000; Zhang et al. 2002). Иако су серумске концентрације фосфата и калцијума у испитиваној популацији биле у референтним опсезима, серумски ниво фосфата је показао значајан ефекат на клиренс калцидиола у испитиваној популацији што указује на значајност корекције дозе витамина Д у случају суплементације према статусу наведеног индикатора. Потенцијални механизам повећања клиренса 25(OH)Д код испитаника са нормалним вредностима фосфата у серуму за сада није познат али ово може представљати капислу за спровођење клиничких испитивања која ће значајно утицати на постизање суфицијентног нивоа витамина Д при суплементацији.

Испитивање постојања статистички значајне корелације између серумске концентрације 25(OH)Д и серумске концентрације калцијума и фосфата је показало постојање слабе корелације између концентрације калцијума и 25(OH)Д, док за фосфате корелација није потврђена.

Испитивање утицаја укупних протеина на клиренс испитиване супстанце у циљној популацији није показало ефекат услед не испуњавања основних статистичких захтева након додавања ове коваријанте у основни модел.

Добијени коначни популациони фармакокинетички модел клиренса 25(OH)Д у студентској популацији потврђен је анализирањем валидационог сета података који су сачињавали подаци од 16 испитаника. Добре предиктивне перформансе израчунатог модела које се могу видети са графикона 2., а израчуната предиктивна грешка валидационог сета из табеле 4. указује на прецизност добијеног модела и биас. Како су вредности грешака за валидациони сет податаке мале то указује да је дефинисани модел добро описао клиренс 25(OH)Д у односу на испитиване демографске и друге клинички релевантне параметре студентске популације.

Поред изградње популационог фармакокинетичког модела за клиренс 25(OH)Д, ова студија је испитивала утицај статуса витамина Д на депресију, анксиозност и меморијско функционисање.

Присуство рецептора за витамин Д у хуманом мозгу које је експериментално верификовано као и присуство ензима ЦИП27B1 широм можданих структура укључујући хипокампус и цингуларни кортекс побудило је научну сумњу на постојање

утицаја витамина Д на психолошки и когнитивни статус код појединца (Eyles et al. 2005; Schlögl and Holick, 2014). Ефекти које витамин Д остварује у хуманом мозгу су неуроимуномодулација, неуропротекција, неуротрансмисија као и сам мождани развој, што последично указује на постојање могућности да недовољност витамина Д може бити повезана са смањењем одређених можданих функција (Fernandes et al. 2009).

Депресија као обољење савременог доба се јавља широм света, приближно 840 милиона људи има дијагностикован овај поремећај расположења при чему је показано да се јавља у свим животним добима и код оба пола доводећи до смањења квалитета живота појединца у драстично већој мери него други хронични здравствени поремећаји. Тренутно доступни литературни подаци показују неконзистентне закључке о повезаности нивоа 25(ОН)Д и нивоа депресивности. Афирмативне резултате утицаја нивоа калцидиола на ниво депресивности показала је проспективна студија под називом "The Cooper Center Longitudinal Study" која је обухватила испитанике старости од 20 до 90 година показавши статистичку значајност између сурумског нивоа 25(ОН)Д и депресивне симптоматологије код испитаника, при чему је ова релација била изражајнија код испитаника који су у анамнези имали податак о претходним депресивним поремећајима као и студија спроведена на здравим испитаницима из Кореје који су били старији од 20 година (Hoang et al. 2011; Chung et al. 2014). Наспрам ових, спроведене су студије чији резултати не корелирају претходно наведеним резултатима (Pan et al. 2009; Chan et al. 2011). Наши резултати су подударни са последње поменутих студијама; из табеле 7 се може видети да не постоји корелација између нивоа 25(ОН)Д и скорa депресивности и анксиозности било да су мерени Цунговом или Бековом скалом. Непостојање корелације у нашем истраживању се може објаснити спровођењем истраживања на недовољном броју испитаника, опсежнија испитивања би показала релеватније чињенично стање у студентској популацији Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Позитивна корелација између сурумске концентрације 25(ОН)Д и когнитивних функција је потврђена у старијој популацији, док то није случај у популацији младих (Przybelski et al. 2007; Dean et al. 2011). Резултати спроведеног истраживања у студентској популацији, попут резултата истраживања Dean са својим сарадницима, нису показали статистички значајну корелацију нивоа калцидиола и когнитивног статуса који је процењиван употребом Упитника меморијског функционисања, Кратко

преносивог упитника о менталном статусу, Монреалског теста когниције и Теста перцепције разлике.

Занимљив податак из нашег ситраживања је да је постојала значајна разлика у серумском нивоу 25(ОН)Д и студијске године, а најнижа концентрација код студената је забележена на трећој години студија, који су били мање изложени сунчевој светлости у односу на испитанике са других студијских година, што се постојањем приближног броја испита на свим студијским годинама једино може објаснити степеном тежине предмета на трећој години студија.

## 6. ЗАКЉУЧАК

Спроведено истраживање је показало резултате из којих проистичу следећи закључци:

- ❖ Клиренс 25-хидрокси витамина Д и његову фармакокинетичку варијабилност у студентској популацији значајно одређују два параметра: просечна доза витамина Д унета храном и серумски ниво фосфата.
- ❖ Просечна доза витамина Д унета храном, иако је показала значајан ефекат на клиренс 25-хидрокси витамина Д, није показала статистички значајну корелацију са серумском концентрацијом 25-хидрокси витамина Д у испитиваној популацији.
- ❖ Серумски ниво фосфата је, попут просечне дозе витамина Д унетог, показао значајан утицај на величину клиренса у студентској популацији али није потврђена статистички значајна корелација са серумском концентрацијом 25-хидрокси витамина Д у испитиваној популацији.
- ❖ Предиктивна перформанса добијеног ПФК модела је потврђена на валидационом сету података тј. контролној групи.
- ❖ Добијени модел може се користити као основа за доношење препорука за кориговање дозног режима и дневне дозе витамина Д у клиничкој пракси код младих, одраслих особа који су компаративни са испитиваном студентском популацијом.
- ❖ Одбачена је хипотеза о постојању корелације између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и оствареног успеха учења у испитиваној студентској популацији.
- ❖ Одбачена је хипотеза о постојању корелације између серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д и анксиозности, депресије и когнитивног статуса у испитиваној студентској популацији.

- ❖ Постојање статистички значајне разлике у серумској концентрације 25-хидрокси витамина Д испитаника који су конзумирали рибу и оних који нису, наводи на закључак да начин исхране може бити повезан са настанком хипо- или хипервитаминозе у студентској популацији.
  
- ❖ Временски период изложености сунчевој светлости није био повезан са статусом 25-хидрокси витамина Д код испитаника.

## 7. ЛІТЕРАТУРА

- Aarons L (1991). Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol* 32: 669-70.
- Aarons L (1999). Software for population pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(4): 255-64.
- Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG (2013). Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and metaanalysis. *Clin Chem* 59(2): 381-91.
- Ajabshir S, Asif A, Nayer A (2014). The effects of vitamin D on the renin-angiotensin system. *J Nephrothol* 3(2):41-3.
- Al-Elq AH (2012). The status of Vitamin D in medical students in the preclerkship years of a Saudi medical school. *J Family Community Med* 19(2): 100-4.
- Al-Othman A, Al-Musharaf S, Al-Daghri NM, et al (2012). Tea and coffee consumption in relation to vitamin D and calcium levels in Saudi adolescents. *Nutr J* 11: 56.
- Antico A, Tampona M, Tozzoli R, Bizzaro N (2012). Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 12(2): 127-36.
- Arab L, Adams J, Kim H, Kohlmeier A (2012). Relationship between body mass index and serum 25-hydroxyvitamin D stronger among Caucasians than African Americans in NHANES adults 2001-2006. *Open Journal of Epidemiology* 2: 7-13.
- Armas LA, Hollis BW, Heaney RP (2004). Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89(11): 5387-91.
- Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P (2014). Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2(1): 76-89.
- Avioli LV, Lee SW, McDonald JE, Lund J, DeLuca HF (1967). Metabolism of vitamin D<sub>3</sub>-<sup>3</sup>H in human subjects: distribution in blood, bile, feces, and urine. *J Clin Invest* 46(6): 983-92.

Balion C, Griffith LE, Strifler L, et al (2012). Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 79(13): 1397-405.

Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E (2006). Vitamin D deficiency: A global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(4): 640-6.

Baradaran A, Behradmanesh S, Nasri H (2012). Association of body mass index and serum vitamin D level in healthy Iranian adolescents. *Endokrynol Pol* 63(1): 29-33.

Batieha A, Khader Y, Jaddou H, et al (2011). Vitamin D status in Jordan: dress style and gender discrepancies. *Ann Nutr Metab* 58(1): 10-8.

Beal SL, Sheiner LB (1998). *NONMEM Users Guides*. California: NONMEM Project Group, University of San Francisco.

Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA (1988). An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 56: 893-7.

Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock N, Erbaugh J (1961). An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 4: 561-57.

Bhattoa HP, Nagy E, More C, et al (2013). Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in healthy Hungarian men over 50 years of age: the HunMen Study. *Osteoporos Int* 24(1): 179-86.

[Bikle DD](#) (2010). VITAMIN D: Newly Discovered Actions Require Reconsideration of Physiologic Requirements. *Trends Endocrinol Metab* 21(6): 375-84.

Binkley N, Novotny R, Krueger D, et al (2007). Low vitamin D status despite abundant sun exposure. *J Clin Endocrinol Metab* 92(6): 2130-5.

Bischoff-Ferrari HA (2008). Optimal serum 25-hydroxyvitamin D levels for multiple health outcomes. *Adv Exp Med Biol* 624: 55-71.

Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, et al (2012). A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med* 367(1): 40-49.



Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al (2009). Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 169(6): 551-61.

Black LJ, Jacoby P, Allen KL, et al (2014). Low vitamin D levels are associated with symptoms of depression in young adult males. *Aust N Z J Psychiatry* 48(5): 464-71.

Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK (1968). 25-Hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D<sub>3</sub>. *Biochemistry* 7: 3317-22.

Bogh MK, Schmedes AV, Philipsen PA, Thieden E, Wulf HC (2010). Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol* 130(2): 546-53.

Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, et al (2007). The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr* 86(4): 959-64.

Brandi ML, Minisola S (2013). Calcidiol [25(OH)D<sub>3</sub>]: from diagnostic marker to therapeutical agent. *Curr Med Res Opin* 29(11): 1565-72.

Brot C, Jorgensen NR, Sorensen OH (1999). The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *Eur J Clin Nutr* 53(12): 920-6.

Brouwer-Brolsma EM, van de Rest O, Tieland M, et al (2013). Serum 25-hydroxyvitamin D is associated with cognitive executive function in dutch prefrail and frail elderly: a cross-sectional study exploring the associations of 25-hydroxyvitamin D with glucose metabolism, cognitive performance and depression. *J Am Med Dir Assoc* 14(11): 852.e9-17.

Cade C, Norman AW (1986). Vitamin D<sub>3</sub> improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. *Endocrinology* 119(1): 84-90.

Cândido FG, Bressan J (2014). Vitamin D: link between osteoporosis, obesity, and diabetes? *Int J Mol Sci* 15(4): 6569-91.

Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF (1998). 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 128(1): 68-72.

Carbone LD, Rosenberg EW, Tolley EA, et al (2008). 25-Hydroxyvitamin D, cholesterol, and ultraviolet irradiation. *Metabolism* 57(6): 741-8.

Carnevale V, Modoni S, Pileri M, et al (2001). Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. *Osteoporos international* 12: 1026-30.

Cashman KD, Hill TR, Lucey AJ, et al (2008). Estimation of the dietary requirement for vitamin D in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 88(6): 1535-42.

Chan E, Lee HS, Hue SS (2001). Population pharmacokinetics of carbamazepine in Singapore epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* 51: 567-76.

Chan R, Chan D, Woo J, et al (2011). Association between serum 25-hydroxyvitamin D and psychological health in older Chinese men in a cohort study. *J Affect Disord* 130(1-2): 251-9.

Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al (1997). Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 7(5): 439-43.

Chen TC, Chimeh F, Lu Z, et al (2007). Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 460(2): 213-7.

Christensen MH, Lien EA, Hustad S, Almås B (2010). Seasonal and age-related differences in serum 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone in patients from Western Norway. *Scand J Clin Lab Invest* 70(4): 281-6.

Christie FT, Mason L (2011). Knowledge, attitude and practice regarding vitamin D deficiency among female students in Saudi Arabia: a qualitative exploration. *Int J Rheum Dis* 14(3): e22-9.

Chung HK, Cho Y, Choi S, Shin MJ (2014). The association between serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and depressive symptoms in Korean adults: findings from the fifth Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010. *PLoS One* 9(6): e99185.

Chung IH, Kim HJ, Chung S, Yoo EG (2014). Vitamin D deficiency in Korean children: prevalence, risk factors, and the relationship with parathyroid hormone levels. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 19(2): 86-90.

Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S (2014). Vitamin d and its relationship with obesity and muscle. *Int J Endocrinol* 2014: 841248.

Commission of the European Communities (1993) Vitamin D. In: Nutrient and energy intakes of the European community. Report of the Scientific Committee for Food (31st series) pp. 132-39, Brussels, Luxembourg. Available at: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out89.pdf> (last accessed Jun 2014).

Cutillas-Marco E, Fuertes-Prosper A, Grant WB, Morales-Suárez-Varela M (2012). Vitamin D deficiency in South Europe: effect of smoking and aging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 28(3): 159-61.

Dawodu A, Absood G, Patel M, et al (1998). Biosocial factors affecting vitamin D status of women of childbearing age in the United Arab Emirates. *J Biosoc Sci* 30(4): 431-7.

Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R (2005). Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 16(7): 713-6.

Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour J-P, et al (2010). IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporosis International* 21(7): 1151-4.

Dean AJ, Bellgrove MA, Hall T, et al (2011). Effects of vitamin D supplementation on cognitive and emotional functioning in young adults--a randomised controlled trial. *PLoS One* 6(11):e25966.

DeLuca H (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep* 3:479.

DeLuca HF (1979). The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutr Rev* 37: 161-193.

Didriksen A, Grimnes G, Hutchinson MS, et al (2013). The serum 25-hydroxyvitamin D response to vitamin D supplementation is related to genetic factors, BMI, and baseline levels. *Eur J Endocrinol* 169(5): 559-67.

Dlugos DJ, Perrotta PL, Horn WG (1995). Effects of the submarine environment on renal-stone risk factors and vitamin D metabolism. *Undersea Hyperb Med* 22(2): 145-52.

Dudani SJ, Kalhan S, Sharma SP (2011). Vitamin D and multiple sclerosis: Potential pathophysiological role and clinical implications. *Int J Appl Basic Med Res* 1(2): 71-4.

Duggan SN, O'Sullivan M, Hamilton S, Feehan SM, Ridgway PF, Conlon KC (2012). Patients with chronic pancreatitis are at increased risk for osteoporosis. *Pancreas* 41(7): 1119-24.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): F8-28.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2012). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of vitamin D. *EFSA Journal* 10(7): 2813.[45pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2813. Available at: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal). (Last accessed September 2014).

Engelsen O (2010). The relationship between ultraviolet radiation exposure and vitamin D status. *Nutrients* 2(5): 482-95.

Engelsen O, Brustad M, Aksnes L, Lund E (2005). Daily duration of vitamin D synthesis in human skin with relation to latitude, total ozone, altitude, ground cover, aerosols and cloud thickness. *Photochem Photobiol* 81(6): 1287-90.

Erlenfeld G, editor (2004). *Chromsystems: Reagent kits, instruments and controls*. Munchen: Chromsystems.

Ette EI, Williams PJ (2004). Population pharmacokinetics II: estimation methods. *Ann Pharmacother* 38: 1907-15.

European Commission (2002). Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin D.

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html) (Last accessed September 2014).

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005). Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 29(1): 21-30.

Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Féron F (2009). Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl 1): S265-77.

Feskanich D, Ma J, Fuchs CS, et al (2004). Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(9): 1502-8.

Fisher L, Byrnes E, Fisher AA (2009). Prevalence of vitamin K and vitamin D deficiency in patients with hepatobiliary and pancreatic disorders. *Nutr Res* 29(9): 676-83.

Fitzpatrick TB (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124(6): 869-71.

Flynn A, Hirvonen T, Mensink GB, et al (2009). Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food Nutr Res* 53. doi: 10.3402/fnr.v53i0.2038.

Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry Population Pharmacokinetics. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) February 1999 Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM072137.pdf>. (Last accessed Aug 2014)

Garland C, Gorham E, Mohr S, et al (2007). Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 708–11.

German Nutrition Society (2012). New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 60(4): 241-6.

Gilewski MJ, Zelinski EM, Schaie KW (1990). The Memory Functioning Questionnaire for assessment of memory complaints in adulthood and old age. *Psychol Aging* 5(4): 482-90.

Glumbic N, Djordjevic M (2011). Selektivna paznja dece sa intelektualnom ometenoscu. *Beogradska defektoloska skola* 17(2): 271-9.

Goel RK, Lal H (2011). Role of vitamin d supplementation in hypertension. *Indian J Clin Biochem* 26(1): 88-90.

González-Gross M, Valtueña J, Breidenassel C, et al (2012). HELENA Study Group. Vitamin D status among adolescents in Europe: the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence study. *Br J Nutr* 107(5): 755-64.

González-Molero I, Morcillo S, Valdés S, et al (2011). Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr* 65(3): 321-8.

González-Padilla E, Soria López A, González-Rodríguez E, et al (2011). [High prevalence of hypovitaminosis D in medical students in Gran Canaria, Canary Islands (Spain)]. *Endocrinol Nutr* 58(6): 267-73.

Guillemant J, Le HT, Maria A, Allemandou A, Pérès G, Guillemant S (2001). Wintertime vitamin D deficiency in male adolescents: effect on parathyroid function and response to vitamin D<sub>3</sub> supplements. *Osteoporos Int* 12(10): 875-9.

Haddock L, Corcino J, Vazques MD (1982). 25(OH)D serum levels in the normal Puerto Rican population and in subjects with tropical sprue and parathyroid disease. *P R Health Sci J* 1: 85-91.

Ham M, Longhi MS, Lahiff C, Cheifetz A, Robson S, Moss AC (2014). Vitamin D levels in adults with Crohn's disease are responsive to disease activity and treatment. *Inflamm Bowel Dis* 20(5): 856-60.

Han SS, Kim M, Lee SM, et al (2014). Association between body fat and vitamin D status in Korean adults. *Asia Pac J Clin Nutr* 23(1): 65-75.

Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A (2003). Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 22(2): 142-6.

Heymann W (1937). Metabolism and mode of action of vitamina D. IV. Impotance of bile in the absorption and excretion of vitamin D. *J Biol Chem* 122: 249-56.

Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Müller MJ, Scheidt-Nave C (2008). Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 62(9): 1079-89.

Hoang MT, Defina LF, Willis BL, Leonard DS, Weiner MF, Brown ES (2011). Association between low serum 25-hydroxyvitamin D and depression in a large sample of healthy adults: the Cooper Center longitudinal study. *Mayo Clin Proc* 86(11): 1050-5.

Holick MF (1995). Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 61(3 Suppl): 638S-645S.

Holick MF (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80(6Suppl): 1678S-88S.

Holick MF (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79: 362-71.

Holick MF (2007). Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 357(3): 266-81.

Holick MF (2008). Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 66(10 Suppl 2): S182-94.

Holick MF (2009). Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 19(2): 73-8.

Holick MF (2010). Nutrition and Health: Vitamin D. In: Chen TC, Zhiren Lu, Holick MF, editors. *Photobiology of Vitamin D*. Springer Science Business Media 35-60.

Holick MF (2013). Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults. *N Engl J Med* 369(21): 2047-8.

Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, et al (2008). Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 93(3): 677-81.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7): 1911-30.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al (2012). Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 97(4): 1153-8.

Holick MF, Chen TC (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87: 1080S–6S.

Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, et al (1980). Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210(4466): 203-5.

Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF (1971). Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D3 metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci* 68: 803–4.

Holick MF, Siris ES, Binkley N, et al (2005). Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90(6): 3215-24.

Hosseini-nezhad A, Holick MF (2013). Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 88(7): 720-55.

[Hovsepian S](#), [Amini M](#), [Aminorroaya A](#), [Amini P](#), [Iraj B](#) (2011). Prevalence of Vitamin D Deficiency among Adult Population of Isfahan City, Iran. *J Health Popul Nutr* 29(2): 149–55.

Hyppönen E, Power C (2007). Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 85(3): 860-8.

IOM (Institute of Medicine) (2010). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Available at: <http://www.iom.edu/~media/Files/Report%20Files/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-VitamiD/Vitamin%20D%20and%20Calcium%202010%20Report%20Brief.pdf>. (Last accessed September 2014)

IOM (Institute of Medicine) (2011). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press. Washington, DC: The National



Academies Press. Available at: <http://www.iom.edu/Reports/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D.aspx>. (Last accessed June 2014)

Jankovic SM (2011). Farmakologija i toksikologija. 3 izdanje. Medicinski fakultet u Kragujvcu.

Jones G, Prosser DE, Kaufmann M (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid* 55(1): 13-31.

Jorde R, Saleh F, Figenschau Y, Kamycheva E, Haug E, Sundsfjord J (2005). Serum parathyroid hormone (PTH) levels in smokers and non-smokers. The fifth Tromsø study. *Eur J Endocrinol* 152(1): 39-45.

Kalueff AV, Lou YR, Laaksi I, Tuohimaa P (2004). Increased anxiety in mice lacking vitamin D receptor gene. *Neuroreport* 15(8): 1271-4.

Kampmann U, Mosekilde L, Juhl C, et al (2014). Effects of 12weeks high dose vitamin D3 treatment on insulin sensitivity, beta cell function, and metabolic markers in patients with type 2 diabetes and vitamin D insufficiency - a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Metabolism* 63(9): 1115-24.

Kassi EN, Stavropoulos S, Kokkoris P, et al (2014). Smoking is a significant determinant of low serum vitamin D in young and middle-aged healthy males. *Hormones* doi: 10.14310/horm.2002.1521.

Kavarić S, Vuksanović M, Bozović D, et al (2013). Body weight and waist circumference as predictors of vitamin D deficiency in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Vojnosanit Pregl* 70(2): 163-9.

Kennedy DA, Cooley K, Skidmore B, Fritz H, Campbell T, Seely D (2013). Vitamin d: pharmacokinetics and safety when used in conjunction with the pharmaceutical drugs used in cancer patients: a systematic review. *Cancers* 5(1): 255-80.

Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R (2008). Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 45(4): 339-414.

Kimlin MG (2008). Geographic location and vitamin D synthesis. *Mol Aspects Med* 29(6): 453-61.

Kimlin MG, Olds WJ, Moore MR (2007). Location and vitamin D synthesis: is the hypothesis validated by geophysical data? *J Photochem Photobiol B* 86(3): 234-9.

Kjærgaard M, Waterloo K, Wang CE, et al (2012). Effect of vitamin D supplement on depression scores in people with low levels of serum 25-hydroxyvitamin D: nested case-control study and randomised clinical trial. *Br J Psychiatry* 201(5): 360-8.

Kostoglou-Athanassiou I, Athanassiou P, Lyraki A, Raftakis I, Antoniadis C (2012). Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Ther Adv Endocrinol Metab* 3(6): 181-7.

Kull M Jr, Kallikorm R, Tamm A, Lember M (2009). Seasonal variance of 25-(OH) vitamin D in the general population of Estonia, a Northern European country. *BMC Public Health* 9: 22.

Kumar AS, Suthar AR, Mahajan G, Kumar N, Mahajan V (2014). Prevalence of vitamin D deficiency in apparently healthy children in north India. *J Pediatr Endocrinol Metab* doi:10.1515/jpem-2013-0387.

Laktasic-Zerjavic N, Korsic M, Crncevic-Orlic Z, Anic B (2011). [Vitamin D: vitamin from the past and hormone of the future]. *Lijec Vjesn* 133(5-6): 194-204.

Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP (2007). Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 85: 1586-91.

Larose TL, Chen Y, Camargo CA Jr, Langhammer A, Romundstad P, Mai XM (2014). Factors associated with vitamin D deficiency in a Norwegian population: the HUNT Study. *J Epidemiol Community Health* 68(2): 165-70.

Larose TL, Chen Y, Camargo CA Jr, Langhammer A, Romundstad P, Mai XM (2014). Factors associated with vitamin D deficiency in a Norwegian population: the HUNT Study. *J Epidemiol Community Health* 68(2): 165-70.

Lee DM, Tajar A, Ulubaeu A, et al (2009). Association between 25-hydroxyvitamin D levels and cognitive performance in middle-aged and older European men. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 80(7):722–9.

Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110(2): 229-38.

Lindbom L, Ribbing J, Jonson EN (2004). Perl-speaks-NONMEM (PsN)-A Perl module for NONMEM related programming. *Comput Methods Programs Biomed* 75: 85-94.

Lips P (2007). Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)2D measurements. *J Bone Miner Res* 22(11): 1668-71.

Llewellyn DJ, Lang IA, Langa KM, Melzer D (2011). Vitamin D and cognitive impairment in the elderly U.S. population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66(1): 59-65.

Lo CW, Paris PW, Clemens TL, Nolan J, Holick MF (1985). Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr* 42(4): 644-49.

Longstreth JD, de Grujil FR, Kripke ML, Takizawa Y, van der Leun JC (1995). Effects of increased solar ultraviolet radiation on human health. *Ambio* 24: 153–65

Looker AC, Johnson CL, Lacher DA, et al (2011). Vitamin D status: United States, 2001-2006. *NCHS Data Brief* 59: 1-8.

Maddock J, Berry DJ, Geoffroy MC, Power C, Hyppönen E (2013). Vitamin D and common mental disorders in mid-life: cross-sectional and prospective findings. *Clin Nutr* 32(5): 758-64.

Maeda SS, Saraiva GL, Hayashi LF, et al (2013). Seasonal variation in the serum 25-hydroxyvitamin D levels of young and elderly active and inactive adults in São Paulo, Brazil: The São PAulo Vitamin D Evaluation Study (SPADES). *Dermatoendocrinol* 5(1): 211-7.

Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT (2003). Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol* 134: 128-32.

- Mailhot G (2012). Vitamin D bioavailability in cystic fibrosis: a cause for concern? *Nutr Rev* 70(5): 280-93.
- Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF (1998). Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 351: 805-6.
- Mallet E, Gaudelus J, Reinert P, et al (2014). Vitamin D status in 6- to 10-year-old children: A French multicenter study in 326 children. *Arch Pediatr pii: S0929-693X(14)00167-5*.
- Mansoor S, Habib A, Ghani F, et al (2010). Prevalence and significance of vitamin D deficiency and insufficiency among apparently healthy adults. *Clin Biochem* 43(18): 1431-5.
- Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF (1987). Sunscreens suppress cutaneous vitamin D<sub>3</sub> synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 1165–8.
- Meier M (2007). Chromsystems diagnostics by HPLC & LC-MS/MS. Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Munich. 1-18.
- Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG (2004). Iowa Women's Health Study. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 50(1): 72-7.
- Milaneschi Y, Hoogendijk W, Lips P, et al (2014). The association between low vitamin D and depressive disorders. *Mol Psychiatry* 19(4): 444-51.
- Miller WL, Portale AA (2000). Vitamin D 1 alpha-hydroxylase. *Trends Endocrinol Metab* 11(8): 315-9.
- Milovanovic JR, Jankovic SM (2005). Populaciona farmakokinetika. *Vojnosanitetski pegled* 11: 847-850.
- Milovanovic JR, Jankovic SM (2006). Nasa iskustva u terapijskom monitoring lekova. *Med časopis* 1-2: 19-23.
- Milovanovic JR, Jankovic SM (2009). Uloga i značaj populacione farmakokinetike. *Med časopis* 43(1) Suppl. 1: 21-22.

Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, et al (2009). IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 20(11): 1807-20.

Mohr SB (2009). A brief history of vitamin d and cancer prevention. *Ann Epidemiol* 19(2): 79-83

Moorthi RN, Kandula P, Moe SM (2011). Optimal vitamin D, calcitriol, and vitamin D analog replacement in chronic kidney disease: to D or not to D: that is the question. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20(4): 354-9.

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296(23): 2832-8.

Nakamura K, Nashimoto M, Okuda Y, Ota T, Yamamoto M (2002). Fish as a major source of vitamin D in the Japanese diet. *Nutrition* 18(5): 415-6.

Nasreddinne. Montreal Cognitive assessment - MoCA. Available at: <http://www.mocatest.org/default.asp>. (Last accessed: May 2012)

Nazarian S, St Peter JV, Boston RC, Jones SA, Mariash CN (2011). Vitamin D3 supplementation improves insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Transl Res* 158(5): 276-81.

Nicolaidou P, Hatzistamatiou Z, Papadopoulou A, et al (2006). Low vitamin D status in mother-newborn pairs in Greece. *Calcif Tissue Int* 78(6): 337-42.

Norman AW, DeLuca HF (1963). The preparation of <sup>3</sup>H- vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> and their localization in the rat. *Biochemistry* 2: 1160-8.

Nowson CA, Margerison C (2002). Vitamin D intake and vitamin D status of Australians. *Med J Aust* 177(3): 149-52.

Nutritional and environmental medicine (2010). Vitamin D. Available at: <http://www.birolab.co.uk/docs/vitd.pdf>. (Last accessed September 2014)

Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J (2003). Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *Proc Nutr Soc* 62(4): 813-21.

Pan A, Lu L, Franco OH, Yu Z, Li H, Lin X (2009). Association between depressive symptoms and 25-hydroxyvitamin D in middle-aged and elderly Chinese. *J Affect Disord* 118(1-3): 240-3.

Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C (2001). Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1633-7.

Pfeiffer CM, Schleicher RL, Johnson CL, Coates PM (2012). Assessing vitamin status in large population surveys by measuring biomarkers and dietary intake - two case studies: folate and vitamin D. *Food Nutr Res* 56. doi:10.3402/fnr.v56i0.5944.

Pfeiffer E (1975). A short portable mental status questionnaire for the assessment of organic brain deficit in elderly patients. *J Am Geriatr Soc* 23(10): 433-41.

Pike JW, Spanos E, Colston KW, MacIntyre I, Haussler MR (1978). Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1alpha,25-(OH)2D3 in chicks. *Am J Physiol* 235(3): E338-43.

Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR (2009). Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 6(10): 621-30.

Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, et al (2013). Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol* 64(4): 319-27.

Przybelski RJ, Binkley NC (2007). Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. *Arch Biochem Biophys* 460(2): 202-5.

Radlovic N, Mladenovic M, Simic D, Radlovic P (2012). Vitamin D in the light of current knowledge. *Srp Arh Celok Lek* 140(1-2): 110-4.

Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z (2007). Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5): 368-71.

Rastelli AL, Taylor ME, Gao F, et al (2011). Vitamin D and aromatase inhibitor-induced musculoskeletal symptoms (AIMSS): A phase II, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Breast Cancer Res Treat* 129: 107–116.

Reginster JY, Burlet N (2006). Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* 38(2 Suppl 1): S4-9.

Robinson CJ, Spanos E, James MF, et al (1982). Role of prolactin in vitamin D metabolism and calcium absorption during lactation in the rat. *J Endocrinol* 94(3): 443-53.

Roos B, Sneddon A, Macdonald H (2012). Fish as a dietary source of healthy long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA) and vitamin D. *Food and Health Innovation* 2012; 1-16. Available at: [https://www.abdn.ac.uk/rowett/documents/fish\\_final\\_june\\_2012.pdf](https://www.abdn.ac.uk/rowett/documents/fish_final_june_2012.pdf) (Last accessed October 2014)

Sahu M, Bhatia V, Aggarwal A, et al (2009). Vitamin D deficiency in rural girls and pregnant women despite abundant sunshine in northern India. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70(5): 680-4.

Salek M, Hashemipour M, Aminorroaya A, et al (2008). Vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in Isfahan, Iran. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116(6): 352-6.

Saneei P, Salehi-Abargouei A, Esmailzadeh A (2013). Serum 25-hydroxy vitamin D levels in relation to body mass index: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 14(5): 393-404.

Sayed-Hassan R, Abazid N, Alourfi Z (2014). Relationship between 25-hydroxyvitamin D concentrations, serum calcium, and parathyroid hormone in apparently healthy Syrian people. *Arch Osteoporos* 9: 176.

Schlögl M, Holick MF (2014). Vitamin D and neurocognitive function. *Clin Interv Aging* 9: 559-68.

Schmid A, Walther B (2013). Natural vitamin D content in animal products. *Adv Nutr* 4(4): 453-62.

Schmitz KJ, Skinner HG, Bautista LE, et al (2009). Association of 25-hydroxyvitamin D with blood pressure in predominantly 25-hydroxyvitamin D deficient Hispanic and African Americans. *Am J Hypertens* 22(8): 867-70.

Schoemaker RC, Cohen AF (1996). Estimation impossible curves using NONMEM. *Br J Clin Pharmacol* 42: 283-90.

Scragg R, Slow S, Stewart AW, et al (2014). Long-Term High-Dose Vitamin D3 Supplementation and Blood Pressure in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. *Hypertension pii: HYPERTENSIONAHA.114.03466*.

Seida JC, Mitri J, Colmers IN, et al (2014). Effect of Vitamin D(3) Supplementation on Improving Glucose Homeostasis and Preventing Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* jc20142136.

Shankar A, Sabanayagam C, Kalidindi S (2011). Serum 25-hydroxyvitamin d levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Diabetes Care* 34(5): 1114-9.

Shimoyamada A, Tomiyama S, Shimizu M, Yamamoto K, Kunii S, Yamada S (1997). In vivo metabolism of 24R,25-dihydroxyvitamin D3: structure of its major bile metabolite. *Biochim Biophys Acta* 1346(2): 147-57.

Shinkov A, Borissova AM, Dakovska L, Vlahov J, Kassabova L, Svinarov D (2014). Winter 25-hydroxyvitamin D levels in young urban adults are affected by smoking, bodymass index and educational level. *Eur J Clin Nutr* doi:10.1038/ejcn.2014.163.

Song GG, Bae SC, Lee YH (2012). Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 31(12): 1733-9.

Song M, Wu K, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci EL (2014). Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of colorectal cancer after adjusting for inflammatory markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* pii: cebp.0712.2014.



Song SJ, Zhou L, Si S, et al (2013). The high prevalence of vitamin D deficiency and its related maternal factors in pregnant women in Beijing. *PLoS One* 8(12): e85081. doi:10.1371/journal.pone.0085081.

Soni M, Kos K, Lang IA, Jones K, Melzer D, Llewellyn DJ (2012). Vitamin D and cognitive function. *Scand J Clin Lab Invest* 243: 79-82.

Sørensen IM, Joner G, Jenum PA, Eskild A, Torjesen PA, Stene LC (2012). Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetes* 61(1):175-8.

Spedding S (2014). Vitamin D and depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. *Nutrients* 6(4): 1501-18.

Spiro A, Buttriss JL (2014). Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition Bulletin* doi: 10.1111/nbu.12108.

Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board (1997). Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington (DC): National Academies Press (US). Vitamin D. Available from:

<http://www.nap.edu/openbook/0309063507/html/250.html>. (Last accessed Jun, 2014)

Steffensen LH, Jorgensen L, Straume B, Mellgren SI, Kampman MT (2011). Can vitamin D(3) supplementation prevent bone loss in persons with MS? A placebo-controlled trial. *J Neurol* 258: 1624–31.

Stokić E, Kupusinac A, Tomić-Naglić D, et al (2014). Obesity and Vitamin D Deficiency: Trends to Promote a More Proatherogenic Cardiometabolic Risk Profile. *Angiology* 21.

Tabesh M, Azadbakht L, Faghihimani E, Tabesh M, Esmailzadeh A (2014). Effects of calcium-vitamin D co-supplementation on metabolic profiles in vitamin D insufficient people with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial. *Diabetologia* PMID: 25005333.

Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF (2002). Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 112(8): 659-62.

Terushkin V, Bender A, Psaty EL, Engelsen O, Wang SQ, Halpern AC (2010). Estimated equivalency of vitamin D production from natural sun exposure versus oral vitamin D supplementation across seasons at two US latitudes. *J Am Acad Dermatol* 62(6): 929.e1-9.

Thompson GR, Lewis B, Booth CC (1966). Absorption of vitamin D<sub>3</sub>-<sup>3</sup>H in control subjects and patients with intestinal malabsorption. *J Clin Invest* 45(1): 94-102.

Tohidi M, Bozorgmanesh M, Mohebi R, et al (2013). Non-linear association between 25-hydroxyvitamin D and the incidence of type 2 diabetes: a community-based nested case-control study. *Diabet Med* 30(8): 934-8.

Trang HM, Cole DE, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R (1998). Evidence that vitamin D<sub>3</sub> increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D<sub>2</sub>. *Am J Clin Nutr* 68(4): 854-8.

Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Røsbjerg TE (2012). Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control* 23(2): 363-70.

Tsiaras WG, Weinstock MA (2011). Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 91(2): 115-24.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page. Available at: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. (Last accessed Jun 2013.)

Uddin R, Huda NH, Jhanker YM, Jesmeen T, Imam MZ, Akter S (2013). Awareness regarding the importance of calcium and vitamin D among the undergraduate pharmacy students in Bangladesh. *BMC Res Notes* 6: 134.

van der Schaft J, Koek HL, Dijkstra E, Verhaar HJ, van der Schouw YT, Emmelot-Vonk MH (2013). The association between vitamin D and cognition: a systematic review. *Ageing Res Rev* 12(4): 1013-23.

van Schoor NM, Knol DL, Deeg DJ, Peters FP, Heijboer AC, Lips P (2014). Longitudinal changes and seasonal variations in serum 25-hydroxyvitamin D levels in different age groups: results of the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Osteoporos Int* 25(5): 1483-91.

Vieth R (2005). *The Pharmacology of Vitamin D, Including Fortification Strategies* Feldman D, Pike JW and Gloreieux FH. In *Vitamin D*. Second Edition. Elsevier Academic Press 995-1018.

Vimalleswaran KS, Berry DJ, Lu C, et al (2013). Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 10(2):e1001383. doi: 10.1371/journal.pmed.1001383.

Vitamin D [editorial] (2008). *Alternative Medicine Review* 13(2): 153-164 Available at: <http://www.ibcleende.com/Vitamin%20D.PDF> (Last accessed June 2014)

Wacker M, Holick MF (2013). Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 5(1): 51-108.

Wacker M, Holick MF (2013). Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* 5(1): 111-48.

Weisman Y (2013). Vitamin D deficiency and insufficiency. *Isr Med Assoc J* 15(7): 377-8.

Whitehouse AJ, Holt BJ, Serralha M, Holt PG, Kusel MM, Hart PH (2012). Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring neurocognitive development. *Pediatrics* 129(3): 485-93.

Whyte PM, Thakker VR (2013). Rickets and osteomalacia. *Medicine* 41(10): 594-9.

Williams PJ, Ette EI (2000). The role of population pharmacokinetics in drug development in light of the Food and Drug Administration's 'Guidance for Industry: population pharmacokinetics'. *Clin Pharmacokinet* 39(6): 385-95.

Wilson VK, Houston DK, Kilpatrick L, et al (2014). Relationship between 25-hydroxyvitamin D and cognitive function in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 62(4): 636-41.

Wingate KE, Jacobson K, Issenman R, et al (2014). 25-Hydroxyvitamin D concentrations in children with Crohn's disease supplemented with either 2000 or 400 IU daily for 6 months: a randomized controlled study. *J Pediatr* 164(4): 860-5.

Wolf G (2004). The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 134(6):1299-302.

World Health Organisation. Cardiovascular disease (CVDs). Fact sheet N°317. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. (Last accessed: 27. August, 2014)

World Health Organisation. Latest world cancer statistics. Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. International Agency for Research on Cancer. Available at: [http://www.iarc.fr/en/mediacentre/pr/2013/pdfs/pr223\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/mediacentre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf) (Last accessed: August 2014)

Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72(3): 690-3.

Wu H, Gozdzik A, Barta JL, et al (2009). The development and evaluation of a food frequency questionnaire used in assessing vitamin D intake in a sample of healthy young Canadian adults of diverse ancestry. *Nutr Res*; 29(4): 255-61.

Wu SH, Ho SC, Zhong L (2010). Effects of vitamin D supplementation on blood pressure. *South Med J* 103: 729-37.

Yukawa E (1999). Population-based investigations of drug relative clearance using nonlinear mixed-effect modeling from information generated during the routine clinical care of patients. *J Clin Pharm Ther* 24: 103-13.

Zerwekh JE (2008). Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr* 87(4): 1087S-91S.

Zhang MY, Wang X, Wang JT, et al (2002). Dietary phosphorus transcriptionally regulates 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase gene expression in the proximal renal tubule. *Endocrinology* 143(2): 587-95.

Zhang R, Naughton DP (2010). Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr J* 9: 65.

Zipitis CS, Akobeng AK (2008). Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 93(6): 512-7.

Zung WW (1965). A self-rating depression scale. *Arch Gen Psychiatry* 12: 63-70.

Zung WW (1971). A rating instrument for anxiety disorder. *Psychosomatics* 12(6): 371-9.