



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET

Tatjana S. Stojšić Vuksanović

UTICAJ HOLEKALCIFEROLA NA
PROTEINURIJU KOD BOLESNIKA SA TIPOM
2 DIJABATESA MELITUS

doktorska disertacija

Novi Sad, 2020.

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF MEDICINE



Tatjana S. Stojšić Vuksanović

**INFLUENCE OF CHOLECALCIFEROL ON
PROTEINURIA IN PATIENTS WITH TYPE 2
DIABETES MELLITUS**

Doctoral Dissertation

Novi Sad, 2020.

Univerzitet u NovomSadu
Asocijacija centara za interdisciplinarne i
multidisciplinarne studije i istraživanja – ACIMSI
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacionibroj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora AU	Tatjana Stojšić Vuksanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Violeta Knežević
Naslov rada:	Uticaj holekalciferola na proteinuriju kod bolesnika sa tipom 2 dijabetesa mellitus
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemljapublikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet HajdukVeljkova 3 21000 Novi Sad
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja / 134 stranica / 16 slika / 32 tabela / 29 grafikona / 260 referenci / 3 priloga
Naučna oblast:	Medicina

NO

Naučna disciplina:

Nefrologija

ND

Predmetna odrednica, ključne reči:

dijabetesne nefropatije; dijabetes melitus tip 2; proteinurija; holkalciferol; vitamin D; deficijencija vitamina D; dijetetski suplementi; holesterol

PO

UDK

616.61:616.379-008.64]:577.161.2

616.633:577.161.2

Čuva se:

Univerzitet u Novom Sadu

ČU

Biblioteka Medicinskog fakulteta

Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija

Važna napomena:

VN

IZVOD:

IZ

Zastupljenost deficita vitamina D3 je mnogo veći kod bolesnika sa dijabetesnom bolesti tipa 2 nego u populaciji zdravih osoba. Bolesnici sa DM tipa 2 i deficitom vitamina D3 imaju veći rizik za razvoj dijabetesne nefropatije. Eksperimenti na životinjama i neka klinička istraživanja ukazuju da bi primena nižih doza vitamina D3 mogla imati renoprotektivno delovanje. Cilj istraživanja je bio da se utvrdi zastupljenost deficita vitamina D3 u populaciji bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom koja je definisana proteinurijom $>0,150$ g/du. Drugi cilj je bio da se utvrdi da li primena holkaciferola u dozi koja predstavlja razliku između utvrđenog i optimalnog nivoa vitamina D3 dovodi do statistički značajnog smanjenja proteinurije. Bolesnici sa dijabetesom tipa 2 i proteinurijom $>0,150$ g/du su uključivani u skrining na nivo vitamina D3 (25(OH)D) nakon čega su svrstavani u grupe sa deficitom i normalnim nivoom vitamina D3. Granična vrednost za utvrđivanje deficita vitamina D3 je određivana na osnovu tabele koja definiše ove vrednosti za svaki mesec tokom godine, posebno za muškarce i žene. Bolesnici sa deficitom vitamina D3 su podeljeni u 2 grupe od po 45 ispitanika. Studijska grupa je primala holkaciferol u dozi koja je izračunata na osnovu razlike između izmerene vrednosti i određenog optimalnog nivoa vitamina D3 od 90-100 nmol/L. Kontrolna grupa bolesnika je uzimala svoju uobičajenu terapiju. Istraživanje je trajalo 24 nedelje tokom koje su na drugi mesec praćeni parametri bubrežne funkcije, parametri inflamacije i koštanog metabolizma. Na početku i kraju istraživanja su određeni nivo vitamina D3 u studijskoj grupi, dok su u obe grupe određivani vrednost HbA1c i lipidni profil. Analizom dobijenih

podataka je utvrđeno da je zastupljenost deficita vitamina D3 kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom, uzimajući u obzir sezonske varijacije u nivou ovog vitamina, bila veća od vrednosti od 30-50% koje su postavljene u radnoj hipotezi. Učestalost bolesnika sa nedostatkom vitamina D3 je u ispitivanom uzorku je bila 82,56% , dok je normalne vrednosti vitamina D3 imalo 17,43% ispitanika, od toga je bilo 10 (52,63%) muškaraca i 9 (47,36%) žena. Sniženje vrednosti vitamina D3 u odnosu na donje granične vrednosti je bilo izraženije u letnjem periodu i bilo je statistički značajno kod svih ispitanika zajedno, potom u studijskoj grupi, dok je utvrđeno i u kontrolnoj grupi ali je u njoj bilo bez statističke značajnosti. Utvrđen je porast HbA1c koji je bio veći u kontrolnoj grupi ispitanika. Suplementacija vitaminom D3 je imala povoljan efekat na lipidni profil. Registrovan je porast vrednosti ukupnog holesterola koji je bio izraženiji u kontrolnoj grupi, pad vrednosti triglicerida u grupi bolesnika koji su uzimali vitamin D3 i njihov porast u kontrolnoj grupi ispitanika. U studijskoj grupi je registrovan porast vrednosti HDL-holesterola koji je bio na granici statističke značajnosti dok je istovremeno nađeno njegovo smanjenje u kontrolnoj grupi. Vrednost LDL-holesterola je ostala bez promene pod delovanjem vitamina D3, dok je u kontrolnoj grupi došlo do njegovog porasta. Utvrđeno je snižavanje vrednosti sedimentije, CRP-a i fibrinogena koje je bilo bez statističke značajnosti. Bezbednosni profil vrednosti kalcijuma u serumu i urinu tokom dugotrajnije primene je dobar. Primenom vitamina D3 je došlo do signifikatnog smanjenja proteinurije u grupi bolesnika koji su primali holkaciferol čime je ujedno i potvrđena radna hipoteza.

Datum prihvatanja teme od strane

30.05.2019.

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje /

KO

University of Novi Sad

ACIMSI

Key word documentation

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: Ph. D. Thesis
CC
Author: Tatjana Stojšić Vuksanović
AU
Mentor: Prof. dr Violeta Knežević
MN
Title: Influence of cholecalciferol on proteinuria in
TI patients with type 2 diabetes mellitus
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Serbian/English
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2020.
PY
Publisher: Author`s reprint
IZ
Publication place: Faculty of Medicine
PP Hajduk Veljkova 3
21000 Novi Sad

Physical description: 7 chapters / 134 pages/16 pictures / 32 tables / 29
FD graphs /260 references / 3 appendix
Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline
SD
Subject, Key words :

Nephrology

Diabetic Nephropathies; Diabetes Mellitus, Type 2; Proteinuria; Cholecalciferol; Vitamin D; Vitamin D Deficiency; Dietary Supplements; Cholesterol

UC

616.61:616.379-008.64]:577.161.2
616.633:577.161.2

Holding data:
HD

University of Novi Sad
Library of the Faculty of Medicine
Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia

Note:
N

Abstract:
AB

The prevalence of vitamin D3 deficiency is much higher in patients with type 2 diabetes than in the healthy population. Patients with type 2 DM and vitamin D3 deficiency are at increased risk for developing diabetic nephropathy. Animal experiments and some clinical studies suggest that administration of lower doses of vitamin D3 could have renoprotective effect. The aim of the study was to determine the prevalence of vitamin D3 deficiency in the population of patients with diabetic nephropathy defined by proteinuria >0.150 g / du. The second goal was to determine whether the use of cholecalciferol in a dose that represents the difference between the established and optimal levels of vitamin D3 leads to a statistically significant reduction in proteinuria. Patients with type 2 diabetes and proteinuria >0.150 g / du were screened for vitamin D3 (25 (OH) D) levels and then classified as deficient and normal vitamin D3. The limit value for determining vitamin D3 deficiency was set on the basis of a table defining these values for each month during the year, separately for men and women. Patients with vitamin D3 deficiency were divided into 2 groups of 45 subjects each. The study group received cholecalciferol at a dose calculated on the basis of the difference between the measured value and the set optimal vitamin D3 level of 90-100 nmol/L. The control group of patients was taking their usual therapy. The study lasted 24 weeks during which the parameters of renal function, parameters of inflammation and bone metabolism were monitored every second month. At the beginning and end of the study, the levels of vitamin D3 in the study group were determined, while in both groups HbA1c and lipid profile were determined. The analysis of the

obtained data showed that the prevalence of vitamin D3 deficiency in patients with diabetic nephropathy, taking into account seasonal variations in the level of this vitamin, was higher than the values of 30-50%, which were set in the working hypothesis. The frequency of patients with vitamin D3 deficiency in the study sample was 82.56%, while the normal values of vitamin D3 were in 17.43% of the subjects, of which 10 (52.63%) were men and 9 (47.36%) woman. The decrease in vitamin D3 compared to the lower limit values was more pronounced in the summer and was statistically significant in all subjects together, as well in the study group, while it was also found in the control group but was not statistically significant. An increase in HbA1c was found to be higher in the control group. Vitamin D3 supplementation had a beneficial effect on the lipid profile. An increase in the total cholesterol level that was more pronounced in the control group, a decrease in triglyceride values in the group of patients taking vitamin D3 and its increase in the control group of subjects were registered. An increase in HDL-cholesterol was reported in the study group, which was at the limit of statistical significance, while at the same time a decrease was found in the control group. LDL-cholesterol levels remained unchanged under the influence of vitamin D3, while in the control group it increased. The decrease in sedimentation, CRP and fibrinogen values was found to be of no statistical significance. The safety profile of serum and urine calcium during long-term administration is good. The use of vitamin D3 resulted in a significant decrease in proteinuria in the group of patients receiving cholecalciferol, which also confirmed the working hypothesis.

30.05.2019.

Accepted on Senate on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

Zahvaljujem se Prof. dr Ljubici Đukanović na srdačnoj podršci koju mi je pružala tokom mog celokupnog školovanja u oblasti nefrologije a posebno na entuzijazmu s kojim mi je pomagala u inicijalnoj fazi kada se ceo ovaj poduhvat činio kao teško i neizvesno putovanje u nepoznato. Njena topla i hrišćanski pružena ruka mi je dala snagu da se otisnem iz poznatog i krenem u ostvarenje svoje davnašnje težnje u ovo podvižništvo.

Takođe se zahvaljujem mentorki, Prof. dr Violeti Knežević koja me je prihvatila kao doktoranata sa iskrenim prijateljstvom i kvalifikovanom stručnošću. Njena jasnoća i konciznost u komentarima me je usmeravala da se krećem pravim i plodonosnim putem.

Od posebnog značaja mi je bila pomoć mojih kolega dijabetologa u OB Subotica, a posebno zalaganje dr. Ksenije Cvetković koja je sa iskrenim uverenjem u njihovu i moju dobrobit, usmeravala i motivisala bolesnike da se uključuju u ovo istraživanje.

Zahvaljujem se medicinskim sestrama na odeljenju Interno II što su pored svog redovnog posla imale dodatne snage da se angažuju i oko bolesnika koji su bili uključeni u istraživanje.

Bez tehničke pomoći Doc. dr Milana Ubavića i osoblja Medlaba, posebno zbog njihovog uverenja da svojim razumevanjem podržavaju plemeniti napor, važan deo u ovom radu bi bio teško ostvariv.

Doprinos Mr. sc dipl. ekon. Danka Đokovića u statističkoj obradi i oblikovanju ovog rada je izuzetan.

Moje je veliko lično zadovoljstvo bilo u iskrenoj podršci i pomoći mojih sestara Prof. dr Bojane Berić-Stojić i Prof. dr Ljubice Stojić Džunja koje su zdušno radile na doktorskom trijumviratu „tri sorele“.

Posebnu zahvalnost dugujem svim ispitanicima na njihovoj volji da učestvuju u istraživanju i doslednosti u pridržavanju svojih obaveza i kontrola.

Sada, na kraju ovog puta, sagledavam koliko je bila iskrena, duboka i postojana podrška mog suprugaa Miljana Vuksanovića. Bez njegove bezuslovne vere u mene ovaj put bi možda ostao i neostvaren.

Mojim sinovima Vladimiru i Stevanu, hvala što postoje i što mi našom emotivnom razmenom sve u životu čine lepšim.

Veliki je broj ljudi koji su se u nekom periodu rada na doktorkoj disertaciji uključivali svojim doprinosom, skoro po pravilu s lakoćom i iskrenom pomoći, što mi ukazuje da je ovo putovanje bilo obeleženo plemenitom energijom stvaralaštva koja se prenosila i bila podsticajna i za druge koji su se na tom putu našli.

Skraćenice:

1. ultravioletna B radijacija (UVB)
2. citohrom P 2R1 (CYP2R1)
3. vitamin D-vezujući protein (vitamin D-binding protein -DBP)
4. 1 α -hidroksilaza (CYP27B1)
5. Paratireoidni hormon (PTH)
6. fibroblastni faktor rasta-23 (fibroblast growth factor-23 -FGF-23)
7. vitamin D receptor (VDR).
8. retinoid X receptor α (RXR α)
9. N-terminalni kraj (domena) (NTD)
10. aktivaciona funkcije 1 (AF1)
11. DNA vezujuća domena (DNA binding domain - DBD)
12. ligand-vezujuća domena (LBD).
13. VDR vezujuća sekvenca (VDR binding sequences -VBSs)
14. natrijum-glukozni kotransporter (SGLT)
15. natrijum-hidrogen izmenjivač (NHE sodium–hydrogen antiporter)
16. transformišući faktor rasta (TGF Transforming growth factor)
17. bubrežni protok plazme (RPF Renal plasma flow)
18. Renin-Angiotenzin-Aldosteron systemRAS
19. angiotenzin konvertujući enzim (ACE- Angiotensin-converting enzyme)
20. Angiotenzinogen (AGT)
21. Angiotensin II tip1 receptor (AT1R)
22. kratki lanci masnih kiselina (SCFA Short-chain fatty acids)
23. SCFA receptor (SCFAR Short-chain fatty acids receptor)
24. Gproteinu –pridruženi receptori (protein-coupled receptors -GPCR).
25. Olfaktorni receptor (OlfR) 78
26. jukstaglomerulski aparat (JGA)
27. urinarni proteomiks CKD273 (chronic kidney disease (CKD)273)
28. JGF-jačina glomerulske filtracije
29. DN-dijabetesna nefropatija
30. slobodne masne kiseline-FFA free fatty acid
31. tubulointersticijska fibroza (TIF)
32. reaktivna kiseonička vrsta- reactive oxygen species (ROS)

33. natrijum glukozni kotransporter(sodium-glucose kotransporter - SGLT2)
34. inhibitori dipeptidil peptidase-4 (DPP-4)
35. 17 β -estradiol (E2)
36. peptid sličan glukagonu(glucagon-like peptide-1 - GLP-1)
37. epitelno mezenhimalna tranzicija(epitelial mesenhimal transition - EMT)
38. ekstracelularni matriks (ECM)
39. glatkomišićnićelijski aktin (smooth muscle actin-SMA)
40. TIF tubulo-intersticijalna fibroza
41. MMP2-metaloperoksidaza 2
42. Smad3 (protein koji je sličan produktu gena *Drosophila* - "majke protiv dekapentaplegika- mothers against decapentaplegic" (Mad) *engl*: similar to Mad-3")
43. GMB glomerulska bazalna membrana
44. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF Vascular endothelial growth factor)
45. transformišući faktor rasta beta (TGF-beta Transforming growth factor beta)
46. endotelna azotoksid sintetaza (eNOS)
47. mTORC 1(mammalian target of rapamycin -mTOR)
48. STAT3- Transduktor signala i aktivator transkripcijskih proteina (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins -STATs)
49. Janus kinaze (JAK)
50. translacijom kontrolisani tumorski protein (Translationally Controlled Tumor Protein - TCTP)
51. Ciklin zavisne kinaze inhibitor. CKI-Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
52. α -glatkomišićni aktin (α -smooth muscle actin - α -SMA)
53. fibroblast-specifični protein 1 (FSP1)
54. integrin vezane kinaze (integrin-linked kinase -ILK)
55. adenin dinukleotid fosfat (NADPH)
56. krajnji produkti glikolizacije (AGE-Advanced glycation end products).
57. Adenozin-monofosfat – aktivirane kinaze signalni put (AMPK)
58. faktor nekroze tumora α (TNF- α tumor necrosis factor),
59. interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) i interleukin-12 (IL-12)
60. receptor sličan toll genu (toll-like receptor-2, - TLR-2)
61. T-ćelijski specifični transkripcijski faktor (GATA-3)
62. mitogen aktivirane proteinske kinaze - mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

63. hepatičke zvezdaste ćelije (hepatic stellate cells- HSC)
64. SMAD (Similar mothers against decpeptid)
65. $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin D_3 -26,23-lakam (DLAM)
66. Renin-Angiotenzin-Aldosterone Sistem(RAS)
67. CYP24A1(24-hidroksilaza)
68. CYP27B1 (1α -hidroksilaza)
69. Insulinu sličan faktor rasta -1(IGF-1 insulin like growth factor-1),
70. ciklin zavisna kinaza (CDK)
71. ciklooksigenaza 2 (COX-2)
72. CD2-asocirani protein (CD2AP)
73. zonula occludens-1 (ZO-1)
74. monocitno hemoatraktni protein 1 (MCP-1)
75. urinarni albumisko kreatiniski odnos (UACRurin albumin creatinin ratio)
76. Institute of Medicine (IOM)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Metabolizam i fiziologija vitamina D	1
1.2.	Vitamin D receptori	3
1.2.1.	Struktura Vitamin D receptora	3
1.2.2.	Uloga VDR-a	6
1.2.3.	Genski polimorfizam VDR-a	6
1.2.4.	Ekstrarenalna distribucija VDR i 1 alfa-hidroksilaze	7
1.3.	Dijabetesna nefropatija	8
1.3.1.	Mehanizmi oštećenja u DN	8
1.3.1.1.	Hiperfiltracija	8
1.3.1.2.	Renin-Angiotenzin-Aldosteron system	10
1.3.1.3.	Tubulointersticijska fibroza i epitelna mezenhimalna transformacija	12
1.3.1.4.	Mezangijumska proliferacija	15
1.3.1.5.	Zadebljanje glomerulske bazalne membrane	15
1.3.1.6.	Uloga Vaskularnog Endotelnog Faktora rasta (VEGF)	16
1.3.1.7.	Uloga TGF- β 1	19
1.3.2.	Uloga podocita u oštećenju u dijabetesnoj nefropatiji	20
1.3.2.1.	Patomehanizmi oštećenja podocita	20
1.3.2.1.1.	Hipertrofija podocita	20
1.3.2.1.2.	Podocitna Epitelno-mezenhimalna tranzicija	22
1.3.2.1.3.	Odvajanje podocita	22
1.3.2.1.4.	Apoptoza podocita	24
1.3.2.2.	Glavni signalni putevi u mehanizmu oštećenja podocita u DN	24
1.3.2.2.1.	Adenozin monofosfat – aktivirane kinaze signalni put (AMPK) u DN	24
1.3.2.2.2.	Wnt/ β -Katenin Signalini put u DN	24
1.3.2.2.3.	Signalni putevi uslovljeni stresom endoplazmatskog retikuluma	25
1.3.2.2.4.	mTOR signalni putevi posredovani autofagijom u DN	25
1.3.2.2.5.	Rho/ROCK signalini put u DN	25
1.4.	Plejotropna dejstva vitamina D	26
1.4.1.	Anti-inflamatorno dejstvo	26
1.4.2.	Antiapoptotično i antifibrotično dejstvo Vitamina D	28

1.4.3.	Antifibrotično delovanje	30
1.4.4.	Delovanje na eritropoezu	32
1.4.5.	Vitamin D i Renin-Angiotenzin-Aldosterone Sistem (RAAS)	33
1.4.6.	Antineoplastično delovanje	33
1.5.	Uticaj vitamina D na proteinuriju	36
1.5.1.	Mehanizmi delovanja kojima vitamin D utiče na smanjenje proteinurije	36
1.5.1.1.	Direktni mehanizmi delovanja	36
1.5.1.1.1.	Glomerul (podociti i mezangijumskećelije)	36
1.5.1.1.2.	Tubulointersticijum (tubularne epitelnećelije i intersticijski fibroblasti)	37
1.5.1.2.	Indirektnimehanizmi delovanja	38
1.5.1.2.1.	Inflamacija	38
1.5.1.2.2.	RAAS	39
1.5.1.2.3.	Insulinska sekrecija i senzitivnost	39
1.6.	Kliničke studije uticaja vitamina D na proteinuriju	40
1.7.	Sezonske varijacije vrednosti vitamina D i njihov značaj u kliničkim sudijama	42
2.	CILJEVI I HIPOTEZE	53
2.1.	Ciljevi rada	53
2.2.	Hipoteze	53
3.	MATERIJAL I METODE	54
3.1.	Koncept studije	54
3.2.	Ispitanici	55
3.2.1.	Kriterijumi za uključivanje bolesnika u sudiju	55
3.2.2.	Kriterijumi za isključenje bolesnika iz studije	55
3.3.	Primenjene metode	56
3.4.	Statistička metodologija	58
4.	REZULTATI	59
4.1.	Deskriptivna statistika	61
4.1.1.	Vrednosti vitamina D3 pri uključenju i tokom praćenja	61
4.1.2.	Metabolički pokazatelji	65
4.1.3.	Parametari glikoregulacije	66
4.1.4.	Lipidni parametri	66
4.1.5.	Parametri bubrežne funkcije	68
4.1.6.	Parametri inflamacije	69

4.1.7.	Parametri metabolizma kostiju	72
4.2.	Korelaciona statistika	74
4.3.	Prosta linearna kvadratna regresiona analiza delovanja vitamina D3 na NLR kod žena i muškaraca	76
4.4.	Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu – ceo uzorak	77
4.5.	Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu – po polu	81
4.5.1.	Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu – za žene	81
4.5.2.	Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu – za muškarce	85
4.6.	Trodimenzionalni grafici kretanja pojedinih zavisnih varijabli u studijskoj grupi u zavisnosti od odabranih nezavisnih varijabli	87
5.	DISKUSIJA	92
5.1.	Prevalencija deficita vitamina D3 kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom	93
5.2.	Uticaj primene holekaciferola na metaboličke parametre	96
5.3.	Uticaj primene holekaciferola na parametre inflamacije	97
5.4.	Uticaj primene holekaciferola na lipidne parametre	99
5.5.	Uticaj primene holekaciferola na parametre koštanog metabolizma	102
5.6.	Uticaj primene holekaciferola na parametre bubrežne funkcije	105
6.	ZAKLJČCI	109
7.	LITERATURA	112
	PRILOZI	
	I Informisani pristanak ispitanika u eksperimentalnoj grupi	
	II Informisani pristanak ispitanika u kontrolnoj grupi	
	III Biografija	

1. UVOD

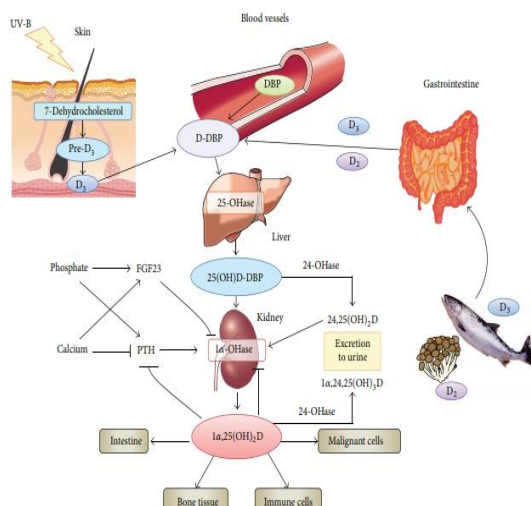
1.1. Metabolizam i fiziologija vitamina D

Vitamin D je liposulubilni steroidni hormon koji se u organizam unosi hranom ili se stvara sintezom u koži pod dejstvom sunčeve svetlosti. Vitamin D₃ (holecalciferol) i vitamin D₂ (ergokalciferol) nastaju pod uticajem sunčeve ultravioletne B radijacije (UVB) talasne dužine 290 do 315 nm.

Najvećim delom 25-hidroksivitamin D₃ (25[OH]D) nastaje konverzijom u koži. Alternativni izvor je dijetalni unos uglavnom iz namirnica biljnog i životinjskog porekla. Životinjske namirnice i riba sadrže uglavnom vitamin D₃, dok gljive sadrže vitamin D₂.

Vitamin D se uglavnom deponuje u masnom tkivu i konvertuje se u 25(OH)D u jetri. U daljem procesu prolazi dve hidroksilacije, prva se odvija u jetri gde se D vitamin metaboliše u 25(OH)D pod dejstvom citohrom P 2R1 (CYP2R1). 25(OH)D dospeva u cirkulaciju vezivanjem za vitamin D-vezujući protein (vitamin D-binding protein - DBP) gde se nalazi u stabilnoj formi (1).

25(OH)D-DBP kompleks se izlučuje putem urina i reabsorbuje se preko megalina koji je višestruko sakupljajući (multiligand scavenger) receptor u proksimalnim kanalićima (2), u kojima se 25(OH)D konvertuje pod delovanjem 25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilaze (CYP27B1) i prelazi u svoju aktivnu formu 1,25-dihidroksivitamin (OH)₂D. Ova konverzija se odvija i u drugim tkivima koja poseduju 1 α -hidroksilaznu aktivnost. Ispoljavanje CYP27B1 gena u bubrezima je pod uticajem različitih faktora. Paratireoidni hormon (PTH), hipokalcemija, hipofosfatemija i kalcitonin utiču na aktivaciju CYP27B1 i povećavaju nivo 1,25-(OH)₂D. Nasuprot tome, 1,25-(OH)₂D i fibroblastni faktor rasta-23 (fibroblast growth factor-23 - FGF-23) inhibiraju CYP27B1 i time smanjuju nivo 1,25-(OH)₂D (3).



Slika 1. Metabolizam vitamina D (4)

1,25(OH)₂D ispoljava delovanje vezivanjem za vitamin D receptore (VDR). 1,25(OH)₂D utiče na reapsorbciju kalcijuma i fosfata iz hrane u crevima i reguliše reapsorbciju kalcijuma u bubrežnim tubulima (1).

Smatra se da je 25(OH)D jedini prekursor 1,25(OH)₂D i da njegova koncentracija u serumu ima klinički značaj. 25(OH)D ima slab kapacitet vezivanja za VDR i ima značajno višu koncentraciju u serumu nego što je koncentracija 1,25(OH)₂D (Tabela 1.).

Tabela 1: Karakteristike 25-hidroksivitamina D i 1,25-dihidroksivitamina D (4)

	Affinity to vitamin D receptor	Serum total concentration	Half-life	Risk of hypercalcemia
25(OH)D	(1)*	9.0–34.0 ng/mL (500)*	480 hrs	Low
1,25(OH) ₂ D	(100–200)*	20–60 pg/mL (1)*	15 hrs	High

Različite vanbubrežne ćelije ispoljavaju megalin i kubilin kao i 1α-hidroksilazu [8, 9]. 25(OH)D biva preuzet u ove ćelije preko megalina i kubilina nakon čega 25(OH)D biva lokalno konvertovan u 1,25(OH)₂D kada ispoljava autokrino i parakrino dejstva (4).

Vitamin D vezujući protein - DBP je primarno transportni protein za 25(OH)D u cirkulaciji, pri čemu je 88% 25(OH)D vezano za DBP. On takođe ima i ulogu nosača za metabolite vitamina D, a ispoljava i antiinflamatornu i imunomodulatornu funkciju (5).

Mnoge do sada objavljene studije ne daju dosledne rezultate u odnosu na neklasična plejotropna dejstva vitamina D u različitim bolestima, što može biti posledica različite bioraspodivnosti vitamina D i genetskog polimorfizma DBP (6). 25(OH)D – DBP ne

ispoljava dejstvo na ciljne ćelije, ovaj efekat imaju samo slobodni, nevezani 25(OH)D koji čini manje od 1% ukupnog 25(OH)D kao i albuminska i lipoproteinski vezana frakcija 25(OH)D (10-15% ukupnog 25(OH)D) koji su bioraspoloživi (7).

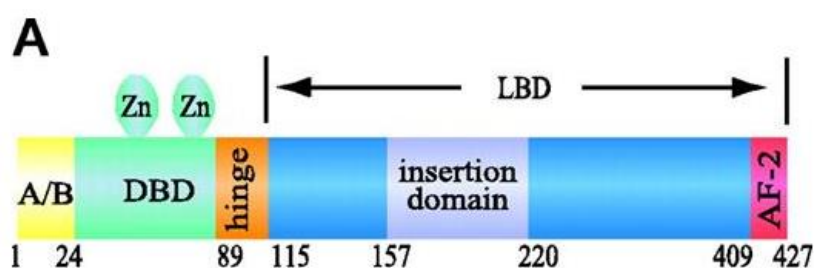
Jedinstvena kombinacija dva različita genska polimorfizma na rs7041 i rs4588 indukuju promene amino kiselina koje imaju za rezultat 3 različita fenotipa DBP (Gc1F, Gc1S, i Gc2) koji ispoljavaju različite kapacitete za vezivanje 25(OH)D. Ovaj nalaz sugeriše da individualni status serumskog 25(OH)D ne može biti utvrđen dok se ne ispita DBP fenotip (4).

1.2. Vitamin D receptori

1.2.1. Struktura Vitamin D receptora

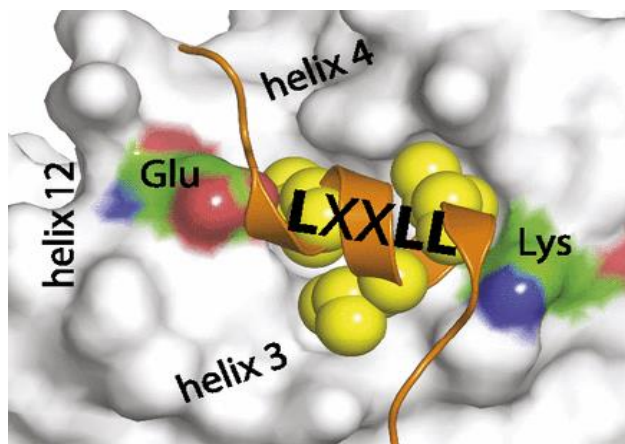
Vitamin D receptor (VDR), pripada superfamiliji nuklearnih receptora (NR) koji su uključeni u homeostazu kalcijuma i koštane mineralizacije kroz transkripcionu kontrolu VDR ciljnih gena u različitim tkivima (8).

VDR je ligand-zavistan transkripcioni faktor koji formira heterodimer sa retinoid X receptorom α (RXR α) (9). VDR i RXR α , kao i ostali NR se sastoje iz 4 funkcionalne domene. Slika 2.



Slika 2. Struktura domena VDR-a. Funkcionalni domeni VDR: A/B, Amino-terminalni region; DBD, DNA-binding domena (DBD) region koji ima cink (Zn) prstaste module; ligand-binding domena (LBD), uključujući dugi insercioni domen i heliks 12 obuhvatajući i AF-2 domen (aktivacione funkcije -2)(10)

N-terminalni kraj (domena) (NTD) se sastoji iz aktivacione funkcije 1 (AF1) koji olakšava ligand-nezavisnu aktivaciju receptora. Neposredno uz NTD se nalaze dva DNA vezujuća domena (DNA binding domain - DBD) u obliku prstatstih modula koji sadrže cink (Zn) i fleksibilnu zglobnu domenu koja je vezana za DBD i ligand-vezujuću domenu (LBD). LBD se sastoji iz tri β ploče i 12 spirala. Spirale 3, 5 i 12 LBD-a služe kao ligand-zavisna aktivaciona funkcija (AF2) i kao površina za komplementarno vezivanje ko-regulatornih proteina (11). Slika 3.



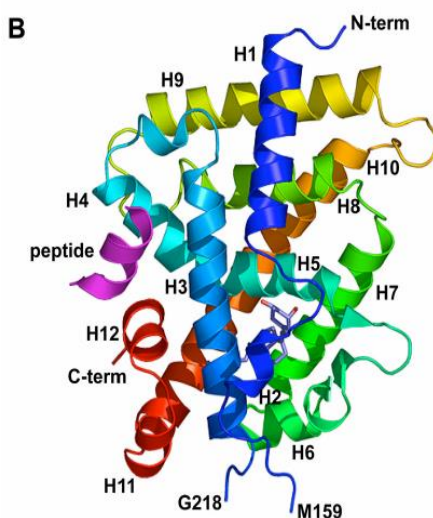
Slika 3. Mesto vezivanja koaktivatora u LBD koje predstavlja površinu na kojoj se susreće nekoliko elemenata LBD-a koji uključuju i helikse 3, 4, i 12.- mesto aktivacione funkcije 2 (AF 2) (11)

Ovi ko-regulatorni proteini mogu da ispolje aktivnost koja remodeluje hromatin ili predstavljaju platformu za vezivanje remodelirajućih enzima za receptorski kompleks. Receptorski agonisti podstiču interreakciju između koaktivatorskih proteina sa aktivnošću acetil transferaze u histonu čime se relaksira hromatin, dok antagonisti podstiču interreakciju sa ko-represorskim proteinima i aktivnošću deacetilaze u histonu, što dovodi do kondenzacije hromatina (12).

NR menjaju proces transkripcije vezujući se za specifične DNK sekvence (responsivne elemente) unutar promoterskih regiona ciljnih gena, nakon čega privlače hromatin remodelirajuće enzime koji olakšavaju ili blokiraju vezivanje DNK polimeraze II.

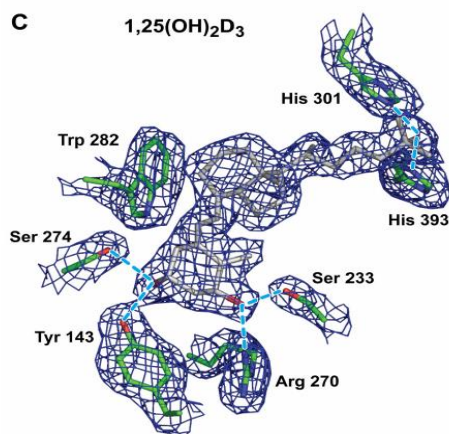
Nakon vezivanja liganda, nastali heterodimer VDRXR α se translocira i povezuje sa genomskom DNK. VDRXR α heterodimer se vezuje visokim afinitetom za kratku DNK sekvencu poznatu kao VDR vezujuća sekvenca (VDR binding sequences -VBSs) koja se tipično heksamerno ponavlja po shemi 5'-AGGTCA-3', a navedene sekvence su odvojene međusobno baznim parovima (13).

C-terminalni region molekula, čija je trodimenzionalna struktura utvrđena X zračnom kristalografijom (4) je najkompleksniji i sastoji se od 12 α -heliksa. Slika 4B.



Slika 4B. Kristalna struktura VDR ligand vezujućeg domena koji se sastoji od 12 α -heliksa (H1–H12). Prikazani su i N-terminalni i C-terminalni deo molekula (14)

Aminokiseline kontaktiraju unutar ovih podskupova α -heliksa, i formiraju dinamički ligand vezujući džep. Slika 4C.



Slika 4C. Mapa elektronske gustine 1,25(OH)₂D₃ i susjednih amino kiselina VDR proteina koji ostvaruju direktan kontakt sa ligandom (15)

1.2.2. Uloga VDR-a

Uloga ligand aktiviranog VDR-a je u usmeravanju procesa ćelijske transkripcije ka specifičnim mestima u genomu gde ovi kompleksi utiču na stvaranje iRNK koja potom kodira proteine svojstvene određenim biološkim aktivnostima.

Na ovaj način 1,25(OH)₂D₃ ima centralnu ulogu u regulisanju mineralnog metabolizma svojim delovanjem na crevne i bubrežne epitelne ćelije kao i na specifične koštane ćelije. Takođe, vitamin D reguliše i gensku mrežu koja je uključena u metabolizam žučnih soli u kolonu i u diferencijaciji keratinocita u koži, razvoj i održavanje ciklusa dermalnih folikula dlake, i funkciji ključnih ćelija urođenog i stečenog imuniteta (16, 17, 18, 19).

1.2.3. Genski polimorfizam VDR-a

Više od polovine odraslih osoba u razvijenim zemljama nema potreban nivo vitamina D. Ova disfunkcija može biti delom urođena ili može biti posledica VDR polimorfizma koji se danas smatra za osnovni razlog nasleđene disfunkcije VDR-a.

Do sada je identifikovano nekoliko VDR genskih polimorfizama koje imaju sposobnost da menjaju aktivnost VDR-a. Glavni funkcionalni lokusi VDR gena su FokI (rs2228570, u eksonu 2), BsmI (rs1544410u intronu 8), ApaI (rs7975232) i TaqI (rs731236) i svi su locirani između 8 i 9 eksona osim FokI koji je u eksonu 9 (20).

Neki od utvrđenih polimorfizama su udruženi sa dijabetesnom bolešću tipa 2, i sa insulinskom sekrecijom (21).

Sugerisano je da dužina VDR-a, koja je promenljiva u sklopu genskog polimorfizma, može imati za posledicu sniženu aktivaciju u ciljnim ćelijama, budući da duži VDR protein ima smanjenu transkripcionu aktivnost. Utvrđena je povezanost između komponenti metaboličkog sindroma i prisustva polimorfizma u VDR genu [VDR 1544410 A>G (BsmI); VDR 2228570 C>T (FokI)] kod odraslih osoba Brazila. Nađena je povezanost VDR genskog polimorfizma sa insulinskom sekrecijom, insulinskom rezistencijom i nivoom HDL-holesterola (21).

Ispitivanjima su utvrđene u mnogim populacijama klinički značajne varijante VDR polimorfizma koje su navedene u tabeli 2.

Tabela 2. Klinički značaj VDR genskog polimorfizma (22)

Table I: Clinical significance of VDR gene polymorphism.

No.	VDR gene variant	Phenotype/disease
1	CDx-2	Hip fracture incidence Prostate cancer
2	<i>FokI</i>	Baseline airways obstruction Prostate cancer Tuberculosis Breast cancer Fracture risk
3	rs3782905	Asthma and allergy skin test
4	rs2239179	Bronchodilator responsiveness
5	rs1540339	Bronchodilator responsiveness
6	rs2239185	Asthma, serum total IgE level and allergy skin test response
7	Bsml (rs1544410)	Bronchodilator responsiveness, breast cancer and osteoporosis therapy efficacy
8	Apal (rs7975232)	Asthma, serum total IgE level, allergy skin test response and TB
9	TaqI (rs731236)	Asthma, serum total IgE level, atopy, TB, osteoporosis and prostate cancer

1.2.4. Ekstrarenalna distribucija VDR i 1 alfa hidroksilaze

VDR je najizraženiji u tankom crevu, debelom crevu, bubregu, kostima i koži ali je prisutan i u mnogim drugim tkivima kao što su mozak, vaskularni sistem, brojni endokrini organi, imunološki sistem, mišići, itd. Ova pojava je značajna zbog istovremene ekspresije i ekstrarenalne 1 alfa hidroksilaze CYP27B1 (23) koja katalizuje lokalno stvaranje 1,25(OH)2D3, što objašnjava mnoge u novije vreme otkrivene zdravstvene benefite vitamina D koji su izvan delovanja na koštani metabolizam.

1.3. Dijabetesna nefropatija

Dijabetesna nefropatija je definisana prisustvom perzistentne albuminurije >300 mg/24h ili albuminsko / kreatininskog odnosa (ACR) >300 mg/g koji je potvrđen u najmanje 2 od 3 uzorka urina, sa istovremeno postojećom dijabetičnom retinopatijom i odsustvom znakova drugih bubrežnih bolesti (24, 25).

1.3.1. Mehanizmi oštećenja u DN

1.3.1.1. Hiperfiltracija

Osnovni hemodinamski poremećaj koji se javlja u ranom stadijumu dijabetesne nefropatije je renalna hiperfiltracija. Smatra se da je granična vrednost JGF koja definiše hiperfiltraciju između 130 i 140 ml/min/ $1,73$ m² (26), što predstavlja 2 SD iznad srednje vrednosti JGF kod zdravih osoba (27).

Tokom razvoja DN dovodi do nepovratnog oštećenja sve većeg broja glomerula, dok preostali nefroni (glomeruli i tubuli) podležu funkcionalnoj i strukturnoj hipertrofiji sa ciljem održanja procesa filtracije i reapsorpcije u normalnom obsegu.

Nezavisno od funkcionalne bubrežne mase, metabolički i neuro-hormonalni stimulusi u dijabetesnoj bolesti pojačavaju filtraciju po nefronu. U razvoju DN proces hiperfiltracije se javlja u dva stadijuma. U početnom stadijumu kada je u potpunosti očuvana ukupna masa nefrona, hiperfiltracija se odvija putem stalne stimulacije funkcionalne rezerve bubrega kao i u kasnijem toku razvoja bolesti kada je oštećeno oko 50% nefronske mase. Dakle, JGF može biti normalna čak i kada postoji značajan gubitak nefrona, što su dokazale i novije autopsijske studije (28). Renalna funkcionalna rezerva se definiše kao sposobnost bubrega da poveća svoju funkciju u određenim fiziološkim stanjima (napr. povećani unos belančevina ili tečnosti, trudnoća) ili u bolestima (dijabetes, HBI) (29).

U početnoj fazi razvoja dijabetesne bolesti dolazi do uvećanja ukupne mase bubrega koje nastaje kao posledica uvećanja svakog pojedinačnog nefrona a pri čemu je najizraženija hipertrofija proksimalnog tubula. Ovaj fenomen uzrokuju različiti citokini i faktori rasta kao odgovor na hiperglikemiju. Hormon rasta i insulinu nalik hormon rasta (IGF) dovode do

povećanja ukupnog protoka krvi kroz bubrege, bez uticaja na arteriole, dok glukagon i vazopresin dominantno deluju preko TGF (30).

Ne može se sa sigurnošću utvrditi uzročna posledična veza između uvećanja bubrega i hiperfiltracije. Neke studije ukazuju da se kompenzatorna hipertrofija javlja kao posledica hiperfiltracije (30), dok druge ukazuju na značaj inicijalne tubularne hipertrofije. Naime uvećanje tubula regredira sporo i normalizacija bubrežne veličine se kod bolesnika ne može postići ni nakon striktne glikemijske kontrole (27).

Prema “vaskularnoj teoriji”, hiperfiltracija nastaje kao posledica disbalansa vazoaktivnih humoralnih faktora koji kontrolišu tonus pre i postglomerularne arteriole.

Prema “tubularnoj teoriji” hiperfiltracija nastaje kao posledica poremećaja u sistemu interakcije između glomerula i tubula. Zbog pojačane reapsorpcije natrijuma i glukoze u hipertrofičnom proksimalnom tubulu usled pojačane aktivnosti natrijum-glukoznog kotransportera (SGLT-a) i natrijum-hidrogen izmenjivača (NHE), dolazi do smanjenja rezistencije u aferentnoj arterioli i porasta JGF po nefronu zbog inhibicije transformišućeg faktora rasta (TGF) (31). Hiperreapsorpcija u proksimalnim tubularnim ćelijama smanjuje intratubularni pritisak i pritisak u Bowmanovom prostoru što dalje podstiče hiperfiltraciju zbog povećanja gradijenta hidrauličnih pritisaka (32).

U velikoj “studiji istraživača” Ruggentija i sar. koja je rađena na 600 bolesnika utvrđeno je da je perzistentna glomeruluska hiperfiltracija nezavisni prediktor ubrzanog smanjenja JGF i progresije ka mikro-makroalbuminuriji, dok smanjenje hiperfiltracije deluje zaštitno u odnosu na razvoj bubrežnog oštećenja (33).

Budući da su povećana reapsorpcija glukoze i natrijuma pod uticajem natrijum-glukoznog kotransportera 2 (SGLT-2) uključeni u proces početnog razvoja DN, primena SGLT-2 inhibitora bi mogla biti korisna u kontroli hiperfiltracije u dijabetesu. Novija klinička ispitivanja pokazuju da SGLT 2 inhibitori doprinose usporenju progresije bubrežne slabosti kod obolelih od dijabetesne bolesti tipa 2. Primena empaglifozina je bila povezana sa smanjenjem azot oksida (NO) i efektivnog bubrežnog protoka plazme (RPF) kao i sa povećanjem vaskularne rezistencije putem pre-glomerularne vazokontrikcije (34).

1.3.1.2. Renin-Angiotenzin-Aldosteron sistem

RAAS ispoljava delovanje na sistemskom i lokalnom nivou: cirkulatorni RAAS utiče na regulaciju pritiska i homeostazu tečnosti, dok lokalni RAAS deluje na nivou tkiva i organa. Bubrežni je jedinstven po tome što sadrži receptore za Ang II u bubrežnim tubulima, intersticijumu čak i unutar ćelija (35). Angiotenzin II nastaje iz Ang I pod delovanjem angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE), koji je prisutan u endotelnim ćelijama bubrežnih krvnih sudova i u tubularnim ćelijama. Angiotenzinogen (AGT) se stvara lokalno u proksimalnim tubularnim ćelijama koji se pod dejstvom renina pretvara u Ang I koji ispoljava svoje delovanje unutar bubrežnih struktura.

Višestruke aktivnosti Ang II unutar samog bubrega se pokreću prilikom njegovog vezivanja za Ang II tip 1 receptore (AT₁R) koji se nalaze u bubrežnim arteriolama, glomerulskim mezangijskim ćelijama i membrani tubulskih ćelija (36). Kompleks Ang II – AT₁R dovodi do konstrikcije aferentne i eferentne arteriole, uzrokuje suženje mezangijumskih ćelija i smanjuje medularni protok krvi (37).

Pored klasične blokade dejstva Ang II (1-8), novija istraživanja ukazuju da se dobri rezultati postižu podsticanjem njegove degradacije. Angiotenzin konvertujući enzim 2 (ACE2) je monokarboksipeptidaza koja cepa Ang II (1-8) do Ang (1-7), peptida sa korisnim anti-zapaljenskim i anti-proliferativnim delovanjem (38).

Pokazano je da nedostatak ACE2 može da pogorša bubrežno zapaljenje i fibrozu koji nastaju pod uticajem Ang II. ACE2 takođe deluje zaštitno u odnosu na endotelnu funkciju i njegovo pojačano stvaranje inhibira produkciju kolagena, što usporava progresiju DN (39).

ACE i ACE2 balans intrarenalnog RAAS-a može biti poremećen promenom u sastavu crevnih mikroorganizama-mikrobioma i njegovih metabolita, koji zajedno sa spoljnim stimulusima kao što su hiperglikemija, uremijski toksini itd., mogu da dovedu do progresije DN (35).

Metaboliti crevnog mikrobioma imaju mnoge patofiziološke efekte među kojima su kratki lanci masnih kiselina (Short Chain Fatty Acids - SCFA) veoma značajni u održavanju zdravlja kao i u nastanku nekih bolesti. Pluznick J i sar. su utvrdili da SCFA receptori (Short Chain Fatty Acids Receptors - SCFAR) koji se ispoljavaju na jukstaglomerularnoj aferentnoj arterioli mogu da utiču na sekreciju renina kao odgovor na signale iz crevnog mikrobioma.

SFCA prelaze iz creva preko transportera i vezuju se za odgovarajuće G proteinu - pridružene receptore (protein-coupled receptors - GPCR). GPR43 i Olfaktorni receptor (Olfcr) 78 su funkcionalni receptori za SFCA i oni učestvuju u fiziološkom odgovoru na signal iz crevnog mikrobioma.

Olfcr78 je otkriven u aferentnoj arterioli jukstaklomerulskog aparata (JGA), u kojem je deponovan renin pre nego što se oslobodi u cirkulaciju. Utvrđeno je da Olfcr78, koji odgovara jedino na podražaj od strane acetata i propionata, može posredovati u oslobađanju renina pod dejstvom SFCA (40).

Acetat i propionat su primarni produkti koji nastaju pri fermentaciji fibroznih vlakana pod dejstvom bakterija *Bacteroidetes* dok butirat nastaje od *Firmicutesphylum*. Butirat i propionat se uklanjaju putem debelog creva i jetre, dok acetat može ulaskom u cirkulaciju da dospe do drugih tkiva. Metabolički poremećaj crevnog mikrobioma može biti povezan sa progresijom DN preko crevno-bubrežne osovine u koju je uključen lokalni RAAS (35).

U sistemu RAAS-a je veoma značajna uloga aldosterona kao medijatora aterosklerotične bolesti, endotelne disfunkcije i oksidativnog stresa. Mnoga manja istraživanja su sugerisala da dodavanje antagonista aldosterona ACEI ili ARB-u može smanjiti albuminuriju (41).

PRIORITY studija (proteomic prediction and renin angiotensin aldosterone system inhibition prevention of early DN in type 2 diabetic patients with normoalbuminuria) je imala za cilj da utvrdi da li urinarni proteomiks CKD273 [chronic kidney disease (CKD)273] može da predvidi nastanak mikroalbuminurije kod normoalbuminuričnih bolesnika sa dijabetesom tipa 2 i da li rana primena antagonista aldosterona može da umanjiti rizik od nastanka mikroalbuminurije kod onih bolesnika za koje se utvrdi da su visoko rizični (42).

Ovaj rizik se utvrđuje urinarnim proteomiksom [chronic kidney disease (CKD)273] na osnovu čije vrednosti mogu da se identifikuju normoalbuminurični dijabetični bolesnici koji će u kasnijem toku progredirati u DN.

Primenom antagonista aldosterona kod bolesnika sa visokim CKD273 se očekuje usporenje progresije bolesti u najranijem stadijumu bolesti. CKD273 odražava izmenjeni sastav komponenti vanćelijskog mezangijumskog matriksa, promene koja se događa pre nastanka strukturnih oštećenja filtracione barijere. Pokazano je da je povišeni nivo

aldosterona u plazmi i pored dugotrajne terapije sa losartanom, pojava koja je označena kao “aldosteronski proboj”, udružen za bržim smanjenjem JGF u tipu 1 DN (43).

Selektivni antagonist aldosteronskih receptora, eplerenon je redukovao proteinuriju za 48% kada se doda ACEI kod bolesnika sa dijabetesnom bolesti tipa 2 sa albuminurijom >50 mg/g (44) a kada se spironolakton doda ACEI u ranom stadijumu DN sa mikroalbuminurijom postiže se redukcija albuminurije za 60% (45).

1.3.1.3. Tubulointersticijska fibroza i epitelna mezenhimalna transformacija

Dijabetesna glomerulopatija je prisutna u ranom stadijumu dijabetesne nefropatije dok je tubulointersticijska fibroza (TIF) odlika uznapredovale bolesti. Njena pojava najavljuje progresiju bubrežne slabosti. Step en TIF-a je povezan sa smanjenjem bubrežne funkcije i odlikuje se atrofijom tubula i nakupljanjem vanćelijskih matriksnih komponenti, kao što je fibronektin (46).

Kada su bubrežne epitelne ćelije izložene visokoj koncentraciji glukoze, one produkuju povećanu količinu kolagena tip I i tip IV, što vodi ka fibrozi. TGF- β 1 je glavni profibrogeni citokin koji je uključen u razvoj bubrežne fibroze.

Kod dijabetesnih bolesnika, preuzimanje glukoze u bubrežima je u obrnutom odnosu sa preuzimanjem slobodnih masnih kiselina (free fatty acid - FFA). Kada su FFA zarobljene u mitohondrijalnom matriksu dolazi do stvaranja mitohondrijalnih reaktivnih kiseoničkih vrsta- reactive oxygen species (ROS), lipidne peroksidacije i posledičnog oštećenja mitohondrija.

Hronična hipoksija je važan faktor za nastanak tubulointersticijskog oštećenja. Ona nastaje zbog promene u stvaranju azot oksida (NO) i Ang II što pokreće promene u cirkulaciji u intersticijumu. Smanjena postglomerulska cirkulacija dovodi do smanjenog protoka krvi u peritubulskoj cirkulaciji što rezutira smanjenom dotoku kiseonika.

Uticao pola je takođe značajan. Ženski pol je zaštićeniji u odnosu na nastanak i napredovanje bubrežne slabosti. U odnosu na bubreg uticaj 17 β -estradiol (E2) je dobar dok je uticaj testosterona nepovoljan. Mehanizam hormonalnog delovanja je kompleksan. Žene obolele od dijabetesne bolesti koje imaju dobru metaboličku kontrolu su više sklone da razviju DN u odnosu na muškarce, dok je situacija obrnuta u slučaju loše metaboličke

kontrole. Zaštita uloga E2 se ostvaruje delom, putem regulacije TGF- β 1. Nivo TGF- β 1 je veći kod muškaraca nego žena (47).

Noviji lekovi kao što su natrijum-glikozni kotransporter (sodium-glucose kotransporter - SGLT2) inhibitori i dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) inhibitori pored efekta na smanjenje glikemije imaju verovatno i zaštitno delovanje u odnosu na tubule. U početnom delu proksimalnog tubula preuzimanje glukoze se odvija putem natrijum-gluznog kotransportera SGLT2. U distalnijim delovima proksimalnog tubula se ovaj process odvija uglavnom preko SGLT1 kotransportera. Empagliflozin je SGLT2 inhibitor i on smanjuje nivo fibroznih i zapaljenskih markera putem blokade transporta glukoze, bez kompenzatornog povećanja funkcije SGLT1 kotransportera (48).

Antidijabetesna terapija bazirana na inkretinima, kao što je dipeptidil peptidaza-4 (DPP-4) inhibitori i glukagonu nalik peptid 1 (glucagon-like peptide-1 - GLP-1) analozi, se primenjuju u lečenju obolelih od DM tipa 2. GLP-1 ispoljava direktne efekte na srce, krvne sudove i bubrege, uglavnom preko GLP-1 receptora. DPP-4 inhibitori smanjuju razgradnju inkretina, napr. GLP-1 i gastričnog inhibitornog polipeptida. Studije pokazuju da imaju direktno renoprotektivno dejstvo koje je nezavisno od hipoglikemijskog delovanja (49).

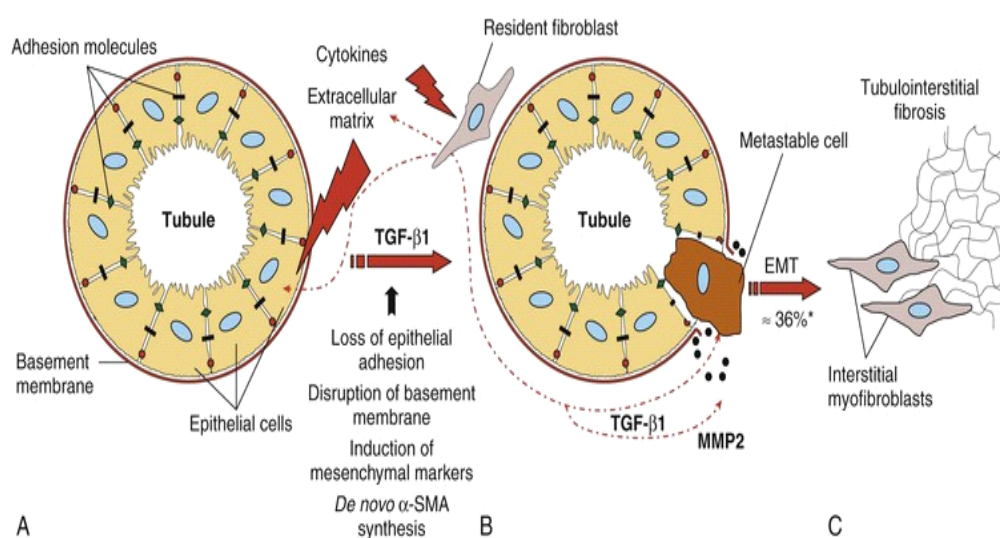
U nastanku i progresiji tubulointersticijske fibroze značajnu ulogu ima pojava epitelno-mezenhimalnog prelaza (epitelial mesenchymal transition - EMT). Tubularne epitelne ćelije transformišu svoj fenotip u mezenhimalni fenotip čime povećavaju svoj migratorni kapacitet i prelaze iz tubularnog prostora u intersticijski prostor i na taj način izbegavaju potencijalnu apoptotičku ćelijsku smrt. EMT povećava broj miofibroblasta koji doprinose razvoju dijabetesne bubrežne intersticijske fibroze preko sinteze i sekrecije ekstracelularnog matriksa (ECM). Naime, proksimalne tubulske ćelije su dominantni tip ćelija u normalnom bubrežnom intersticijumu u kojem postoji relativno malo intersticijskih fibroblasta. 36% intersticijskih fibroblasta potiču od tubularnih epitelnih ćelija procesom epitelno-mezinhimalne tranzicije (EMT). Tubulske ćelije preuzimaju fenotipski izgled aktiviranih miofibroblasta, koji su pozitivni na glatko mišićni ćelijski aktin (smooth muscle actin-SMA) i fibroblast specifični protein (fibroblast specific protein-FSP-1), i oni su glavni izvor proširenja ECM, i direktni uzrok fibroze (50).

Epitelne ćelije su povezane spolja za bazalnu membranu i iznutra pokrivaju lumen tubula. Tokom epitelno-mezenhimalne tranzicije dolazi do gubitka međućelijskih veza,

odvajanja od bazalne membrane, gubitka epitelnog fenotipa i dobijanja svojstava mezenhimalnih ćelija.

EMT je precizno regulisan proces kojeg definišu 4 ključna događaja: slika 1.

1. gubitak epitelnih adhezija (E-kadherin adhezioni kompleks)
2. de novo ekspresija α -glatko mišićni aktina (α -SMA) i reorganizacija aktina
3. prekid tubularne bazalne membrane
4. ćelijska migracija u područje intersticijuma (51).



Slika 5. Hipoteza razvoja EMT - epitelno mezenhimalna transformacije. Legenda: EMT - epitelno mezenhimalna transformacija, TIF tubulointersticijalna fibroza, BM-bazalna membrane, MMP2 - metaloperoksidaza 2, SMA - glatko mišićno ćelijski aktin (48).

EMT bi mogla biti reakcija adaptacije na izmenjeni dijabetični milje. Kaskada hemokina dovodi do privlačenja zapaljenskih ćelija u tubulointersticijski prostor. Oni generišu matriksne metaloproteinaze (MMP) i profibrotske citokine. Makrofazi oslobađaju MMP posebno MMP-22 i MMP-9, koji dalje dovode do pojačanog stvaranja TGF- β 1 u tubularnim epitelnim ćelijama što dalje dovodi do fibroze putem podsticaja tubularnih ćelija na promenu putem EMT.

EMT se odvija preko 3 glavna signalna puta i to:

1. TGF β /Smad, 2. integrin/ILK, i 3. Wnt/ β -katenin puteva (50).

Najvažniju ulogu u procesu EMT ima multifunkcionalni citokin TGF- β 1. Njegov nivo raste u stanju hiperglikemije u glomerulima i intersticijumu i indukuje fibroblaste da sintetišu ECM proteine, kao što su kolagen tip I, III i V i fibronektin (51).

Dejstvo suprotno citokinu TGF-1 ima koštani morfogeni protein 7 (bone morphogenic protein-7 - BMP-7) koji deluje u pravcu reverzije EMT - e direktno se suprotstavljajući TGF - beta-indukovanoj Smad3 (protein koji je sličan produktu gena Drosophile - "majke protiv dekapentaplegika - mothers against decapentaplegic" (Mad) *engl*: similar to Mad-3") zavisnoj ćelijskoj signalizaciji u bubrežnim epitelnim tubularnim ćelijama (52).

1.3.1.4. Mezigijumska proliferacija

Glomerulske mezigijumske ćelije imaju važnu ulogu u homeostazi mezigijumskog matriksa, regulaciji jačine glomerulske filtracije i fagocitoze apoptotičnih ćelija u glomerulu. Patološke karakteristike DN uključuju i mezigijumsku ekspanziju koja nastaje zbog proliferacije mezigijumskih ćelija i nakupljanja vanćelijskog matriksa što vodi do glomerulske skleroze.

Stoga se inhibicija proliferacije mezigijumskih ćelija danas razmatra kao jedan od važnih ciljeva u prevenciji i sprečavanju pogoršanja DN. Han F. i sar. su dokazali da primena triptolida značajno koči mezigijumsku proliferaciju i da bi se on mogao pokazati korisnim u prevenciji dijabetesne glomeruloskleroze. Ovaj preparat ispoljava značajna imunosupresivna i antiinflamatorna svojstva a pokazuje efekte i u zaustavljanju proliferacije malignih ćelija (53).

1.3.1.5. Zadebljanje glomerulske bazalne membrane

Glomerulska bazalna membrana i ćelijski slojevi koji na nju naležu imaju ključnu ulogu u procesu ultrafiltracije. Anjonska komponenta membrane udružena sa karbohidratnim grupama formira selektivno naelektrisanu barijeru koja ograničava transmembranski flux anjonskih proteina kroz samu bazalnu membranu u urinarni prostor. Heparan sulfat glikozaminoglikani su karbohidratne strukture koje naležu na proteoglikanske proteine koji predstavljaju centralnu strukturu GBM. Oni svojim naelektrisanjem omogućavaju ispoljavanje selektivne propusnosti za elemente krvne plazme (54).

GMB “matrisom” je jedinstvena struktura u odnosu na druge bazalne membrane. GBM i mezangijumski matriks su strukturalno dva različita vanćelijska matriksa koja blisko naležu jedan na drugi, iako svaki od njih pojedinačno ima različite molekularne sastojke. Laminin 521 je glavna lamininska heterotrimetrična vrsta u sastavu GBM dok je laminin 1111 prisutan u mezangijumskom matriksu. Kolagen tip IV je heterotrimer koji se u GBM sastoji iz $\alpha 3$, $\alpha 4$, i $\alpha 5$ tipa IV lanaca; dok se u mezangijumskom matriksu sastoji od $\alpha 1$ i $\alpha 2$ tipa IV heterotrimer (55).

Smatra se da je zadebljanje GBM najranija patološka promena u DN. Bolesnici sa većim zadebljanjem GBM imaju lošiju prognozu bubrežne funkcije, iako se samo zadebljanje ne može smatrati za nezavisni pokazatelj progresije bolesti (56).

Zadebljanje GBM može da se javi i tokom prve dve godine od nastanka dijabetesne bolesti i da godinama prethodi pojavi albuminurije. Zadebljana GBM postoji i bez albuminurije što ukazuje na mogućnost da strukturne promene GBM nisu primarni uzrok albuminurije. Štaviše, nakon transplantacije gušterače kod dijabetesnih pacova, izlučivanje albumina kroz urin se normalizuje, što ukazuje da GBM koja je zadebljala pod uticajem hiperglikemije može da funkcioniše potpuno normalno nakon postizanja normoglikemije. Promene u strukturi podocita i njihovog signalnog sistema predstavlja ključni okidač za zadebljanje GBM, i odgovorne su kako za povećano stvaranje mezangijumskog matriksa tako i za poremećene procese njene degradacije i obnove (57).

1. 3.1.6. Uloga Vaskularnog Endotelnog Faktora rasta (VEGF)

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) je moćni angiogeni faktor koji ima značaja u normalnoj i patološkoj angiogenezi. On podstiče proliferaciju, diferencijaciju i migraciju endotelnih ćelija, podstiče vazodilataciju i povećava propustljivost krvnog suda. Ima i važnu ulogu u procesu razvoja bubrega, takođe i u bubregu formiranog organizma. VEGF oslobađaju podociti i njegovo delovanje je od suštinskog značaja za održavanje GBM. Deluje preko tirozin kinaza receptora i to VEGF receptora 1 i 2. Dva ko-receptora neurofolin 1 i 2 povećavaju jačinu VEGFR 2 signala delujući na VEGF receptor 2. (58). VEGF utiče i na mezangijumske ćelije u procesu stvaranja proteina mezangijumskog matriksa (59).

Pod dejstvom angiotenzina II u podocitima se sintetiše kolagen tipa IV preko kaskade u koju su uključeni transformišući faktor rasta beta (TGF-beta) i VEGF (60).

Prema istraživanju Ahamadi S. i sar. ukazano je na mogućnost da VEGF ispoljava paradoksalne efekte kod razvoja dijabetesne nefropatije i nefrotskog sindroma druge etiologije. Naime na ovakav zaključak ukazuje različiti porast VEGF-a u ovim poremećajama, pri čemu je on prisutan u oba poremećaja ali je statistički značajan porast VEGF-a samo u DN. Na osnovu ovakvih rezultata autori postavljaju hipotezu da VEGF nije uzročni faktor u nastanku nefrotskog sindroma već predstavlja faktor koji učestvuje u obnavljanju prethodno oštećenog endotelnog sloja (61).

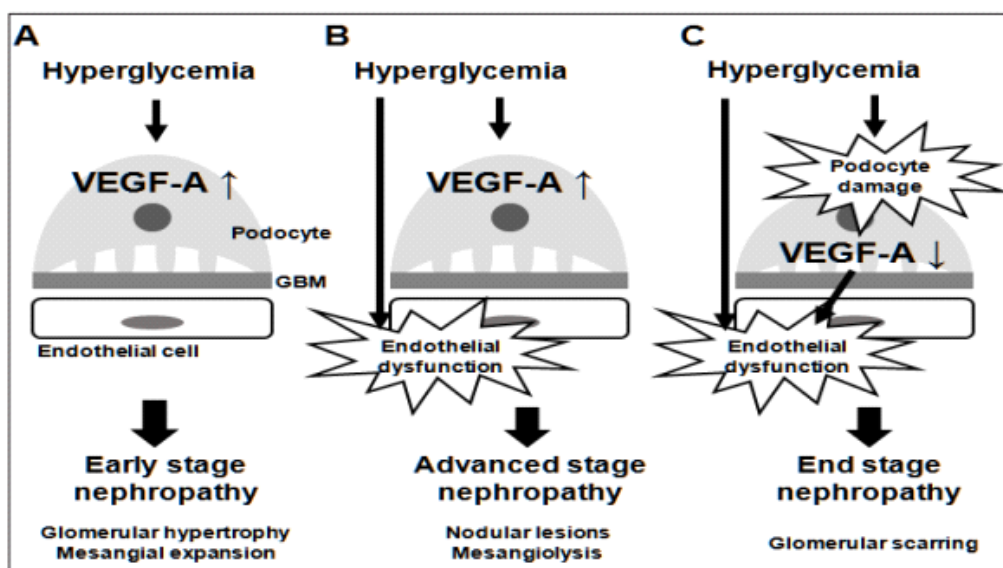
Naime, VEGF ima dvostruku ulogu u procesu kroz koji prolazi glomerul u toku nefrotskog sindroma. U početnoj fazi mezangijumske ćelije glomerula ispoljavaju u povećanoj meri profibrotske faktore kao što su trombospondin, TGF-beta-2 i 3, kao i VEGF koji je glavni faktor angiogeneze. VEGF se svrstava u grupu štetnih faktora koji dovode do povećanja propustljivosti krvnog suda (62). Međutim, postoje podaci koji ukazuju da VEGF ima značajnu ulogu u procesu obnavljanja endotelnog sloja glomerulske membrane u nefrotskom sindromu i da svojim delovanjem poboljšava funkciju glomerulske barijere (61).

U dijabetesnoj nefropatiji za razliku od nefrotskog sindroma druge etiologije, VEGF ispoljava samo štetno delovanje. U eksperimentu je podstaknuto oslobađanje VEGF-a pri čemu je njegova inhibicija primenom anti VEGF substance dala pozitivne efekte u sprečavanju komplikacija u dijabetesnoj nefropatiji (60). Ključna razlika je u metaboličkim abnormalnostima dijabetesne bolesti koje imaju značajnu ulogu u patogenezi DN. Ove abnormalnosti deluju kao okidač za aktivaciju unutarćelijskih signalnih molekula što rezultira disregulacijom citokina uključujući i VEGF koji dovode do funkcionalnih i strukturnih promena u glomerulskoj filtracionoj barijeri (63). Hiperglikemija *per se* pospešuje stvaranje VEGF-A u podocitima već u ranom stadijumu bolesti, što je udruženo sa pojavom mikroalbuminurije i mezangijumske ekspanzije (64).

Povećano stvaranje VEGF-A samo po sebi nije dovoljno da u eksperimentu na životinjama dovede do uznapredovalog stadijuma dijabetesne nefropatije koja se odlikuje značajnom proteinurijom kao i nodularnim lezijama u glomerulu. Dakle, u dijabetesnoj bolesti je pored delovanja VEGF-a potrebno i dejstvo dijabetesom podstaknutih faktora radi progresije bolesti do uznapredovalog stadijuma. Verovatno je da su to faktori endotelne disfunkcije kao što su nedostatak endotelne azot oksid sintetaze (eNOS) (62). Udruženim dejstvom endotelne disfunkcije i povećanog stvaranja VEGF-A dolazi do povećanja

albuminurije i pojave glomerulskih lezija koje su odlika uznapredovalog stadijuma dijabetesne nefropatije. Slika 6.

Povećana ekspresija VEGF-A se zapaža u ranom stadijumu DN. Kako bolest napreduje, nivo VEGF-A u glomerulu opada što je verovatno posledica gubitka podocita koji stvaraju VEGF-A, a njegov nedostatak u glomerulu može da omogući nastank endotelne lezije. (Slika 6C).



Slika 6. Ispoljavanje VEGF-A u različitim stadijumima dijabetesne nefroaiije (59)

Zreli podociti su visoko specijalizovane ćelije koje ne mogu da proliferišu ali mogu da odgovaraju na delovanje faktora rasta. Početni odgovor glomerula na faktore rasta je uvek koristan i ima zaštitnu ulogu i sastoji se u ćelijskoj hipertrofiji, međutim nekontrolisani signali od strane faktora rasta mogu da dovedu do programirane ćelijske smrti (apoptoze) i gubitka podocita (65).

Ove kontroverze u pogledu delovanja VEGF-a verovatno potiču od genetskog polimorfizma različitih njihovih populacija ili iz činjenice da postoje različite forme VEGF-a (od A do G) kao i različiti receptori na koje oni deluju (VEGFR-1 i VEGFR-2) (66).

1.3.1.7. Uloga TGF- β 1

TGF- β ima integralnu ulogu u patogenezi dijabetesne nefropatije. Dijabetesni milje pospešuje oksidativni stres i podstiče ekspresiju TGF- β 1. TGF- β 1 dovodi do uvećanja ćelije i nakupljanja vanćelijskog matriksa u mezangijumu, što uzrokuje smanjenje JGF i dalje vodi u HBI.

Novija istraživanja pokazuju da TGF- β 1 utiče na urinarnu ekskreciju albumina povećavanjem glomeruluske permeabilnosti i smanjenjem reapsorpcije u proksimalnim tubulima.

TGF- β 1 povećava i urinarnu ekskreciju vode, elektrolita i glukoze putem kočenja tubularne reapsorpcije.

TGF- β 1 ispoljava hipertrofične i fibrogene efekte u dijabetesnoj nefropatiji (66).

U meta-analizi Qiao Y-C i sar. koja je imala za cilj da ispita karakteristike promena u oslobađanju TGF- β 1 kod bolesnika sa dijabetesnom bolesti tipa 2 kao i dijabetesnom nefropatijom je utvrđeno da bolesnici sa DM tipa 2 koji ispoljavaju albuminuriju imaju povišene vrednosti urinarnog TGF- β 1 (67).

S toga je značajna studija Voelker i sar., koja je imala za cilj da ispita da li supresija TGF- β 1 može biti od koristi u prevenciji i terapiji DN. U randomizovanoj, dvostruko slepoj studiji je primenjivano TGF- β 1 specifično, humanizovano monoklonsko antitelo (TGF- β 1 mAb) sa ciljem da se ispita bezbednost i efikasnost u odnosu na placebo, u pogledu usporenja slabljenja bubrežne funkcije kod bolesnika koji su bili na stabilnoj terapiji sa ACEI/ATB. Randomizovano je 416 bolesnika koji su bolovali od dijabetesne bolesti tip 1 i tip 2 koji su primali TGF- β 1 mAb (2-, 10-, ili 50-mg) sc. mesečno tokom 12 meseci / ili placebo. Studija je prekinuta 4 meseca pre roka jer je analiza podataka ukazivala da primena TGF- β 1 mAb u kombinaciji sa ACEI/ATB ne usporava progresiju DN (68).

1.3.2. Uloga podocita u oštećenju u dijabetesnoj nefropatiji

Podociti, ili glomerulske epitelne ćelije su visoko specijalizovane strukture koje se sastoje iz citoskeleta, bočnih veza i granajućih stopaličastih produžetaka koji naležu na GBM.

Podociti su krajnje diferencirane ćelije i kao takve ne mogu da se obnove nakon ozlede.

Njihovo oštećenje i apoptoza dovodi do razaranja glomerulske bazalne membrane i daljeg nepovoljnog toka DN (69). Stopaličasti produžeci se sastoje od bazalnog, bazolateralnog i parijetalnog regiona kojim čvrsto prijanja na GBM preko podoplaninskog proteina. Bazolateralne regije se međusobno povezuju sa susednim podocitima slit-membranom. (SD) (70).

1.3.2. 1. Patomehanizmi oštećenja podocita

1.3.2.1.1. Hipertrofija podocita

Mnogobrojna istraživanja ukazuju da je hipertrofija podocita povezana sa razvojem DN (71). Zreli podociti se uvećavaju prateći glomerulsku hipertrofiju sa ciljem da pokriju ogoljene delove GBM. Ova pojava je značajna s obzirom da su podociti terminalno diferentovane ćelije koje se više ne obnavljaju.

Hiperglikemija može na nekoliko načina da utiče na nastanak hipertrofije podocita.

Ona deluje putem povećanog stvaranja Ang II i sledstvene molekularne kaskade (preko ROS, TGF- β 1 i mTORC 1) i/ili povećanim ispoljavanjem nuklearnog STAT3 (Slika 7).

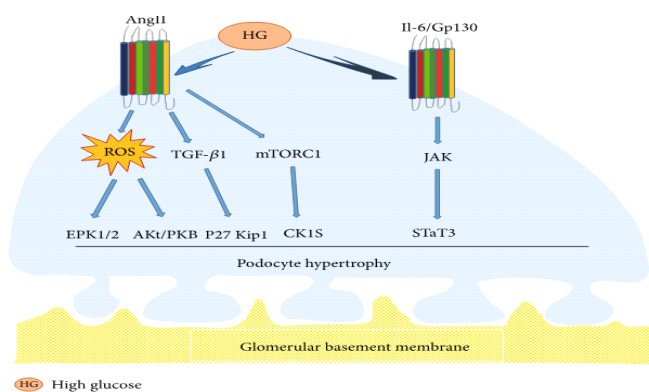
Dakle, Ang II povećava proteinsku ekspresiju kinaza ERK1/2 kao i Akt/PKB što doprinosi podocitnoj hipertrofiji.

Pokazano je da a) ERK1/2, b) Akt/PKB, c) IL-6/JAK2/STAT3, i d) mTOR signalni putevi imaju značajnu ulogu u podocitnoj hipertrofiji.

- a) ERK 1 i ERK 2 su vanćelijske signalne regulacione kinaze koje učestvuju u procesima ćelijske adhezije, u odvijanju ćelijskog ciklusa, u procesu migracije ćelija, proliferacije, transkripcije itd.
- b) Akt/PKB je signalni prenosni put koji podstiče rast ćelije kao odgovor na vanćelijske signale. Ključni proteini su PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaza) i Akt (Protein Kinaza B).
- c) JAK-STAT signalni put predstavlja lanac interakcija između proteina u ćeliji i uključen je u procese imuniteta, ćelijske deobe, ćelijske smrti i nastanka tumora. Ovaj signalni put povezuje informacije koje potiču od hemijskih signala izvan ćelije i ćelijskog jedra, što rezultira aktivacijom gena kroz proces ćelijske transkripcije. Tri ključna dela JAK - STAT signalnog sistema su: Janus kinaze (JAK), signalni prenosnik i aktivator transkripcionih proteina (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins - STATs) i receptori koji vezuju hemijske signale.
- d) meta za rapamicin kod sisara (mammalian target of rapamycin -mTOR) je kinaza koja je kodirana MTOR genom. mTOR pripada grupi fosfatidilinozitol 3-kinaza i reguliše ćelijski rast, proliferaciju, pokretljivost, sintezu proteina, autofagiju i transkripciju.

Drugi put kojim hiperglikemija dovodi do hipertrofije podocita indukuje povećano ispoljavanje nuklearnog signalnog prenosnika i aktivatora transkripcije 3 (signal transducer and activator of transcription 3 STAT3) putem aktivacije signalnog prenosnog elementa Gp 130. Jo i sar.su utvrdili da su interleukin 6 (IL-6) i signalni proteini u njegovoj nishodnoj kaskadi ključni regulatori podocitne hipertrofije u stanju hiperglikemije (72).

Studije pokazuju da translacijom kontrolisani tumorski protein (Translationally Controlled Tumor Protein - TCTP) može da aktivira mTORC1 signalni put i dovede do značajnog ispoljavanja ciklin zavisnog kinaza inhibitora (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-CKI). TCTP ima signalnu ulogu u ćelijskom rastu a CKI dovodi do prekida u podocitnom ciklusu i nastanku njegove hipertrofije (70).



Slika 7. Podocitna hipertrofija (70)

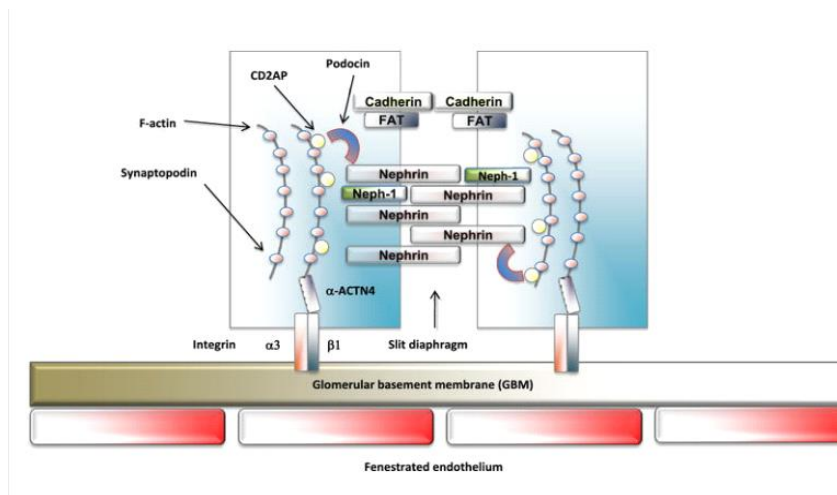
1.3.2.1.2. Podocitna Epitelno-mezenhimalna tranzicija

Uočena je u ranijim studijama povezanost između apoptoze podocita i proteinurije. Čelije gube svoja originalna svojstva kada se pojavi patološki process EMT koji dovodi do gubitka ćelijskog kontakta, oštećuje polaritet ćelije, i pojavljuju se u urinu. Ove promene se dokazuju mezenhimalnim markerima kao što su vimentin, α -glatko mišićni aktin (α -smooth muscle actin - α -SMA), i fibroblast-specifični protein 1 (FSP1) (73, 74, 75).

Renalne tubularne epitelne ćelije i podociti bivaju aktivirani nakon akutnog (48–72 h) izlaganja hiperglikemiji što dovodi do smanjenog ispoljavanja E kadherina i ZO-1 (transmembranski vezni protein u sastavu SLIT membrane). Istovremeno se ispoljavaju transdiferencioni proteini kao što su α -SMA i vimentin (74).

1. 3.2.1.3. Odvajanje podocita

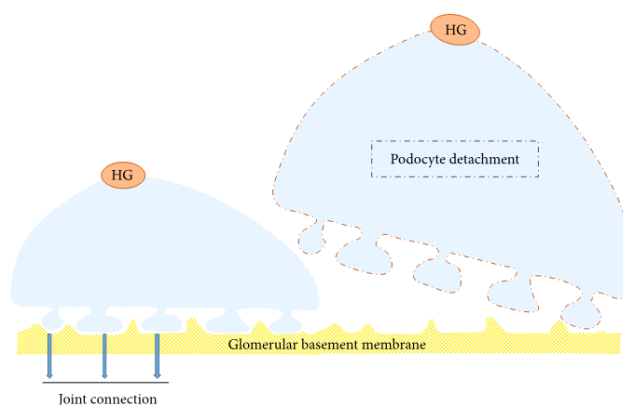
Podociti su vezani za GMB i ova čvrsta konekcija sprečava gubitak proteina preko GBM: Gubitak usidrenosti podocita u GMB verovatno nastaje zbog nishodne regulacije $\alpha\beta 1$ integrinskog receptora, osnovnog adhezionog kompleksa koji vezuje podocite za GBM8429 (76). Slika 8. Hiperglikemija smanjuje ispoljavanje $\alpha\beta 1$ integrina i deluje kao okidač za aktivaciju integrin vezane kinaze (integrin-linked kinase –ILK) (77) .



Slika 8. Struktura podocita (78)

Prisustvo podocita u urinu se može koristiti kao rani biomarker DN, pre pojave albuminurije (79).

Jim i sar. su utvrdili da je ispoljavanje podocitnih proteina kao što su sinaptopodin, podocin i nefrin, značajno sniženo u DN, što može dovesti do poremećaja u strukturi i funkciji podocitnog citoskleta, oštećenja vezanosti podocita između sebe kao i sa GBM i njihovog posledičnog odvajanja od nje (77). Pojedini podociti se odvajaju od GBM, a pojedini su čvrsto vezani za GBM u istom stadijumu DN, što je posledica razvoja EMT (80).



Slika 9. Odvajanje podocita (70)

1. 3.2.1.4. Apoptoza podocita

Apoptoza podocita ima značajnu ulogu u smanjenju broja glomerula.

Susztak i sar. su utvrdili da mitohondrije mogu da aktiviraju adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazu i reaktivne kiseoničke vrste (ROS) u stanju hiperglikemije, da povećaju ispoljavanje p38 proteinske kinaze i kaspaze 3 u isto vreme, što vodi ka apoptozi podocita i dalje rezultuje proteinurijom (81).

1.3.2.2. Glavni signalni putevi u mehanizmu oštećenja podocita u DN

Studije ukazuju da oštećenje podocita u DN nastaje pod uticajem mnogobrojnih faktora kao što su mehanički stres, zapaljenska reakcija, oksidativni stres, podsticaj stvaranja TGF- β 1, aktivacija RAAS-a, akumulacija krajnjih prukata glikolizacije (AGE). Postoji mnogo signalnih puteva koji su uključeni u regulaciju prenosa signala mTOR-om u procesu autofagije, kao što su adenzin monofosfat - aktivirani kinaza signalni put, Wnt/ β -katenin signalni put itd (82). Slika 10.

1.3.2.2.1. Adenzin monofosfat - aktivirane kinaze signalni put (AMPK) u DN

AMPK je serinska kinaza koja ima ulogu u ćelijskom i tkivnom metabolizmu i od posebnog je značaja u hitnim metaboličkim stanjima. AMPK signalni put autofagije, koji se sastoji od heterologih subjediničnih proteina α , β , i γ , aktivira se u ćeliji u sniženim energetske stanjima (83).

1.3.2.2.2. Wnt/ β -Katenin signalni put u DN

Wnt protein je vrsta sekretornog glikoproteina koji sadrži signalne peptide koji su namenjeni prolazu kroz sekretorne puteve i, 23 ili 24 cisteinske rezidue. Wnt signalni put ispoljava dejstva na proces diferencijacije, hiperplazije, maturacije i vijabilnosti ćelija (80). Utvrđeno je da se ovaj put pokreće u procesu razvoja DN gde ispoljava ključnu ulogu u apoptozi i EMT-i podocita, mezangijumskih i tubularnih ćelija (84).

1.3.2.2.3. Signalni putevi uslovljeni stresom endoplazmatskog retikuluma

Stres endoplazmatskog retikuluma je povezan sa oštećenjem podocita, endotelnih i mezangijumskih ćelija u DN i vodi ka nastanku glomeruloskleroze (85). Stres endoplazmatskog retikuluma pogoršava disfunkciju podocita u ranom stadijumu DN (86). Kontinuirani stres endoplazmatskog retikuluma aktivira kaskadu apoptotskih signalnih molekula i time započinje proces apoptoze (87). Hiperglikemija pokreće stres endoplazmatskog retikuluma različitim putevima (88) koji dovode do ćelijskog oštećenja aktivacijom mTOR proteina (89).

1. Krajni produkti glikolizacije (advanced glycation end products - AGE) podstiču ispoljavanje proteina koji je regulisan glukozom (glucose-regulated protein 78 - GRP78) koji potom podstiču stres endoplazmatskog retikuluma (91).
2. Hiperglikemija i slobodne masne kiseline podstiču stres endoplazmatskog retikuluma, koji može biti sprečen primenom chaperona (89).

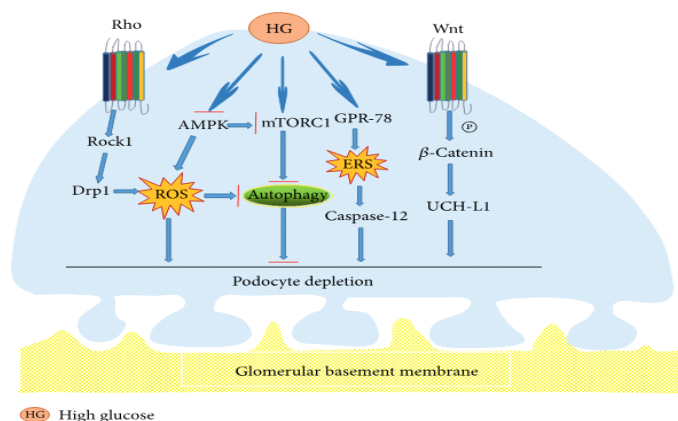
Proces apoptoze podocita se odvija kaspaza-12 signalnim putem, dok AGE deluju na kolagen tip IV što vodi disfunkciji i gubitku podocita (90).

1.3.2.2.4. mTOR signalni putevi posredovani autofagijom u DN

Aktivacijom mTOR signalnog puta se pogoršava oštećenje podocita u DN (91). Kod aktiviranih podocita dolazi do poremećaja u položaju i funkciji nefrina i ZO-1 citoskeletnog proteina, potom do podocitne EMT koja dalje vodi do stapanja prstastih produžetaka podocita i njihovog odvajanja od GBM (92).

1.3.2.2.5. Rho/ROCK signalni put u DN

Rho familija se sastoji iz RhoA, Rac1, i Cdc42 koji pretsavljaju sastavne elemente aktinsko citoskeletne strukture (93). RhoA/ROCK signalni put ima važnu ulogu u procesu razvoja DN i može da pokrene signalnu kaskadu u nastanku ćelijske apoptoze, migracije i diferencijacije (94).



Slika 10. Signalni putevi oštećenja podocita u DN (70)

1.4. Plejotropna dejstva vitamina D

Pored klasične uloge koju vitamin D ima u koštano - zglobnom metabolizmu, u novije vreme, sa otkrićem receptora za vitamin D (VDR) dostignuta su nova saznanja o njegovim dodatnim ulogama. Utvrđeno je da vitamin D osim klasične endokrino - metaboličke uloge ispoljava i značajna parakrina i plejotropna svojstva. VDR su prisutni u ćelijama pankreasa, u tubularnim epitelnim ćelijama, u osteoblastima i hondrocitima, u nekim endokrinim žlezdama, reproduktivnim tkivima i selektivno su prisutni u bronhijanim epitelnim ćelijama (95). Ovi receptori regulišu izražajnost brojnih gena koji su uključeni u homeostazu kalcijuma i fosfata, u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji, kao i u ligand zavisnom imunološkom odgovoru. Sva tkiva koja ispoljavaju VDR su ujedno i ciljna tkiva njegovog delovanja što čini osnovu za utvrđivanje uloge vitamina D u mnogim fiziološko - patološkim procesima.

1.4.1. Anti-inflamatorno dejstvo

D vitamin utiče na diferencijaciju dentritičkih ćelija, limfocita i monocita u makrofage. Ove ćelije predstavljaju prvu liniju odbrane imunološkog sistema i imaju značajnu ulogu u kontroli infekcije. Vitamin D svojim parakrinim povratnim kontrolnim mehanizmom umanjuje zapaljenski odgovor organizma. Imunoregulatorno dejstvo vitamin D ostvaruje preko VDR-a i enzima 1- α -hidroksilaze koji se ispoljavavaju na aktiviranim makrofagima, dentritičnim ćelijama i limfocitima.

Dodavanjem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ u eksperimentu se postiže inhibicija proliferacije T limfocita i smanjenje broja CD4^+ i CD8^+ T limfocita uz povećavanje odnosa $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T limfocita, dok nedostatak D vitamina dovodi do povećanja CD4^+ i CD8^+ T limfocita i smanjenja odnosa $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T limfocita (96).

Vitamin D aktivira katalelicidine, antimikrobne peptide koji se nalaze u lizozomima makrofaga i polimorfonuklearnih ćelija (97).

U kliničkoj studiji na bolesnicima sa ulceroznim kolitisom Sharifi A. i sar. su pokazali da 1 mL 300.000 IU Vitamina D3 datog muskularno dovodi do značajnog smirivanja parametara upale, Hs-CRP za 32% i ESR za 46% u odnos na kontrolnu grupu, i da je istovremeno zabeležen porast genske ekspresije katalelicidina (hCAP/LL37). Katalelicidin je endogeni antibiotik koji ispoljava anti-inflamatorno delovanje. Stvara se u intestinalnim, epitelijalnim i imunim ćelijama (98).

Suplementacija D vitaminom poboljšava imunološki odgovor na infekcije kod bolesnika sa dijabetesom tipa 2 (99).

Sistemska inflamacija se odlikuje porastom vrednosti inflamatornih biomarkera koji se detektuju u krvi, kao što su faktor nekroze tumora α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) i interleukin-12 (IL-12) (97). Za optimalni anti-inflamatorni odgovor humanih monocita je veoma značajan nivo cirkulišućeg 25(OH)D (100).

Konverzija 25(OH)D u njegovu aktivnu formu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se odvija lokalno u ćelijama imunološkog sistema pod dejstvom enzima 1- α -hidroksilaze (parakrino dejstvo). Aktivna forma vitamina D negativno reguliše oslobađanje proinflamatornih citokina iz aktiviranih monocita uključujući i TNF- α , IL-1 β , IL-6, i IL-8 (99).

Meta-analiza studijâ koje su rađene na mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih dobrovoljaca potvrdila je da se dozno zavisnom primenom vitamina D postiže smanjenje zapaljenskog odgovora. U studijama su korišćeni monociti, makrofagne ćelije, T limfociti i mešani limfociti (99).

Mehanizmi koji posreduju u anti-inflamatornom delovanju vitamina D uključuju:

1. smanjeno proteinsko ispoljavanje zvonu- nalik receptora - 2 (toll-like receptora-2, - TLR-2) i zvonu- nalik receptora-4 (TLR-4) (100), porast iRNA trans-aktivirajućeg T-ćelijskog specifičnog transkripcionog faktora (GATA-3), povećanje signalnog prenosioca i aktivatora transkripcije (STAT6) 6, broja VDR-a i sniženje nivoa pp38 i p42/42 (ERK1/2 mitogen-

activated protein kinases (MAPKs) koje se sastoje od p42/p44 MAPK (101). Mitogenima aktivirane proteinske kinaze (MAPK) pripadaju familiji serin/treonin proteinskih kinaza koje su uključene u mnogobrojne ćelijske procese kao što su proliferacija, diferencijacija, pokretljivost i smrt ćelije. p44/42 MAPK (ERK1/2) signalni put može biti aktiviran kao odgovor na mnogobrojne vanćelijske podsticaje kao što su mitogeni, faktori rasta i citokini i važan su parametar za postavljanje dijagnoze i terapije malignih bolesti.

2. ne-genomski anti-inflamatorni putevi delovanja vitamina D preko VDR-a koji se nalaze u samoj ćelijskoj membrani (102). Vezivanjem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ za membranski VDR dolazi do aktivacije sekundarnih glasničkih sistema koji uključuju fosfolipazu C i receptore vezane za G protein (99).

Za postizanje optimalne imunološke funkcije potrebne su vrednosti serumskog $25(\text{OH})\text{D}$ veće od 120 nmol/L. Korisni efekti vitamina D iščezavaju kada vrednosti vitamina D padnu ispod 100 nmol/L (103).

1.4.2. Antiapoptotično i antifibrotično dejstvo Vitamina D

U ranijim studijama je uočena direktna povezanost između vitamina D i apoptoze (104). Naime, VDR i njegov ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i ćelijskog rasta. Vitamin D3 inhibiše rast normalnih i malignih ćelijskih linija. Ovo dejstvo se ostvaruje preko VDR-a, što je indirektno dokazano u eksperimentu u kojem je gubitak VDR-a doveo do prekida u ispoljavanju aktivnosti vitamina D čak i u stanjima bez sniženja nivoa vitamin D u serumu (105, 106).

Apoptoza je idukovana u eksperimentu koji je rađen sa perifernim mononuklearnim ćelijama koje su dobijene od zdravih osoba kao i onih osoba koje su imale inflamatornu bolest creva (107)

U eksperimentalne svrhe se koriste i mezenhimalne multipotente ćelije C3H 10T1/2 za *in vitro* model koji ispituje njihovu sposobnost da se diferenciraju u različite specijalizovane ćelije kao što osteociti, hondrociti, adipociti, endotelne i glatke mišićne ćelije. Ove ćelije se koriste i kao model za identifikaciju i analizu specifičnih genskih produkata koji imaju ulogu u ranim fazama ćelijskog ciklusa i proliferacije. Dodavanje vitamina D ovim mezenhimalnim multipotentnim ćelijama - C3H 10T1/2 dovodi do smanjenja ćelijske

proliferacije i istovremenog porasta ćelijske veličine. Ovaj fenomen je verovatno vezan sa smanjenjem vrednosti Rho (protein koji je odgovoran za završetak sinteze iRNK) i ispoljavanja Rho/Wrch-1. Wrch1 gen je uključen u regulaciju proliferacije. Rho, koji pripada familiji fosfoenolpiruvatne karboksikinazne-GTP-aze, je takođe uključen u biološke puteve koji se odnose na proliferaciju.

Dodavanje D vitamina takođe dovodi do prekida ćelijskog ciklusa što rezultira nakupljanjem ćelija koje se zadržavaju u G0/G1 fazi pri čemu se ne registruju pokazatelji za pokretanje apoptoze.

Dokazano je da se primenom vitamina D u eksperimentima na mezenhimalnim multipotentim ćelijama C3H 10T1/2 postiže anti-apoptotičko i anti-proliferativno dejstvo (108).

U eksperimentalnim modelima na životinjama je pokazano da primena vitamina D povećava ispoljavanje VDR-a i da značajno smanjuje broj TUNEL-pozitivnih ćelija u modelu eksperimentalne obstruktivne nefropatije sa jednostranom obstrukcijom uretera (109). Test TUNEL fluorescencije je jednostavna i brza neradioaktivna tehnika za detekciju i kvantifikaciju ćelija koje podležu procesu apoptoze. On detektuje slobodne 3'-OH segmente u prekidima jednostruke spirale u visokomolekularnim DNK fragmentima. Prisustvo ovih grupa se smatra za markere apoptoze i primena ovog metoda omogućava razlikovanje ćelijske smrti koja nastupa putem apoptoze ili nekroze.

Bea i sar. su pokazali da primena vitamina D nakon infarkta miokarda (IM), značajno smanjuje fibrozu miokarda i remodelovanje vanćelijskog matriksa, pojave koje su u osnovi nastanka srčane slabosti. Pošto je tokom ove studije došlo do značajnog povećanja ispoljavanja VDR-a u kardiomiocitima i inhibicije apoptoze nakon IM, u daljem toku je ispitivan efekat oštećenog procesa signalizacije vitaminom D na apoptozu. TUNEL-pozitivni kardiomiociti su ispoljavali učestaliju apoptozu u VDR - knock out (KO) miševa u poređenju sa WT (wild type) sojem miševa (koji su ispoljavali VDR) 2 dana nakon IM (4.25% vs. 1.55%, $P < 0.05$). Eksperiment potvrđuje da uništenje (brisanje) VDR-a uzrokuje značajne apoptotičke efekte u miokardu nakon IM (110).

U zdravim tkivima vitamin D ima važnu ulogu u kontroli proliferacije putem podsticanja apoptoze (97). U tkivu dojke vitamin D reguliše apoptozu u odnosu na potrebe tela žene u različitim fiziološkim stanjima kao što su trudnoća i dojenje (110). Osim u zdravim tkivima vitamin D ima uticaja na hiperplaziju u malignim i nemalignim tkivima

putem započinjanja procesa apoptoze napr. kod glioma, melanoma i u ćelijama raka dojke (111). Broj VDR-a je važan faktor u odedivanju snage delovanja vitamina D na rast tumora (97).

Primena 1α -hidroksiholecalciferola pokreće antiproliferativne efekte na ćelijama melanoma *in vitro* i *in vivo*, promenom načina ispoljavanja ključnih regulatornih molekula u ćelijskom ciklusu. U ćelijama melanoma koje su tretirane D vitaminom ovaj ciklus se zaustavlja u G1 ili G2 fazi (112).

1.4.3. Antifibrotično delovanje

Kalcitriol, analog vitamina D₃, ispoljava inhibitorno delovanje na intersticijalne miofibroblaste i na taj način inhibira progresiju renalne intersticijske fibroze (97).

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ima anti-fibrotično delovanje na plućne fibroblaste i mezenhimalne multipotentne ćelije *in vitro*, kao i antifibrotične efekte *in vivo* na mišjem modelu ciroze jetre. VDR se pod dejstvom $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ispoljavaju na hepatičnim zvezdastim ćelijama (hepatic stellate cells - HSC). $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ koči proliferaciju HSC, smanjuje ispoljavanja ciklin D1, tkivnog inhibitora metaloproteineze 1 i kolagena I *in vitro*. Vrednosti vitamina D₃ >50 nmol/L su udružene sa smanjenom učestalošću brze fibrozne progresije u CHC (chronic hepatic cirrhosis) (113).

U nastanku fibroze poseban značaj ima transformišući faktor rasta beta (transforming growth factor β -TGF- β) kao i superfamilija plejotropnih citokina koji regulišu ćelijske procese putem signala koji ispoljavaju afinitet za TGF- β receptore. Vezujući se za svoje receptore TGF- β dovodi do fosforilacije SMAD (Similar mothers against deceptid) transkripcionih faktora koji su centralni medijatori u TGF- β signalnom prenosu. SMAD2 i SMAD3 se takođe aktiviraju putem receptora, dok SMAD4 služi kao zajednički partner za sve receptorski aktivirane SMAD proteine.

TGF- β -SMAD prenosni signal je uključen u proces tkivne fibroze, uključujući i renalnu (114), hepatičnu (115), kutanu (116) i plućnu fibrozu (117).

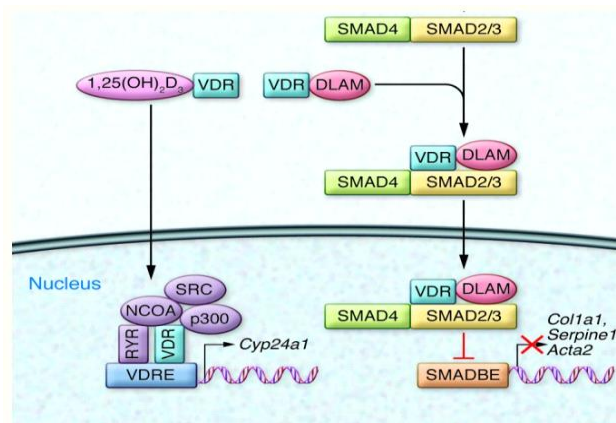
VDR se aktivira pod dejstvom $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ koji ima ulogu liganda, te u stanju aktivacije specifično koči TGF- β -SMAD signalni prenos putem direktne interakcije sa

SMAD3. U mišjem modelu tkivne fibroze terapija sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zaustavlja TGF- β -SMAD signalni prenos (118).

Proces nastanka fibroze se odvija preko TGF- β -SMAD signalnog puta (119). TGF- β se vezuje na površini ćelije za tip I i tip II serin/treonin receptorske kinaze što rezultira u fosforilaciji SMAD2 u SMAD3, koji se potom oslobađaju u citosol i vezuju kao kompleks sa SMAD4. Nakon translokacije u ćelijsko jedro SMAD 2/3/4 kompleks se lokalizuje u području SMAD - vezujućih elemenata unutar genoma sa ulogom da utiču na profibrotičke i druge ciljane gene (120).

Prevenција ovog TGF- β -SMAD vezivanja predstavlja prevenciju ispoljavanja profibrotskih gena. Aktivirani VDR koči TGF- β -SMAD signalni prenos.

Sintetisani su novi VDR ligandi na bazi analogije sa VDR-ligand kompleksom. Oni inhibiraju TGF- β -SMAD signalni prenos, bez aktivacije VDR-om posredovane transkripcije, koji takođe značajno smanjuju renalnu fibrozu u eksperimentnom mišjem modelu. Identifikovana su 2 sintetska VDR liganda: iz $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin D_3 -26,23-laktama (DLAM) su izvedeni DLAM-iPr i DLAM-4P koji selektivno koče TGF- β -SMAD signalni prenos bez aktiviranja klasične VDR-om posredovane transkripcije. DLAM-iPr i DLAM-4P zaustavlja renalnu fibrozu bez nastanka hiperkalcemije. Ovi ligandi ne uzrokuju hiperkalcemiju koja inače nastaje zbog stimulacije transkripcione aktivnosti VDR-a (121). Slika 11.



Slika 11. Klasični $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR put aktivacije gena preko Cyp24a1 i DLAM-VDR kompleks koji prevenira tj. zaustavlja vezivanje za SMAD3-vezujući element-SMADBE čime se prevenira ispoljavanje profibrotskih gena (119).

1.4.4. Delovanje na eritropoezu

Delovanje vitamina D se povezuje sa poboljšanjem anemije i smanjenjem potrebne doze agenasa za stimulaciju eritropoeze - ASE koja je potrebna za njenu korekciju (122). Eritropoetinske ćelije ispoljavaju VDR koji svojom aktivacijom podstiču proliferaciju i sazrevanje eritroidnih progenitorskih ćelija. Anemija u hroničnoj bubrežnoj slabosti kod koje postoji i smanjenje D vitamina uslovljena je sekundarnim hiperparatireoidizmom i zapaljenskim promenama. Dakle deficit kalcitriola, koji je u osnovi hiperparatireoidizma može da umanju eritropoezu.

In vivo i *in vitro* studije su pokazale da kalcitriol smanjuje oslobađanje citokina. Aktivacijom VDR-a se se koči oslobađanje zapaljenskih citokina u stromalnim ćelijama i stimuše se oslobađanje interleukina-10 (IL-10) u limfocitima što istovremeno dovodi do antiinflamatornog i proliferativnog uticaja na eritroidne progentorske ćelije (123).

U bolesnika sa HBI, deficit vitamina D stimuliše imune ćelije u mikrosredini kostne srži na produkciju citokina što umanjuje eritropoezu. Imunološka aktivacija deluje na retikoloendotelni sistem što povećava sintezu hepcidina i dovodi do funkcionalnog nedostatka gvožđa.

Absorpcija i recikliranje gvožđa je u humanoj biologiji pod kontrolom hepcidin-ferroporinske osovine (124). Povišeni nivo hepcidina koči preuzimanje gvožđa iz creva i njegovo odlaganje u retikolendotelni sistem (125). Hepcidin zadržava gvožđe u makrofagima vezujući ga za njihov receptor ferroportin. Vezivanje gvožđa dovodi do njegovog zadržavanja i degradacije čime se onemogućava njegovo dalje oslobađanje u cirkulaciju (126).

Zughaier i sar. su pokazali da je 1,25-dihidroksivitamin-D₃ u korelaciji sa smanjenjem hepcidina i porastom ferroportinskog ispoljavanja u lipopolisaharidima (LPS) stimulisanih THP-1 ćelija (makrofagna ćelijska kultura). U *in vitro* eksperimentu 1,25(OH)₂D₃ je uzrokovao dozno-zavisno smanjenje prohepcidinskih citokina, IL-6 i IL-1β (127). Takođe je pokazano da visoke doze vitamina D utiču na nivo sistemskog hepcidina u bolesnika sa ranim stadijumum hronične bubrežne slabosti. Dakle, dodavanje D vitamina dovodi do smanjenja koncentracije serumskog hepcidina kod ovih bolesnika (128).

1.4.5. Vitamin D i Renin-Angiotenzin-Aldosterone Sistem (RAAS)

Sistem renin-angiotenzin-aldosteron ima važnu ulogu u regulisanju krvnog pritiska, elektrolita i održavanja bilansa tečnosti. Niži nivo 25(OH)D je nezavisno povezan sa povećanim rizikom od nastanka hipertenzije (129).

Studije na životinjama i ljudima sugerišu da nedostatak vitamina D može povećati aktivnost RAAS-a, istovremeno i sistemski i na nivou bubrega. Li i sar. su pokazali 2002. godine da reninsko ispoljavanje i stvaranje plazmatskog angiotenzina II kod vitamin D receptor - null (VDR-null) miševa dovodi do hipertenzije, kardijalne hipertrofije i povećanog unosa vode. U „wild-type“ miševa, inhibicija sinteze 1,25-dihidroksivitamin-D₃ takođe dovodi do porasta reninskog ispoljavanja, dok primena injekcija 1,25-dihidroksivitamin-D₃ vodi reninskoj supresiji.

Kod eksperimentalnih miševa kojima je isključen (knock-out) bilo VDR, ili 1 α -hidroksilaza dolazi do porasta aktivnosti RAAS-a i pojave hipertenzije (130).

Studije na ljudima ukazuju na različite rezultate. Vaidya i sar. su pokazali da osobe sa niskim nivoom 25(OH)D imaju povišene vrednosti sistemske i specifično bubrežne RAAS aktivacije. Malom, open label, nekontrolisanom studijom na gojaznim osobama sa nedostatkom vitamina D je utvrđeno da terapija ergokalciferolom smanjuje bubrežno-specifičnu RAAS aktivnost i krvni pritisak (131).

Randomizovana, dvostruko slepa studija McMullan-a nije utvrdila korist od korekcije nedostatka vitamina D na aktivnost RAAS-a i vrednosti krvnog pritiska (132).

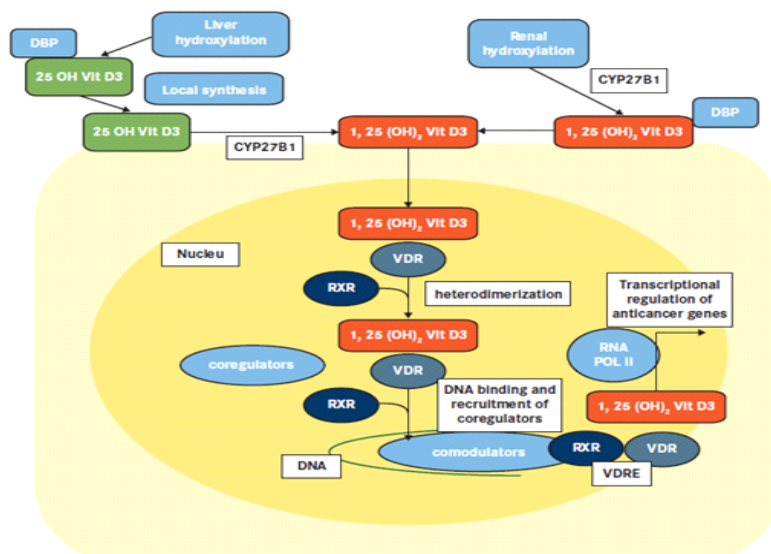
Takođe, dve velike randomizovane kliničke studije PRIMO i OPERA nisu dokazale da aktivacija VDR-a utiče na reverziju ventrikularne hipertrofije (133,134).

1.4.6. Antineoplastično delovanje

Nekoliko studija je ukazalo na to da vitamin D ima zaštitnu ulogu u nekoliko tipova karcinoma, kao što su karcinom prostate, dojke i kolona. Vitamin D takođe koči proliferaciju humanih leukemijskih ćelijskih linija i podstiče diferencijaciju normalnih i leukemijskih mijeloidnih prekursora tako da povećava njihovu zrelost i smanjuje agresivni potencijal leukemijskih ćelija (97).

Pokazano je da je adekvatni nivo vitamina D u telu važan faktor u predviđanju prognoze i mortaliteta kod nekoliko tipova karcinoma (135).

Takođe je značajan zaključak velike meta-analize Li-a i sar. koja ukazuje da bolesnici sa višim nivoom vitamina D u vreme postavljanja dijagnoze imaju bolji ishod bolesti (136).



Slika 12. Mehanizam antineoplastičnog delovanja kalcitriola preko VDR-a (137)

Delovanje kalcitriola se ostvaruje preko VDR-a. Nakon vezivanja kalcitriola za VDR nastaje dimerizacija sa retinoid X receptorom (RXR) koji se potom translocira u ćelijsko jedro. RXR-VDR kompleks se vezuje za vitamin D osetljive elemente (vitamin D response element-e VDRE) u brojnim regulatornim regionima u promotornim regijama ciljnih gena. Privlačenje ko-aktivatora i ko-represora vodi do pozitivnog ili negativnog odgovora u procesu transkripcije u genskoj ekspresiji (137). Slika 12.

Ispoljavanje enzima CYP24A1 i CYP27B1 u kancerskim ćelijama je veoma važno za regulisanje funkcionisanja ovih ćelija.

Visok nivo bazalne ekspresije enzima CYP24A1 (24-hidroksilaza) se pojavljuje u nekoliko vrsta kancerskih ćelija čineći da one postanu rezistentne na delovanje kalcitriola. CYP24A1 ili 24-hidroksilaza je enzim koji dovodi do razgradnje 1,25(OH)₂D₃ i 25(OH)D i pozitivno je regulisan kalcitriolom. Dakle aktivnost vitamina D₃ je kontrolisana autoregulacijom budući da aktivna forma vitamina D započinje sopstvenu inaktivaciju stimulacijom aktivnosti 24-hidroksilaze. Spontani pojačani odgovor u sintezi CYP24A1 se javlja kod onih tipova karcinoma koji imaju lošiji ishod (138). Inhibicija CYP24A1 višestruko povećava biološku aktivnost kalcitriola što je pokazano prilikom upotrebe inhibitora citohorm P 450, kao što su ketokonazol, liarazole, genistein (139).

CYP27B1 (1 α -hidroksilaza) je enzim koji katalizuje proces pretvaranja 25(OH)D u 1,25(OH)₂D₃ koji se odvija u bubrezima. Regulacija CYP27B1 u kancerskim ćelijama zavisi od vrste tkiva i stadijuma tumorskog procesa. Ispoljavanje CYP27B1 zavisi od stepena ćelijske diferencijacije i izraženije je u bolje diferenciranim tumorima. Tumori sa smanjenim ispoljavanjem CYP27B1 imaju veći potencijal rasta zbog smanjenog lokalnog stvaranja kalcitriola što umanjuje inhibiciju proliferacije (140).

Mehanizmi kojima kalcitriol ostvaruje svoje antikancerske efekte su:

- * antiproliferativno delovanje putem inhibicije/supresije mitogenih signala od strane faktora rasta kao što insulinu sličan faktor rasta IGF-1 (insulin like growth factor-1), povećavanjem ispoljavanja IGF-1 vezujućeg proteina, epidermalnog faktora rasta i povećavanjem inhibitora rasta kao što je TGF- β ,
- * povećava ispoljavanje inhibitora ciklin zavisne kinaze (CDK) p21 i p27, čime se smanjuje aktivnost CDK i zaustavlja ciklus ćelijske deobe,
- * podstiče apoptozu kroz supresiju specifičnih antiapoptotičnih proteina kao što je Bcl-2, čime se ćelija zaustavlja u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa i time umanjuje intenzitet proliferacije,
- * pokreće pro-diferencijacione mehanizme ćelije kao što su regulacija β katenina, JUN N-terminalne kinaze, i NF κ B signalinih puteva,
- * Koči angiogenezu smanjivanjem ispoljavanja vaskularanog endotelnog faktora rasta (vascular endothelial growth factor - VEGF) putem potiskivanja transkripcije hipoksijom-podsticanog faktora 1 alpha i IL-8 na NF- κ B-zavistan način,
- * ima direktno antiproliferativno dejstvo na endotelne ćelije u tumorskom tkivu,
- * ispoljava antiinflamatorne efekte putem kočenja ciklooksigenaze 2 (COX-2) i prostaglandina, kao i NF- κ B signalizacije (97).

1.5. Uticaj vitamina D na proteinuriju

Proteinurija je dobar prognostički marker progresije hronične bubrežne bolesti. Analiza studije preseka Trećeg Nacionalnog Istraživanja Ishrane i Zdravlja (Third National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES III) je utvrdila povezanost između nedostatka vitamina D i povećane prevalencije albuminurije kod odrasle američke populacije, sa zaključkom koji ukazuje da vitamin D ima intrinzičku antiproteinuričku aktivnost (141).

1.5.1. Mehanizmi delovanja kojima vitamin D utiče na smanjenje proteinurije

1.5.1.1. Direktni mehanizmi delovanja

1.5.1.1.1. Glomerul (podociti i mezangijumskećelije)

Imunohistohemijske studije ukazuju da je VDR ispoljen na proksimalnim i distalnim tubularnim epitelnim ćelijama, glomerulskim parijetalnim epitelnim ćelijama i ćelijama sabirnih kanalića. VDR se takođe nalaze na makuli denzi jukstaglomerulskog aparata kao i na podocitima. Za razliku od ovih ćelija VDR su retko prisutni ili potpuno odsutni na intersticijskim fibroblastima, glomerulskim mezangijumskim ćelijama i juktaglomerulskim ćelijama (142, 143). Podociti imaju ključnu ulogu u regulaciji glomerulske filtracije. Stopičasti produžci podocita su sastavni deo glomerulske filtracione barijere koja zaustavlja filtriranje proteina u urin (144).

Studija Wanga i sar. ukazuje da vitamin D/VDR signalizacija u podocitima ima kritičnu ulogu u zaštiti bubrega od dijabetesnog oštećenja. U studiji su korišćeni eksperimentalni miševi DBA/2J koji prekomerno ispoljavaju humani VDR (hVDR). Nakon indukcije dijabetesne bolesti streptozotocinom transgenični miševi imaju manju albuminuriju od kontrolnih miševa divljeg tipa. Primena niske doze vitamina D u transgeničnim miševima prevenira pojavu albuminurije, umanjuje gubitak podocita i umanjuje apoptozu, takođe redukuje i glomerulsku fibrozu. Ista doza vitamina D ne daje rezultate kod divljeg tipa miša (143).

U dijabetesnoj nefropatiji, podociti postaju funkcionalno i strukturno izmenjeni, posebno u pogledu funkcije nefrina i podokaliksima koji su strukturni proteini slit dijafragme

(145). Vitamin D₃ preko VDR deluje zaštitino u odnosu na nefrin koji ima značajnu intercelularnu signalnu ulogu (146).

Podociti gube negativno naelektrisanje i integritet slit dijafragme što dovodi do prekida u filtracionoj barijeri i postupnog razvoja DN. U sastavu slit dijafragme se osim nefrina nalaze i nefrinu pridruženi proteinski kompleksi koji sadrže molekule kao što su CD2-asocirani protein (CD2AP), podocin i zonula occludens-1 (ZO-1).

Nefrin, CD2AP i podocin, osim što imaju strukturnu funkciju, mogu da pokrenu i PI3K/AKT zavisnu signalnu transdukciju u podocitima. PI3K/pAkt signalni putevi deluju zaštitino u odnosu na podocite i umanjuju proteinuriju (147, 148).

Ranije studije ukazuju da mezangijumske ćelije ispoljavaju VDR. Primena 1,25(OH)₂D₃ inhibira proliferaciju mezangijumskih ćelija in vivo u eksperimentalnom anti-Th-1 glomerulonefritisu (149).

Novije studije ukazuju da nije identifikovano prisustvo VDR-a u mezangijumskim ćelijama (143).

1.5.1.1.2. Tubulointercicijum (tubularne epitelne ćelije i intersticijski fibroblasti)

VDR su prisutni i u tubularnim epitelnim ćelijama, i regulišu funkciju ovih ćelija izvan sistema homeostaze kalcijuma. VDR su nishodno regulisani u HBI i u deficijenciji aktivnog vitamina D (150).

Povoljan efekat 1,25(OH)₂D₃ na TIF je potvrđen i u životinjskom modelima HBI koja je indukovana jednostranom ureteralnom obstrukcijom. U eksperimentu je pokazano da su miševi kojima je injiciran parikalciol tokom 7 dana razvili značajno manje fibrotične lezije nakon obstruktivne lezije, u poređenju sa kontrolnim. Parikalciol je značajno oslabio ekspresiju fibronektina, kolagena I i kolagena III, dok je u značajnoj meri obnovio ekspresiju VDR (151).

1.5.1.2. Indirektni mehanizmi delovanja

1.5.1.2.1. Inflamacija

Hronična inflamacija se odlikuje infiltracijom inflamatornih ćelija u glomerulima i tubulointersticijumu, i smatra se za ključni patogenetski mehanizam u razvoju i progresiji HBS (152).

Kliničke studije ukazuju na korelaciju između smanjenja bubrežne funkcije i stepena i rasprostranjenosti infalmacije.

Poznato je da vitamin D ima imunomodulatorna svojstva koja se ispoljavaju preko VDR-a, koji su prisutni u većini ćelija imunog sistema, kao što su makrofagi kao antigen prezentirajuće ćelije, denritične ćelije i CD4+ i CD8+ T ćelije (153, 154).

U bubregu se imunomodulatorni efekat ispoljava, napr. *in vitro*, tako da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ slabi efekte ekspresije TNF- α indukovanog monocitno hemoatraktnog proteina 1 (MCP-1) od strane ćelija proksimalnih tubula, u humanom materijalu (155).

Tumor nekrosis factor- α (TNF- α) takođe stimuliše produkciju hemotaktičkog faktora od strane rezidentnih ćelija. Makrofagi, kao i intrizičke ćelije bubrega, su primarni izvor TNF- α . *In vivo*, kalcitriol indukuje dozno-zavisnu inhibiciju produkcije TNF- α u zdravih osoba i u hemodijaliznih bolesnika (156).

Pored inhibitornog efekta na dendritičke ćelije i makrofage $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ima i direktni efekat na CD4+ T-ćelije u pojačanju Th2 ćelijskog odgovora, koje nishodno regulišu (umiruju) imuni odgovor (157).

Stimulacija makrofaga sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ poništava njihov proinflamatorni odgovor i T-ćelijsku produkciju citokina (158, 159).

Štaviše, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i njegovi analozi podstiču diferencijaciju mijeloidnih progenitora u makrofage i redukuju MCP-1 i IL-6 ekspresiju putem inhibicije aktivacije NF- κB u makrofagima (157, 160).

1.5.1.2.2. RAAS

Doprinos VDR deficijentnih eksperimentalnih miševa je veoma značajan u ispitivanju uloge VDR-a u metabolizmu. VDR izbijeni (knockout) – VDRKO miševi su osetljiviji na streptozotocin (STZ) - indukovanu dijabetesnu bubrežnu bolest. Unilateralna ureteralna obstrukcija u stanju dijabetesne bolesti i deficita VDR-a dovodi do značajnog bubrežnog oštećenja najvećim delom zbog aktivacije RAAS-a u bubregu, što rezultira pojavom albuminurije, glomeruloskleroze i intersticijske fibroze (161).

Nizak nivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ povećava produkciju renina i aktiviranog RAAS-a u životinjskom modelu (142).

D vitamin je moćan negativni endokrini regulator RAAS-a i deluje dominantno kao supresor biosinteze renina (162). Deficit vitamina D stimuliše reninsku ekspresiju, dok injekcija $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ redukuje sintezu renina (163).

U ćelijskim kulturama $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direktno suprimira transkripciju reninskog gena putem VDR - zavisnog mehanizma. Kombinovana terapija dijabetičnih miševa primenom losartana i parikalcitola kompletno prevenira albuminuriju, obnavlja strukturu glomerulske filtracijske barijere i značajno redukuje glomeruloskleroza (164).

1.5.1.2.3. Insulinska sekrecija i senzitivnost

Prisustvo VDR u β -ćelijama pankreasa je značajno jer nedostatak vitamina D utiče na isulinsku sekreciju, insulinsku rezistenciju i disfunkciju β -ćelija pankreasa.

Nedostatak vitamina D dovodi do smanjenje sekrecije insulina, dok njegova nadoknada obnavlja glikozom stimulisano insulinsku sekreciju.

Indirektne efekte vitamin D ostvaruje putem regulacije kretanja kalcijuma kroz ćelijsku membranu kao i funkcije intracelularnog kalcijuma.

Sekrecija insulina je pod uticajem koncentracije kalcijuma u β -ćelijama. D vitamin reguliše funkciju kalbidina, kalcijuim – vezujućeg proteina u pankreasnim β -ćelijama, koji ima uticaja na insulinskom sekrecijom stimulisano depolarizaciju ćelijskih struktura.

Vitamin D reguliše insulinsku senzitivnost putem stimulacije ekspresije insulinskih receptora (165). Dodatno podstiče ispoljavanje peroksisom proliferacije - aktivirane receptore (peroxisome proliferator-activated receptor - PPAR) delta koji pripadaju grupi nuklearnih receptora (NR) i senzora masnih kiselina čija je uloga u regulaciji metabolizma masnih kiselina u skeletno-mišićnom i masnom tkivu (166, 167).

Intracelularni kalcijum je ključni faktor periferne insulinske rezistencije. Smanjeni nivo kalcijuma dovodi do smanjene signalne transdukcije što rezultira smanjenom aktivnošću glikoznog transporta (168).

1.6. Kliničke studije uticaja vitamina D na proteinuriju

Bazalna albuminurija je skoro u linearno zavisnom odnosu sa dva najčešće definisana ishoda bubrežnih bolesti (dupliranje vrednosti kreatinemije ili terminalni stadijum bubrežne slabosti). S toga se smatra da predstavlja najsnažniji prediktor od svih uobičajeno korišćenih parametara rizika za nastanak ovih promena (169).

Na osnovu predkliničkih studija koje su pokazale zaštitno dejstvo vitamina D u odnosu na proteinuriju, urađeno je nekoliko kliničkih studija koje su ispitivale uticaj visokih doza analoga vitamina D na proteinuriju kod bolesnika sa tipom 2 dijabetesa (1 i 2 $\mu\text{g}/\text{dan}$ parikalcitola) (170), kao i visokih doza nutritivnog vitamin D (40.000 jed./nedeljno)(171) i (50.000 jed./nedeljno) (172, 173).

U eksperimentu de Zeeuw-a i sar. ispitanici su primali tokom 24 nedelje placebo i paricalcitol u dozi od 1 $\mu\text{g}/\text{dan}$, i 2 $\mu\text{g}/\text{dan}$. Samo primenom 2 $\mu\text{g}/\text{dan}$ paricalcitola uz istovremeno stabilnu ihibiciju RAAS sistema postignuto je značajno sniženje rezidualne albuminurije kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom (170).

Primena visokih doza holkaciferola (50. 000 jed./nedeljno) je dala različite rezultate:

U istraživanju Momeinija (172) koje je trajalo 8 nedelja, nije nađena razlika u proteinuriji između studijske i kontrolne grupe, dok je nađena signifikantna razlika između promena proteinurije koja je registrovana na početku i na kraju istraživanja u obe grupe ($p=0,028$).

U istraživanju Petrović M. (171) koje je trajalo 6 meseci utvrđeno je signifikantno sniženje 24h proteinurije u grupi bolesnika sa normalnom proteinurijom ($< 150 \text{ mg}/24\text{h}$) ($p=0,003$) u grupi sa mikroproteinurijom (150-500 $\text{mg}/24\text{h}$) ($p<0,001$) kao i u grupi bolesnika sa makroproteinurijom ($> 500 \text{ mg}/24\text{h}$) ($p=0,015$).

Suprotno tome, u istraživanju Ahmadija i sar. (173) koje je trajalo 12 nedelja UACR kao glavna varijabla nije se promenila signifikantno nakon primene leka ($p=0,919$).

Međutim, primena analoga vitamina D zahteva velike troškove, i do sada nije poznato koje bi mogle biti posledice dugotraje primene ovog preparata, s obzirom da istraživanja nisu sprovedena duže od 24 nedelje. Primena visokih doza holekaciferola u dužem periodu bi bila povezana sa neophodnošću češćih kontrola nivoa kalcijuma u serumu i urinu kao i vrednosti PTH, što takođe značajno poskupljuje ovaj terapijski modalitet uz istovremno stalno prisutan rizik od intoksikacije vitaminom D (174, 175).

Za razliku od prethodno navedenih istraživanja, sprovedene su studije sa značajno manjim dozama vitamina D3 (holekaciferol 800 jed./dan i kalcitriol 0,5 µg/dan) tokom 8 i 24 nedelja, čiji su rezultati bili komparabilni sa onima koji su dobijeni primenom visokih doza vitamina D (176, 177).

Primena niskih doza analoga vitamina D je ispitivana u istraživanju Bonakdaran-a i sar. u kojem su bolesnici sa deficitom/insuficijencijom vitamina D primali u terapiji kalcitriol od 0,5 µg u trajanju od 8 nedelja.

Utvrđeno je da da kalcitriol imao povoljan efekat na stepen albuminske ekskrecije, mada promene nisu bile signifikantne ($p=0,22$) (176).

U istraživanju Huang Y. i sar. primenjivana je fiksna doza holekalciferola od 800 ij dnevno tokom 6 meseci. Nakon studije preseka u koju je bilo uključeno 481 ispitanik sa dijabetes mellitusom tipa 2 i 78 zdravih kontrola, u longitudinalnu interventnu studiju su uvedeni bolesnici sa mikroalbuminurijom (MA) i to 22 bolesnika koji su primali holekaciferol i 24 bolesnika koji su bili kontrolna grupa. U inicijalnoj studiji su formirane grupe dijabetesnih bolesnika koji su imali normo-albuminuriju (NA) čije su vrednosti ACR-a <30 mg/g, mikroalbuminuriju (MA) sa vrednostima ACR-a između 30 i 300 mg/g i koji su imali makroalbuminuriju (DN) sa vrednostima ACR-a (>300 mg/g) (177).

Postignuto je signifikantno sniženje vrednosti mikroalbuminurije u ranom stadijumu primenjene terapije, pri čemu je tokom daljeg praćenja došlo do gubitka ovog pozitivnog efekta. Najizraženije smanjenje proteinurije je postignuto tokom drugog meseca primene holekalciferola. ACR se smanjio sa 97,39 mg/g (62,43–476,70) na 71,65 mg/g (40,40–469,98) u drugom mesecu praćenja bolesnika ($p=0,01$) da bi nakon 6 meseci došlo čak do porasta na 120,36 mg/g (33,89–695,26) ($p=0,239$).

U istraživanju Kim-a i sar. 54 bolesnika sa deficitom/insuficijencijom vitamina D lečeno je različitim dozama vitamina D koje su primenjivane u zavisnosti od stepena utvrđenog sniženja na početku studije. Bolesnici su praćeni nakon 2 i 4 meseca, te je

utvrđeno da je došlo do signifikantnog sniženja ACR-a. uACR je smanjen od (geometrijska sredina sa 95% intervala poverenja) 16,4 mg/mmol (9,7–27,4) na 12,2 mg/mmol (7,1–20,7) nakon 2 meseca ($p=0,0011$) i 12 mg/mmol (7,0–20,8) nakon 4 meseca ($p=0,0201$ u odnosu na bazalne vrednosti).

Zaključeno je da holekaciferol može ispoljiti komparabilni antiproteinurični efekat sa analogima vitamina D (178).

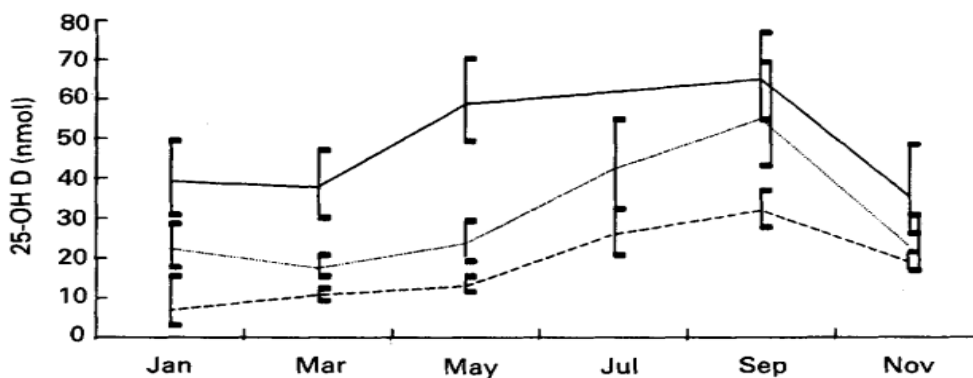
Treba napomenuti, da je u ovim istraživanjima primenjivana fiksna doza (osim u studiji Kima i sar. u kojoj nisu analizirane primenjene doze niti vrsta preparata vitamina D), bez obzira na nivo početno utvrđenog smanjenja vitamina D, tako da je dobijen samo relativni, a ne i potreban apsolutni porast u nivou vitamina D u serumu.

Istraživanja koja su trajala 6 meseci nisu uzimala u obzir sezonske varijacije u koncentraciji vitamina D u serumu ispitanika, naročito u umerenim klimatskom oblastima, i većina ispitanika je bila uključivana u studiju u zimskim mesecima, kada su njegove vrednosti najniže (176).

1.7. Sezonske varijacije vrednosti vitamina D i njihov značaj u kliničkim studijama

Kliničkim observacijama u prošlosti je zapaženo da je pojava rahitisa bila češća u proleće što je sugerisalo zaključak da je uticaj sunčevih zraka značajan za sintezu vitamina D.

Razvoj biohemijskih testova za vitamin D i njegove metabolite je omogućio utvrđivanje sezonskih varijacija nivoa 25(OH)D vitamina u plazmi kod zdravih osoba u studijama preseka i longitudinalnim studijama u Britaniji (slika 13). To su bile prve studije koje su pokazale signifikantne sezonske varijacije ovog značajnog vitamina.



Slika 13. Sezonske promene u serumu 25-hidroksiholecalciferol-a (25-OH D) za belce (-), nevegetarijanske Azijce (.....) i vegetarijanske Azijce (- - - -) (179)

Najveće vrednosti nivoa 25(OH)D su registrovane u jesen i nisu bile povezane sa dijetetskim unosom vitamina D. Ovi pokazatelji su ukazali da je uticaj sunčevih zraka u letnjim mesecima veoma značajan u Britaniji (179).

Podatak da je kod zdravih pojedinaca kod kojih je bio utvrđen veoma nizak unos vitamina D hranom, a kod kojih je takođe registrovan izražen porast u vrednosti ovog vitamina u serumu u jesenjim mesecima, ukazao je da uticaj sunčevih zraka može imati značajniji doprinos formiranju rezervi ovog vitamina od unosa hranom.

Mnoge kasnije studije iz različitih delova sveta su potvrdile značajne sezonske varijacije 25(OH)D, i izlaganje suncu je danas prihvaćen kao glavni faktor u formiranju depoa vitamina D u organizmu (180).

Prepoznavanje sezonskih varijacija 25-OH D uzrokovanih dejstvom sunčevih zraka podstaklo je interesovanje za fotobiologiju vitamina D.

U zemljama koje su udaljene od ekvatora, postoje sezonske promene u UV-B ekspoziciji zbog nižeg ugla pod kojim padaju sunčevi zraci kao i veće pokrivenosti oblacima u zimskim mesecima. Ekspozicija UV-B zracima je dodatno umanjena debljom odećom koja pokriva telo u celini tokom zimskih meseci. Kao posledica varijacija u UV-B radijaciji, nastaju i sezonske varijacije u nivou 25(OH)D i to tako da je on najviši u kasno leto a najniži u kasnu zimu i rano proleće. Stoga bi granične normalne vrednosti vitamina D radi procene efekta sezonskih varijacija trebalo odrediti pojedinačno prema geografskoj širini i klimatskom području.

Ovakve sezonske varijacije u koncentraciji 25(OH)D znače da osoba može imati adekvatan nivo 25(OH)D u letnjim i rano-jesenjim mesecima a suboptimalne koncentracije u zimu i proleće (181).

Studije koje su rađene u Grčkoj (182), Nemačkoj (183) i Irskoj (184) pokazuju da osobe sa suficijentnim nivoom vitamina D u toku letnjih meseci mogu imati deficit/insuficijenciju vitamina D u zimskom periodu.

Registrovano smanjenje 25(OH)D u studiji Papadakis-a je bilo 54% od avgusta do marta (182).

Genetska predispozicija ima značajnog udela u nastanku sklonosti ka deficitu/insuficijenciji vitamina D, kako vezano za preuzimanje vitamina D iz hrane tako i iz suplemenata, kao i vezano za sintezu ovog vitamina u koži nakon izlaganja suncu. Postojeće razlike su značajno zavisne od genetskih varijacija (185).

Nedovoljan nivo vitamina D je definisan od većine eksperata kao nivo serumskog 25(OH)D manji od 20 ng/ml (50 nmol/L) (186).

Nakamura i saradnici su zaključili da je potrebna najmanja koncentracija cirkulišućeg 25(OH)D u vrednosti od 20 ng/ml (50 nmol/L) da bi se PTH održavao na normalnom nivou tj. da bi se sprečio njegov porast i time obezbedila prevencija gubitka gustine kostiju, što je uzeto kao parametar na osnovu kojeg su određene referentne vrednosti ovog vitamina (186). Radi se o upravo onom nivou vrednosti PTH koji održava kost zdravom. Nivo PTH može da se menja u zavisnosti od bubrežne funkcije, fizičke utreniranosti, doba dana ili čak i ishrane.

Ne postoji konsenzus o optimalnom nivou unosa vitamina D koji će redukovati povišeni PTH, i zbog toga mnoge laboratorije imaju veoma široke referentne vrednosti za vitamin D od 20 do 40 ng/ml tj. 50 do 100 nmol/L.

Dakle, postavlja se pitanje koje su optimalne vrednosti vitamina D za organizam?

Radi procene optimalne vrednosti vitamina D u organizmu nekoliko značajnih eksperata je analiziralo veći broj istraživanja (187).

Parametri koji se analiziraju u cilju utvrđivanja potrebnog nivoa vitamina D su: optimalna mišićna snaga radi prevencije padova posebno kod starijih osoba, dentalno zdravlje, i prevencija nastanka karcinoma (posebno kolorektalnog kacinoma).

Analizom svih ovih podataka došlo se do konzistentnog odgovora koji ukazuje da je u odnosu na sva praćena zdravstvena stanja optimalan nivo vitamina D između 90 do 100

nmol/L, tj. 35 to 40 ng/ml, pre svega u oblasti prevencije bolesti (Tabela 3).

Tabela 3. Klasifikacija statusa vitamina D (188)

Total Serum 25(OH)D	Status
<12 nmol/L	Severely deficient
12 – <30 nmol/L	Deficient
30 – 50 nmol/L	Inadequate
>50 nmol/L	Adequate
>100 – 250 nmol/L	Suggested optimal (Zittermann, 2003)
>120 – 225 nmol/L	Suggested optimal (Heaney, 2011)

Table 1: United States Institute of Medicine vitamin D status classification system and suggested optimal concentrations (Zittermann, 2003; Heaney, 2011).

Za postizanje optimalne imunološke funkcije su potrebne vrednosti serumskog 25(OH)D veće od 120 nmol/L. Korisni efekti vitamina D iščezavaju kada vrednosti vitamina D padnu ispod 100 nmol/L (189).

Primena sredstava za zaštitu od sunca blokira UV-B zrake, a ova vrsta svetla stimuliše sintezu vitamina D u koži. Dakle zaštitna odeća, zaštitne kreme za sunce i izbegavanje izlaganja suncu može da rezultira u niskim vrednostima vitamina D krvi.

S obzirom da prekomerno izlaganje suncu može povećati rizik od bolesti kože uključujući i maligni melanom, neophodne su razumne preporuke koje predstavljaju kombinaciju zaštite od sunca i suplementacije vitamina D. Ovo je od posebnog značaja s obzirom da je utvrđeno da osobe koje žive u geografskom području sa obiljem sunca nemaju neophodno visoke vrednosti vitamina D u krvi, kao što je utvrđeno kod stanovnika Floride i južne Arizone (190). Izbegavanje sunca, starenje i gojaznost nezavisno i sinergistički učestvuju u smanjenju nivoa vitamina D u ovim oblastima.

Nekoliko studija je ispitivalo zastupljenost i izraženost sezonskih varijacija u nivou vitamina D.

McLaughlin je uradio veliku studiju preseka u kojoj je sprovedeno ispitivanje među zdravom populacijom Baltimora 1974. godine sa ciljem da se utvrdi nivo vitamina D u zavisnosti od pola, životnog doba, meseca u godini, te životnog stila u smislu izlaganja dejstvu sunčevih zraka. U kombinovanoj populaciji, vrednosti 25(OH)D su rasle od najnižih (72,9 nmol/L) u aprilu i dostizale zenit u oktobru sa vrednostima od 95,8 nmol/L. Srednja amplituda cikličnog sinusoidnog talasa je bila slična kod žena i muškaraca (11,9 (SD 3.02) v. 11.0 (SD 3,48) nmol/L) (179).

Takođe su utvrđene i značajne sezonske varijacije 1,25-(OH)₂D₃ za osobe oba pola.

Serumske 25(OH)D koncentracije i sezonske promene u zdravih, pokretnih nezavisnih starijih osoba su bile slične kao u mladih osoba.

Međutim, kod starijih osoba sa smanjenom mobilnošću, koja rezultira i smanjenim kretanjem po otvorenom prostoru i smanjenom izlaganju sunčevim zracima, utvrđene su manje izražene sezonske varijacije.

Zavisne, institucionalizovane starije osobe su imale mnogo niže vrednosti 25(OH)D u bilo koje doba godine.

Zaključeno je da ishrana veoma malo doprinosi rezervama vitamina D, i da ne može obezbediti potreban nivo ovog vitamina za institucionalizovane starije osobe bez spoljne aktivnosti, čak i kada su namirnice obogaćene vitaminom D, kao što je to propisano u pravilnicima za obogaćivanje namirnica u USA. Međutim suplementi vitamina D mogu da izmene normalnu sezonsku varijabilnost u nivou 25(OH)D, tako da primena 10 µg (400 IU) vitamina D održava njegov nivo u krvi u zadovoljavajućim koncentracijama tokom cele godine, čak i kod nepokretnih starih osoba.

Za razliku od njih, nezavisne, mobilne starije osobe, sa dovoljno izlaganja sunčevim zracima imaju sezonske varijacije nivoa vitamina D koje su komparabilne sa onima koje se dostižu primenom supstitucije kod institucionalizovanih starih osoba.

Sezonske varijacije su bile manje kod onih koji su uzimali multivitaminske preparate.

U studiji Bollanda (181), ispitivan je uticaj sezonskih varijacija vitamina D na postavljanje granica za suficijentnost ovog vitamina.

Naime, u studiji preseka u kojoj je ispitivano 1.606 zdravih postmenopausalnih žena i 375 starijih muškaraca iz Aucklanda, Novi Zeland, kod kojih su jednokratno urađena merenja nivoa vitamina D, utvrđeno je da je u proseku 49% (23-74%) postmenopausalnih žena i 9%

(0-26%) sredovečnih i starijih muškaraca imalo koncentracije 25(OH)D < 50 nmol/L. Međutim, sezonska analiza po mesecima ukazuje na mnogo veću prevalenciju deficijencije vitamina 25(OH)D koja je definisana njegovom vrednošću < 50 nmol/L i to kod 73% u žena i 39% u muškaraca, u kasnim zimskim i ranim prolećnim mesecima. Period trajanja sniženih vrednosti vitamina D je bio 250 dana/godinu u žena i 165 dana/godinu u muškaraca.

Na osnovu utvrđenih sezonskih varijacija je zaključeno da je kod postavljanja dijagnoze suficijentnih vrednosti vitamina D potrebno da njegove koncentracije u toku leta i jeseni za muškarce budu $\geq 70-90$ nmol/L a za žene $\geq 60-70$ nmol/L, kada su njegove vrednosti inače najveće, da bi se obezbedio nivo od 25(OH)D > 50 nmol/L tokom cele godine.

Ili napr. u cilju održavanja koncentracije 25(OH)D na nivou > 80 nmol/L tokom cele godine, muškarci bi trebali da postignu koncentraciju D vitamina > 100-120 nmol/L, a žene > 90-100 nmol/L u letnjim mesecima.

Potrebna vrednost vitamina D za svaki mesec se može izračunati ukoliko se, za suficijentni nivo vitamina D odredi vrednost 25(OH)D > 80 nmol/L, na zadati nivo vitamina D (> 80 nmol/L) doda prikazana vrednost u tablici za taj mesec umanjena za 50 nmol/L. Primer: za januar iznosi $80 + (131-50) = 161$ nmol/L. (Tabela 4).

Rezultati u ovoj studiji se mogu upotrebiti za definisanje novih graničnih vrednosti za suficijentne vrednosti vitamina D kao što su prikazani u tabeli 4. S tim što treba uzeti u obzir da se Novi Zeland nalazi na južnoj polulopti te su zimski meseci od juna-avgusta sa prosečnim temperaturama 12-15 C, a letnji meseci su od decembra do februara sa prosečnim temperaturama 20-25C.

Tabela 4. Minimalne vrednosti koncentracija 25(OH)D u serumu po polu i mesecima u godini (181)

The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency

TABLE 2
The minimum 25-hydroxyvitamin D concentration required to have a predicted 25-hydroxyvitamin D trough of >50 nmol/L, by month of measurement¹

Month	Men (n = 378)	Women (n = 1606)
	nmol/L	
January	81 (76, 86)	65 (63,67)
February	87 (82,92)	69 (67,71)
March	87 (82,92)	71 (69,73)
April	79 (74,84)	67 (65,69)
May	69 (64,74)	62 (60,64)
June	59 (53,65)	57 (55,59)
July	52 (46,58)	52 (50,54)
August	50 (44,56)	50 (48,52)
September	50 (44,56)	50 (48,52)
October	53 (47,59)	51 (49,53)
November	61 (55,67)	54 (52,56)
December	71 (66,76)	60 (58,62)

Na osnovu dobijenih rezultata autor zaključuje da bi definicija suficijentnog nivoa vitamina D trebala da se odnosi na najniže vrednosti vitamina D u krvi tokom godine.

U retrospektivnom istraživanju Bonelli O, i sar. sprovedenom na osnovu laboratorijskog informacionog sistema u Univezitetskoj Bolnici u Parmi (severno-zapadna Italija), analizirane su vrednosti serumskog vitamina D (25-hydroxyvitamin D) koje su merene kod ambulantnih ispitanika starijih od 18 godina, a koji su se javljali na rutinsku kontrolu zdravlja tokom cele 2014. godine.

Studijska populacija se sastojala od 11.150 ispitanika (mediana godina 62 i interkvartilni raspon (IQR), 49–73 godina; 8 592 žena i 2 558 muškaraca). Vrednosti vitamina D su bile više u žena (62 nmol/L; 38–86 nmol/L) nego u muškaraca (56 nmol/L; IQR, 33–77 nmol/L; $p < 0.001$).

Mediana koncentracije ukupnog vitamina D je bila statistički značajno niža u uzorcima koji su dobijani tokom zime u odnosu na ostale mesece. Vrednosti D vitamina dobijenih u letnjim i rano-jesenjim mesecima su za 35% bile veće od vrednosti dobijenih u zimskim mesecima i 12% veće od onih koje su dobijene u proleće (Tabela 5) (191).

Tabela 5. Sezonsko uzorkovanje krvi za procenu statusa vitamina D (191)

J Med Biochem 2016; 35 (2)

115

Table 1 Age, sex and values of total vitamin D (median and interquartile range) according to the season of blood testing in an unselected population of Italian outpatients.

	Winter	Spring	Summer	Autumn	p
n	2381	3048	2371	3350	
Age (years)	62 (49–73)	62 (49–73)	62 (49–74)	62 (50–74)	0.628
Sex (Women; %)	1885 (79%)	2411 (79%)	1820 (77%)	2476 (74%)	<0.001
Total vitamin D values (nmol/L)	50 (30–70)	56 (33–80)	68 (47–89)	68 (44–89)	<0.001
Total vitamin D values <50 nmol/L (%)	1116 (47%)	1319 (43%)	612 (26%)	962 (29%)	<0.001

Prevalencija deficijencije vitamina D je bila skoro 2 puta veća u uzorcima uzetim u zimskim i prolećnim mesecima u poređenu sa onima iz letnjih i jesenjih meseci.

I pored poznate činjenice da starije osobe imaju niže vrednosti Vitamina D jer se njegova sinteza u koži smanjuje sa godinama, pojava smanjenja vrednosti u zimskim mesecima je potvrđena i kod osoba mlađih od 65 godina kao i kod onih koji su starije od 65 godina (Tabela 6).

Tabela 6. Sezonsko uzorkovanje krvi za procenu statusa vitamina D kod osoba mlađih i starijih od 65 godina .(191)

Table II Values of total vitamin D (median and interquartile range) according to the season of blood testing in subjects aged <65 years and in those aged 65 years or older.

	Winter	Spring	Summer	Autumn	p
Age < 65 years, n	1322	1686	1304	1851	
Total vitamin D (nmol/L)	50 (33–71)	56 (36–77)	71 (53–90)	65 (47–86)	<0.001
Age ≥ 65 years, n	1059	1362	1067	1499	
Total vitamin D (nmol/L)	55 (27–80)	56 (27–80)	65 (38–89)	68 (41–92)	<0.001

Značajno je da je analiza rađena u zemlji u kojoj ne postoji zakon o obaveznom obogaćivanju namirnica dodavanjem vitamina D, kao što je to u većini Evropskih zemalja.

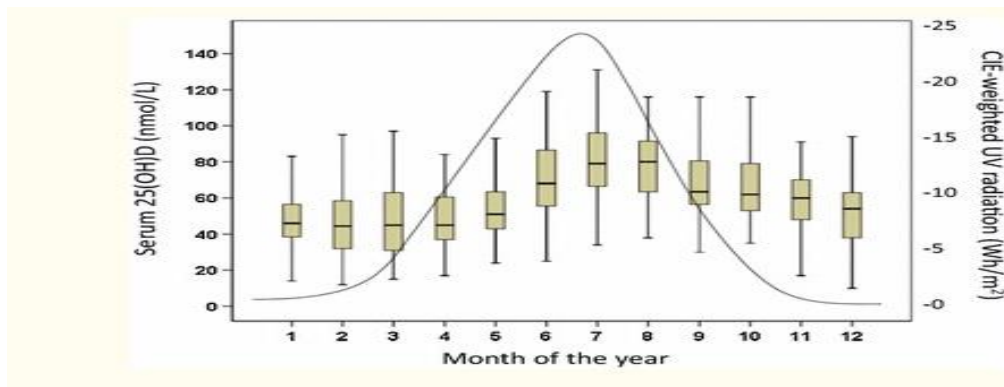
Drugi važan aspekt je umerena klima u provinciji Parme koja je slična kao u ostalim Centralno Evropskim zemljama lociranim između 40 i 60-og stepena geografske širine kao što su Srbija, Hrvatska, Nemačka, Francuska i Španija, između ostalih. Stoga se dobijeni rezultati mogu odnositi sa većom sigurnošću na ceo Evropski kontinent.

Takođe je zaključeno da u odsustvu suplementacije količina vitamina D u letnjim mesecima treba da bude dovoljno visoka da bi se održao nivo ovog vitamina na vrednostima > 50nmol/L tokom preostalog dela godine.

Studija Klingberg i sar. (192) koja je rađena na populaciji zdravih donora krvi i trombocita Švedske je utvrdila da je:

1. nađena pozitivna korelacija između CIE (International Commission on Illumination) ponderisane UV radijacije koja je rasla od 0,36Wh/m² u decembru do 24,25Wh/m² u julu sa vrednošću 25(OH)D u serumu.
2. srednja vrednost S-25(OH)D bila 73% viša u julu (81,9±26,2 nmol/L) nego u februaru (47,4 ± 20,7 nmol/L).
3. srednja vrednost S-25(OH)D tokom trećeg kvartala (juli – septembar) (77,7 ± 27,3 nmol/L) je bila viša 62% u odnosu na vrednosti tokom I kvartala (januar-mart) (47,9 ± 19,6 nmol/L)
4. tokom I kvartala je u odnosu na donju granicu normalnih vrednosti vitamina D od 50 i 75 nmol/L, 58% i 88% ispitanika imala snižene vrednosti S-25(OH)D a tokom trećeg kvartala je snižene vrednosti S- 25(OH)D imalo 11% i 50% ispitanika.

5. intra-individualna analiza je pokazala srednji porast vrednosti S-25(OH)D za 8 nmol/L/mesec u periodu od aprila do avgusta.
6. individualni minimum i maksimum S-25(OH)D su bili u jakoj korelaciji ukazujući da svaki ispitanik ima svoju ličnu krivu sezonskih promena u vrednosti vitamina D.
7. može se očekivati da će vrednosti S-25(OH)D koje se izmere u kasno proleće biti za $35,1 \pm 16,3$ nmol/L veće u kasno leto, i obrnuto što se može koristiti radi procene potrebne korekcije doze vitamina D u toku godine. Slika 14.



Slika 14. Serumski 25(OH)D tokom različitih meseci u godini. Vrednosti koje predstavljaju medijane (horizontalne linije), interkvartilne rangove (boksovi) i rangove vrednosti (tanke linije) (192)

Itoh H. (193) je ispitivao sezonske i međudnevne oscilacije cirkulišućeg 25-hidroksivitamina D kod fabričkih radnika koji rade u dnevnoj smeni. Studija je bila longitudinalna i rađena kod četiri ispitanika starosti 32-57 godina, kojima su uzimani uzorci krvi u februaru i oktobru.

Merene su vrednosti plazma 25(OH)D, intaktnog PTH i $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ u 12 uzoraka dobijenih od svakog učesnika. Utvrđen je dosledan relativni porast u individualnim mesečnim srednjim vrednostima (od po 6 merenja) nivoa 25(OH)D iz oktobra u odnosu na vrednosti iz februara.

Za intaktni PTH, je zapažen suprotan trend, s obzirom da je utvrđen relativni pad od 15–41% u individualnim srednjim mesečnim vrednostima intaktnog nivoa PTH u oktobru u odnosu na februar.

Istovremeno, nisu utvrđene sezonske individualne promene u nivou $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Godišnji maksimalni nivo 25(OH)D je nađen u oktobru kod radnika koji rade u zatvorenom prostoru (a u novembru kod onih koji rade u spoljnoj sredini), dok je godišnji maksimum ultraviolettne radijacije bio registrovan u julu. Ovo relativno dugo kašnjenje

između maksimalnog dejstva UV-B zraka i dostignute maksimalne vrednosti vitamina 25(OH)D se može objasniti svojstvima previtamina D ili vitamina D da se deponuje u koži i masnom tkivu i da se postupno oslobađa, uz istovremeno dug poluživot cirkulišućeg 25(OH)D u krvi.

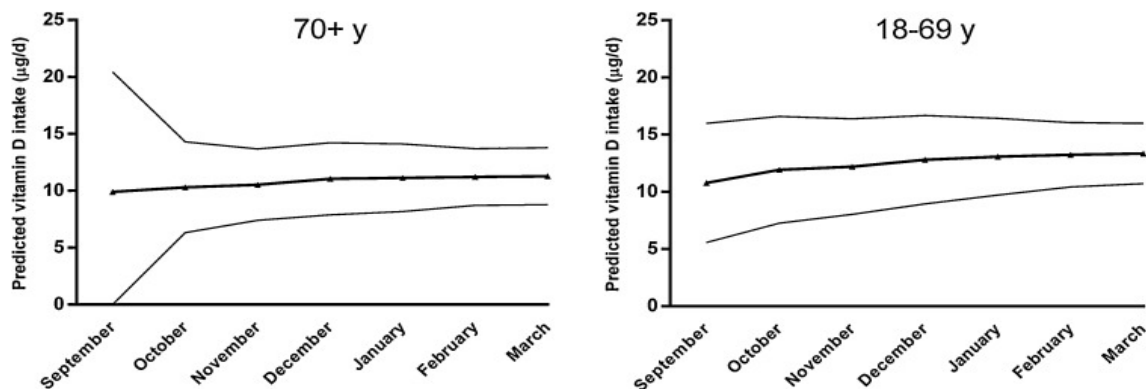
Relativno male međudnevne varijacije u 25(OH)D su verovatno posledica dužeg biološkog poluživota uz postepeno otpuštanje iz kože i masnog tkiva, dok su varijacije u intaktnom PTH bile veće zbog njegovog kraćeg poluživota.

Izostanak jasnih sezonskih varijacija u nivou $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je konzistentno sa nekim prethodnim studijama, ali istovremeno u kontradiktornosti sa nekim drugim studijama koje su izveštavale o jasnim sezonskim varijacijama aktivnog vitamina D (194, 195). Postojanje ili izostanak varijacija u nivou $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bi mogao da bude zavistan od suficijentnosti cirkulišućeg 25(OH)D.

U studiji Schoenmakersa (196) prikazan je matematički model koji predviđa longitudinalnu srednju koncentraciju 25(OH)D na bazi populacionih ispitivanja tokom zime, koji veoma dobro korelira sa vrednostima vitamina D dobijenim u National Diet and Nutrition Survey (NDNS) studiji preseka. Ovaj matematički model se može koristiti za izračunavanje srednje procenjene vrednosti unosa vitamina D koji je potreban da bi se koncentracija populacione srednje vrednosti plazmatskog 25(OH)D držale na potrebnom nivou (197).

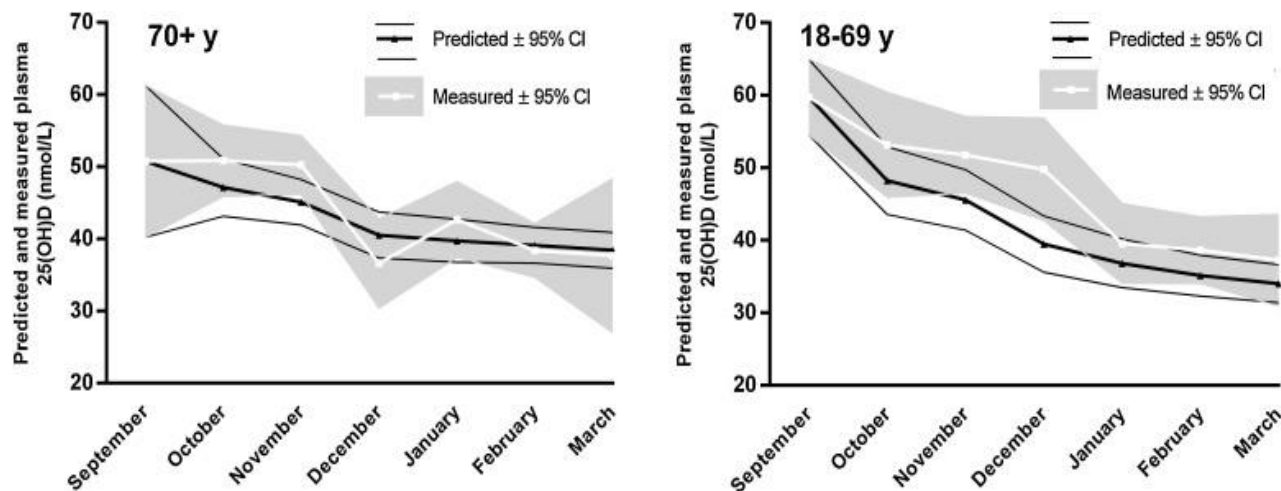
S obzirom na sezonske varijacije u izloženosti UV-B zraka u umerenim klimatskim regijama ($>30^\circ\text{Z}$ i $>30^\circ\text{J}$) (196) nivo vitamina 25(OH)D u krvi u zimskim mesecima je uglavnom izraz posle-letnjeg individualnog statusa, potrošnje 25(OH)D, kao i unosa hranom. U populaciji koja živi u umerenoj klimatskoj regiji postoji postupan pad u nivou vitamina D od kraja avgusta prema zimskim mesecima (180). Uticaj ove cikličnosti je nepotpuno razjašnjen (198), mnogi autori zastupaju stav da pad vrednosti vitamina D u plazmi ispod nivoa suficijencije (50 nmol/L) ili deficijencije (30 nmol/L), koji su definisani od strane The Institute of Medicine (IOM), bi trebalo izbegavati tokom cele godine da bi se izbegao zimski porast vrednosti plazma iPTH i posledična resorpcija kosti (197, 198).

Matematički procenjen unos vitamina D, koji je potreban za održavanje srednje plazmatske vrednosti 25(OH)D od 50 nmol/L tokom zimskih meseci uz pretpostavku minimalne ekspozicije sunčevim zracima, je bio 10–11 $\mu\text{g}/\text{d}$ za starije i 11–13 $\mu\text{g}/\text{d}$ za mlađe osobe i prikazan je na slici 15.



Slika 15. Matematička predikcija (srednji i 97% CI) dnevnog unosa vitamina D hranom koji je potreban da bi srednja plazmatska koncentracija 25(OH)D bila na nivou 50 nmol/L računato na osnovu populacione baze za osobe od 70+ godina ili starije (levo) i 18–69 godina života (desno) u toku zime (196).

Predviđena longitudinalna srednja vrednost koncentracije 25(OH)D u plazmi tokom zimskih meseci, dobijena iz matematičkog modela pokazuje veoma blisko poklapanje sa vrednostima izmerenim u studiji preseka rađenoj na populaciji V. Britanije kao što je prikazano na slici 16.



Slika 16. Izmerene (srednja i 95% CI; bela linija sa sivom pozadinom) plazma 25(OH)D koncentracije u National Diet and Nutrition Survey (NDNS) za osobe od 70 godina i starije (levo) i 18–69 godina (desno) i matematički predviđene (srednje i 95% CI; crna neisprekidana linija) srednja plazmatska koncentracija 25(OH)D u populaciji tokom zime.

Broj merenja plazmatskog 25(OH)D je varirao po mesecima ($n = 63\text{--}205$) (196).

2. CILJEVI RADA I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi rada

1. Utvrditi postojanje nedostatka vitamina D kod bolesnika sa dijabetesom tipa 2 i proteinurijom >150 mg/24 časa uzimajući u obzir sezonske varijacije u nivou ovog vitamina u krvi bolesnika.
2. Analizirati povezanost inflamatornih, nutritivnih i lipidnih parametara, parametara glikoregulacije, bubrežne funkcije i metabolizma kostiju sa sniženjem nivoa vrednosti vitamina D u krvi kod bolesnika eksperimentalne i kontrolne grupe prilikom uključenja u istraživanje, kao i nakon primene holekalciferola u eksperimentalnoj grupi.
3. Ispitati da li se primenom holekalciferola u dozi koja je prilagođena utvrđenom smanjenju nivoa vitamina D može postići efekat smanjenja proteinurije kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom.

2.2. Hipoteze

1. Nedostatak vitamina D je prisutan kod 30-50% ispitanika sa dijabetesnom nefropatijom.
2. Postoji povezanost između nedostatka vitamina D sa analiziranim parametrima. Pozitivna povezanost postoji između nedostatka vitamina D i nivoa albumina u krvi, a negativna povezanost postoji sa: indeksom telesne mase (BMI), lipidnim parametrima, posebno sa nivoom triglicerida, sa hemoglobinom A1c, te sa parametrima bubrežne funkcije, i to sa jačinom glomerulske filtracije kao i sa veličinom proteinurije.
3. Primena holekalciferola u dozi koja je prilagođena izmerenom sniženom nivou vitamina D, dovodi do statistički značajnog smanjenja proteinurije kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom tokom ispitivanog perioda.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Koncept studije

Istraživanje za doktorsku disertaciju je sprovedeno u dve faze.

U prvoj fazi je sprovedeno kao studija preseka u koju su uključivani bolesnici oboleli od insulin nezavisnog DM tipa 2 sa proteinurijom većom od 150 mg/24 časovnom urinom.

Druga faza je sprovedena kao nerandomizovano kontrolisano kliničko ispitivanje koje je trajalo 24 nedelje za svakog uključenog bolesnika i sastojala se u praćenju definisanih parametara. U eksperimentalnoj grupi bolesnika je primenjivan holkaciferol u dozi koja je prilagođena i definisana utvrđenim nedostatkom vitamina D. Nivo donje granice vitamina D je bio utvrđivan na osnovu sezonski definisanih donjih graničnih vrednosti vitamina D koje su date po mesecima u godini kao i po polu ispitanika.

U prvoj fazi istraživanja je izvršeno merenje vrednosti nivoa vitamina D koje je urađeno kod 109 bolesnika, a u drugu eksperimentalnu fazu je uključeno 90 bolesnika koji su bili podeljeni na eksperimentalnu grupu od 45 bolesnika koji su uzimali holkalciferol, i kontrolnu grupu, koja se sastojala takođe od 45 bolesnika, koji su uzimali svoju uobičajenu terapiju.

Istraživanje je sprovedeno kod bolesnika obolelih od DM tip 2 koji su se lečili i kontrolisali u ambulantama za dijabetesne i nefrološke bolesnike u Opštoj Bolnici u Subotici. Obuhvaćeno je stanovništvo šireg područja grada Subotice koja se nalazi na 46° 6' 0" severne geografske širine i 19° 40' 0.01" istočne geografske dužine, sa izraženom panonsko-kontinentalnom klimom (u toku leta kopno se brzo i jako zagreje a zime su duge i veoma hladne; proleće i jesen su kratki i slabo izraženi a prelaz od leta ka zimi je nagao). Studija preseka kojom je utvrđivan nivo vitamina D sa neposrednim uključivanjem bolesnika u drugu fazu longitudinalne eksperimentalne studije je trajala od maja 2018. godine do novembra 2019. godine.

3.2. Ispitanici

3.2.1. Kriterijumi za uključivanje bolesnika u studiju:

- bolesnici starosti 45-75 godina,
- bolesnici koji se leče od DM tipa 2 u trajanju od najmanje 5 godina, koji primenjuju antidijabetesnu dijetu ili oralne hipoglikemike i koji tokom studije imaju zadovoljavajuću glikoregulaciju koja je određena ciljnim vrednostima HbA1c do 7% na osnovu kriterijuma za prevenciju mikrovaskularnih komplikacija bolesti,
- bolesnici sa proteinurijom >150 mg/24 časa i klirensom kreatinina >30 ml/min/1,73 m² (HBI gradus 4 koji je prema NFK DOQI stadijum u kojem s priprema trajni vaskularni pristup) i kod kojih je isključen drugi uzrok proteinurije (vaskulitis, glomerulonefritis, amiloidoza, maligne bolesti, lupus),
- bolesnici koji ne koriste suplementaciju vitaminom D niti njegove analoge najmanje 3 meseca unazad, koji ne koriste dijetetski preparat kalcijuma, ne koriste kortikosteroidnu terapiju i nemaju istoriju druge bubrežne bolesti i aktuelnu infekciju urotrakta),
- bolesnici koji, ukoliko koriste antihipertenzivnu terapiju, primenjuju ACEI/ATB i to u periodu od najmanje 3 meseca pre uključjenja u studiju i imaju zadovoljavajuće regulisanu arterijsku tenziju (vrednosti oko 140/90 mmHg),
- potpisan informisani pristanak za učešće u istraživanju koji je odobren od strane Etičkog Komiteta Opšte bolnice u Subotici i Etičke Komisije Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

3.2.2. Kriterijumi za isključivanje bolesnika iz studije su bili:

- nekooperabilnost (neredovno uzimanje propisane terapije, neodazivanje na zakazane kontrolne preglede,..),
- razvoj bolesti ili stanja tokom istraživanja koje bi moglo uticati na sprovođenje dijagnostičkih postupaka i praćenje bolesnika,
- volja ispitanika da više ne učestvuju u istraživanju.

3.3. Primenjene metode

Ispitanici su u obe grupe praćeni tokom 6 meseci kontrolama vrednosti sedimentacije, kompletne krvne slike, kalcijuma u serumu i 24- časovnom urinu, fosfora, alkalne fosfataze, crp-a, fibrinogena, albumina, proteinurije u 24 časovnom urinu - nakon dva, četiri i šest meseci, a lipidni status (ukupni holesterol, trigliceridi, LDL-holesterol, HDL-holesterol, faktor rizika ateroskleroze - FAKRIZ i indeks aterioskloze – INDART), HbA1c u obe grupe i nivo 25(OH)D3 u istraživačkoj grupi na kraju istraživanja.

25(OH)D3 je određivan iz seruma ispitanika metodom hemiluminiscencije sa akridinijum estrom - CMIA na Imunohemijskom analizatoru Abbott Architect i1000 laboratorije MEDLAB (akreditacioni broj: 03-008, sa prihvaćenim zahtevima propisanim standardom SRPS ISO 15189:2014). Korišćeni su Abbott-ovi testovi. Za vađenje krvi je upotrebljavan sledeći material: vacutaineri i vacutainer igle Becton Dickinson, ref 367955. Nakon uzorkovanja krvi uzorci su slati isti dan u centralnu laboratoriju u Novom Sadu i analizirani su u roku od 6h od vremena uzorkovanja. Rezultati su izdavani isti dan posle 16h.

Praćena je primena antihipertenzivne terapije (mono-, bi- ili trojna terapija) kao i primena RAAS inhibitora (da/ne), primena hipolipemika (statini i fibrati da/ne) i hipoglikemika da/ne.

BMI je izračunat kao odnos između težine tela u kg i visine tela u m².

Za određivanje doze hoplekalciferola korišćena je sledeća skala:

100 IJ (2,5 mcg) /dan povećava nivo vitamin D u krvi za 1 ng/ml(2,5 nmol/L).

200 IJ (5 mcg) dan povećava nivo vitamin D u krvi za 2 ng / ml (5 nmol/L).

400 IJ (10 mcg) dan povećava nivo vitamin D u krvi 4 ng / ml (10 nmol/L).

500 IJ (12,5 mcg) / dan povećava nivo vitamin D u krvi za 5 ng / ml (12,5 nmol/L).

800 IJ (20 mcg) / dan povećava nivo vitamin D u krvi za 8 ng / ml (20 nmol/L).

1000 IJ (25 mcg) / dan povećava nivo vitamin D u krvi za 10 ng / ml (25 nmol L).

2000 IJ (50 mcg) dan povećava nivo vitamin D u krvi za 20 ng / ml (50 nmol/L).

Za procenu statusa vitamina D kod bolesnika su korišćene sledeće sezonski definisane granične vrednosti potrebnog nivoa vitamina D: Tabela 7

Tabela 7. sezonski definisane granične vrednosti potrebnog nivoa vitamina D

minimalni nivo 25(OH)D3	muškarci		žene	
	>50 nmol/L	> 80 nmol/L	>50 nmol/L	> 80nmol/L
Mesec				
Juli	81	131	65	105
Avgust	87	137	69	109
septembar	87	137	71	111
Oktobar	79	129	67	107
Novebar	69	119	62	102
Decembar	59	109	57	97
Januar	52	102	52	92
Februar	50	100	50	90
Mart	50	100	50	90
April	53	103	51	91
Maj	61	111	54	94
Juni	71	121	60	100

Prilagođeno našim klimatskim uslovima prema izvornoj tabeli: Bolland MJ. (181)

Za donju graničnu vrednost potrebnog nivoa vitamina D je određen nivo od 50 nmol/L.

Za optimalne vrednosti vitamina 25(OH)D3 je određena vrednost 90-100 nmol/L.

Primenjivan je preparat Vigantol (MERCK KGaA) 20.000 i.j./ml u vidu oralnih kapi (u jednoj kapi 500 i.j. vitamina D). Broj kapi holekalciferola je određivan na osnovu razlike između vrednosti vitamina D u serumu bolesnika i zadatih optimalnih vrednosti. Broj kapi je kod muškaraca povećavan/smanjivan kod promene zimsko-letnjeg perioda za 2 kapi, a kod žena za 1 kap.

Doza holekalciferola je smanjivana ukoliko je koncentracija kalcijuma u urinu u dve uzastopne kontrole prelazila vrednost od 7,5 mmol/24 časa a u serumu vrednost veću od 2,6 nmol/L.

3.4. Statistička metodologija

U ovom radu su primenjeni metodi deskriptivne statistike koji su korišćeni za analizu kvantitativno izraženih karakteristika bolesnika kao što su demografski parametri, klinički parametri i laboratorijski parametri. Ovim metodama pripadaju tabelarni i grafički prikazi apsolutnih frekvencija originanih podataka, mere centralne tendencije (srednja vrednost, modus, medijana), mere disperzije (interval varijacije, standardna devijacija), kao i metodi bivarijacione analize (unakrsne tabele i dijagrami rasturanja). Metodima deskriptivne statistike su obuhvaćene mesečne varijacije nivoa vitamina D kod posmatranih grupa bolesnika.

Nakon toga je izvršena provera normalnosti pojedinih ključno objašnjavajućih varijabli u radu i dobijeni Šapiro – Wilk testovi pokazuju da pretpostavka o normalnosti distribucije nije narušena.

Korelaciona analiza tj. veza između dve kontinuirane varijable je utvrđena kvantitativnim merama povezanosti (Pearson-ov koeficijent korelacije). Rezultati su protumačeni i objašnjeni.

Razlika između srednjih vrednosti svih posmatranih varijabli po vremenskom razdvajanju primenjene terapije (I-IV) na početku i završetku studije analizirana je primenom t-testa i Z testa.

Uticaj vitamina D na kretanje pojedinih varijabli (smer i jačina veze) utvrđena je primenom prostih krivolinijskih regresionih modela (sa testiranjem modela preko F testa), kao i preko višestrukih regresionih linearnih modela (testiranje preko F testa modela). Dobijeni rezultati su grafički predstavljeni i protumačeni i izvršene su ekstrapolacije višestrukih regresionih modela.

Statistička značajnost sprovedenih testova je rađena na vrednostima za koje je rizik greške manji od 5% ($p < 0,05$).

Statistička analiza podataka je urađena u statističkim softverima SPSS i STATISTICA.

4. REZULTATI

Od ukupno 109 bolesnika koji su skriningom bili uključeni u studiju, njih 19 su imali normalne vrednosti vitamina D3. Ostalih 90 bolesnika je bilo uključeno u eksperimentalni deo studije koji su bili podeljeni na po 45 bolesnika u studijskoj i kontrolnoj grupi. Bolesnici u studijskoj grupi su primali soluciju Vigantol u broju kapi koje su bile određene na osnovu razlike između izmerene vrednosti vitamina D3 i planirane ciljne vrednosti od 90nmol/L za žene i 100 nmol/L za muškarce. Istraživanje je u studijskoj grupi u potpunosti završilo 43 bolesnika, jedna bolesnica je odustala odmah nakon prve kontrole i 1 bolesnik je egzistirao nakon III kontrole zbog sepse koja je nastalna kao komplikacija gonartritisa. U kontrolnoj grupi je isključen iz istraživanja jedan bolesnik nakon II kontrole zbog odlaska u višu ustanovu radi dalje dijagnostike i lečenja kardiovaskularnog oboljenja.

Kliničke i biohemijske karakteristike bolesnika u studijskoj i kontrolnoj grupi su dati u Tabeli 8a i 8b.

Tabela 8a. Kliničke i biohemijske karakteristike tokom praćenja bolesnika u studijskoj grupi

Varijable/kontrola	I	II	III	IV
SE	18,22±15,46	17,07±13,75	15,53±13,06	15,12±13,95
CRP	6,45±7,95	5,72±8,21	4,95±6,05	4,17±5,22
fibrinogen g/L	4,0±.91	3,99±.96	3,99±.98	3,83 ±.9
albumin g/l	43,99±4,11	45,67±2,71	44,88±2,8	45,56±2,49
Kalcijum (s) mmol/l	2,42±.135	2,49±.101	2,46±.1106	2,49±.107
Fosfor (s) mmol/l	1,098±.164	1,099±.209	1,132.192	1,137±.2017
Alkalna fosfataza U/L	73,48±.43.29	69,74±31,14	66,91±30,64	62,81±18,38
HbA1c mmol/mol	48,44±5,2	-	-	48,83±5,5
Holesterol mmol/l	5,37±1,19	-	-	5,39±1,15
Trigliceridi mmol/l	2,13±1,4	-	-	1,8±0,14
HDL mmol/l	1,15±,28	-	-	1,3±,54
LDL mmol/l	3,45±1	-	-	3,45±,99
FAKRIZ	4,8±1,18	-	-	4,6±1,3
INDART	3,01±,88	-	-	2,89±.9
JGF ml/min	103,88±35,49	102,5±39,77	97,8±35,9	96,39±34,83
Proteini 24h-urin g/du	0,43±,91	0,382±,91	0,362±,72	0,349±,7
Kalcijum (U) mmol/24h	3,39±1,94	4,45±2,77	4,18±2,78	4,02±2,27
Vitamin D3 nmol/L	43,2±15,08	-	-	90,17±23
broj kapi holeciferola	4,74±1,44	5,17±1,28	5,32±1,3	5,26±1,27

Napomene: CRP-C reaktivni protein, HbA1c-hemoglobin A1c, HDL-high density lipoprotein-olesterol, LDL-low density lipoprotein-olesterol, FAKRIZ - faktor rizika (non HDL tj. ukupni holesterol – HDL holesterol), INDART- index ateroskleroze (LDL/HDL holesterol), JGF - jačina glomerulske filtracije

Tabela 8b. Kliničke i biohemijske karakteristike tokom praćenja bolesnika u kontrolnoj grupi

Varijable/kontrola	I	II	III	IV
SE	18,22±15,46	17,07±13,75	13,84±10,56	14,19±9,96
CRP	3,6±4,37	3,25±2,79	3,55±3,2	3,63±4,56
fibrinogen g/L	3,68 ±,77	4,01±,88	3,94±1,01	3,87±1,008
albumin g/l	43,99±4,11	45,67±2,71	44,88±2,8	45,56±2,49
Kalcijum (s) mmol/l	2,42± .135	2,49±.101	2,4±,117	2,38±,298
Fosfor (s) mmol/l	1,04±,21	1,05±,16	1,132.192	1,137±.2017
Alkalna fosfataza U/L	70,69±21,57	70,18±21,35	68,81±18,9	69,7±20,95
HbA1c mmol/mol	47,51±5,5	-	-	47,51±5,5
Holesterol mmol/l	5,52±1,07	-	-	5,83±,08
Trigliceridi mmol/l	1,8±0,8	-	-	2,16±1,2
HDL mmol/l	1,2±0,28	-	-	1,18±0,28
LDL mmol/l	3,49±,9	-	-	3,77±,3
FAKRIZ	4,5±1,07	-	-	4,8±1,24
INDART	2,81±,86	-	-	3,05±,98
JGF ml/min	106,35±45,7	102,159±37,95	100,93±39,43	99,67±38,63
Proteini 24h-urin g/du	0,72±1,62	0,78±1,87	0,88±2,25	0,809±1,71
Kalcijum (U) mmol/24	5,0±3,18	5,0±3,18	5,17±3,12	5,0±3,07
Vitamin D3 nmol/L	47,02±16,06	-	-	-

Napomene: CRP-C reaktivni protein, HbA1c-hemoglobin A1c, HDL-high density lipoprotein-holesterol, LDL-low density lipoprotein-holesterol, FAKRIZ - faktor rizika (non HDL tj. ukupni holesterol – HDL holesterol), INDART- index ateroskleroze (LDL/HDL holesterol), JGF - jačina glomerulske filtracije

4.1. Deskriptivna statistika

4.1.1. Vrednosti vitamina D3 pri uključenju i tokom praćenja

Od ukupno 109 bolesnika koji su zadovoljavali kriterijume za uključenje u studiju, njih 19 su imali normalne vrednosti vitamina D3. Dakle učestalost bolesnika sa nedostatkom vitamina D3 je u ispitivanom uzorku bila 82,56%, dok je normalne vrednosti vitamina D3 imalo 17,43% ispitanika, od toga je bilo 10 (52,63%) muškaraca i 9 (47,36%) žena. Distribucija vrednosti vitamina D3 kod svih ispitivanih bolesnika, kako kod onih sa normalnim, tako i kod onih sa sniženim vrednostima vitamina D3, ukupno i prema polu, je prikazana u Tabeli 9.

Tabela 9. Prosečne vrednosti vitamina D3 kod svih ispitanika sa sniženim ili normalnim vrednosti vitamina D3.

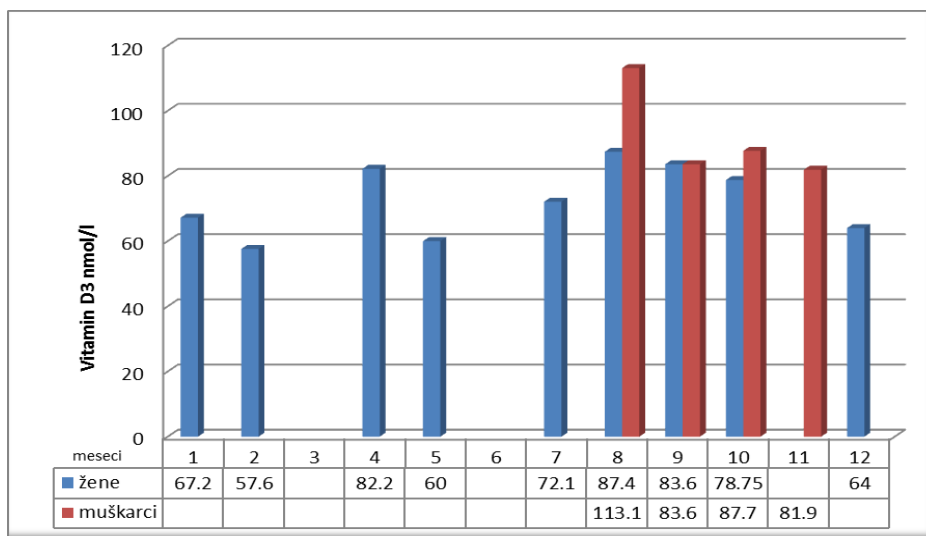
svi ispitanici														
	snižene vrednosti Vitamina D3							Normalne vrednosti Vitamina D3						
	svi ispitanici SG+ KG			muškarci		žene		svi ispitanici KG			muškarci		žene	
mesec	vitamin D3	Br bolesnika	vitamin D3	donja gran. vred./mesec	Br bolesnika	vitamin D3	donja gran. vred./mesec	Br bolesnika	vitamin D3	Br bolesnika	vitamin D3	Br bolesnik	vitamin D3	Br bolesnik
januar	32.88±10.82	7	36.87±11.2	52	2	27.56±9.4	52	2	67.2	1			67.2	1
februar	31.18±6.17	8	31.92±6.56	50	3	29.96±6.6	50	1	57.6	1			57.6	1
mart	31.53±12.6	6	28.7±18.9	50	1	34.36±4.1	50	2						
april	38.95±6.75	6	41.13±8	53	1	36.76±5.9	51	2	82.2	1			82.2	1
maj	46.28±13.81	6	53.77±4.52	61	1	37.9±15.5	54	2	60	1			60	1
juni	38.05±11.65	6	52.1	71	1	35.24±10.5	60	2						
juli	53.7±15.1	5	53.42±17.5	81	2	55.1	65	1	72.1	1			72.1	1
avgust	44.97±19.14	9	53.83±19.35	87	3	33.9±13.5	69	2	88.25±1.2	2	88.25±1.2	2		
septembar	57.35±16.14	10	53.82±20.24	87	2	60.88±12.5	71	3	93.43±20.11	3	113.1	2	83.6±15.13	1
oktobar	61.29±13.94	10	57.7±17.54	79	1	66.67±2.4	67	3	85.2±6.7	5	89.53±3.17	2	78.75±4.88	3
novembar	46.128±8.9	8	52.46±6	69	1	43.85±9.13	62	2	81.0±3.2	3	81.0±3.2	3		
decembar	46.94±9.31	9	51.27±7.6	59	2	43.48±10.95	57	3	64	1	64	1		
	45.1±15.6	90	47.75±15.89		20	42.57±14.98		25	80.47±13.36	19	86.52±12.38	10	73.75±11.53	9

Prikaz prosečnih vrednost vitamina D3 kod bolesnika u studijskoj i kontrolnoj grupi ukupno i prema polu, prikazana je u Tabeli 10.

Tabela 10. Prikaz prosečnih vrednosti vitamina D3 kod ispitanika u studijskoj i kontrolnoj grupi

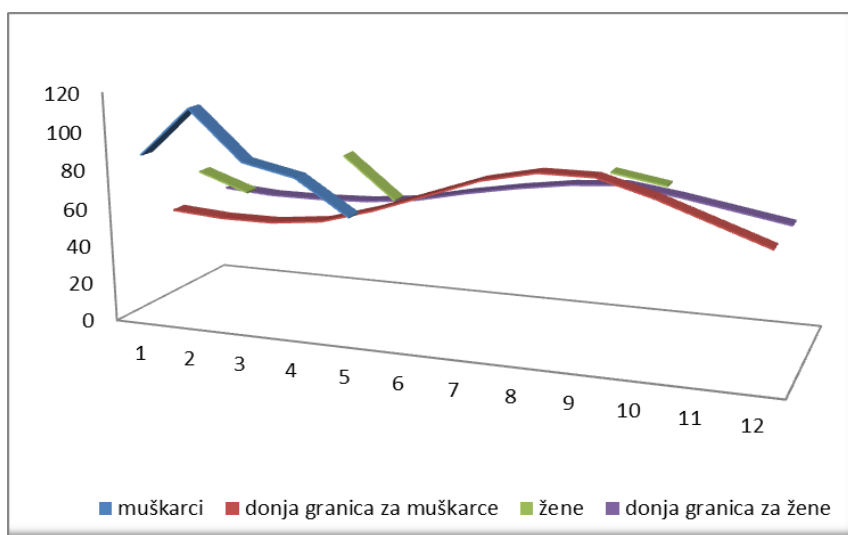
svi ispitanici sa sniženim vrednostima vitamina D3														
	studijska grupa						Kontrolna grupa							
	svi ispitanici SG			muškarci		žene		svi ispitanici KG			muškarci		žene	
mesec	vitamin D3	Br bolesnika	vitamin D3	Br bolesnik	vitamin D3	Br bolesnika	vitamin D3	Br bolesnika	vitamin D3	Br bolesnika	vitamin D3	Br bolesnik	vitamin D3	Br bolesnik
januar	33.625±12.81	4	39.15±13.9	2	28.1±13.29	2	31.9±10.14	3	34.6±12.7	2			26.5	1
februar	34.3±3.68	4	33.93±4.36	3	35.8	1	27.975±6.9	4	28.9±10.18	2			27.05±6.01	2
mart	27.46±16.01	3	9	1	36.7±1.31	2	35.6±9.61	3	38.55±11.5	2			29.7	1
april	36.56±6.12	3	33.7	1	38±7.91	2	41.33±7.72	3	44.85±6.7	2			34.3	1
maj	42.53±17.69	3	52.4	1	37.6±21.9	2	50.03±11.03	3	55.8±6.6	2			38.5	1
juni	38.2±13.01	3	52.1	1	31.25±7	2	37.9±13.03	3					37.9±13.03	3
juli	46.25±8.86	3	40.9±5.02	2	55.1	1	65.4±17.67	2	65.4±17.67	2				
avgust	51.39±22.65	5	61.33±20.8	3	36.5±21.07	2	36.95±11.76	4	42.6±14.4	2			31.3±8.9	2
septembar	47.74±17.18	5	35.95±18.73	2	55.6±13.5	3	66.96±7.77	5	65.73±10.5	3			68.8±2.4	2
oktobar	63.529±3.99	4	57.6	1	65.5±7	3	59.8±18.26	6	54.6±20.68	5			71.1±1.27	1
novembar	39.76±5.31	3	45.6	1	36.85±2.33	2	49.9±8.9	5	55.9±8	2			40.92±7	3
decembar	46.1±12.32	5	52.3±4.1	2	41.96±15.1	3	48±7.6	4	50.25±12.3	2			45.75±0.49	2
ukupno	43.1±15.08	45	43.69±15.07	20	42.8±14.87	25	47.02±16.06	45	50.13±15.4	26			42.76±16.4	19

Prosečne normalne vrednosti vitamina D3 tokom praćenja po mesecima i po polu kod ispitivanih bolesnika su prikazane na grafiku 1.



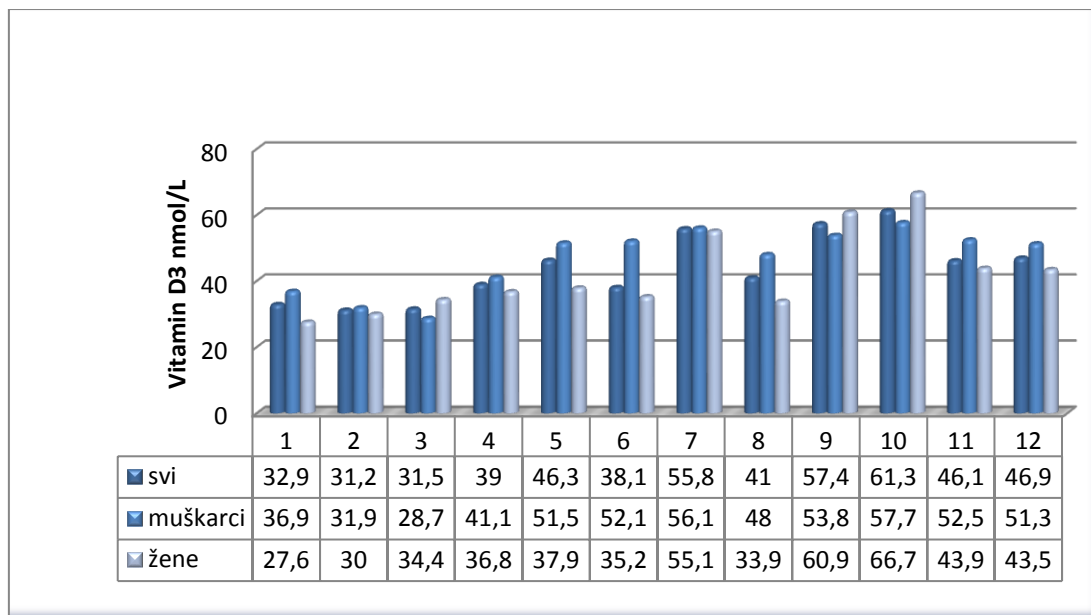
Graf. 1. Prikaz prosečnih normalnih vrednosti vitamin D3 kod bolesnika sa DM tip 2/DN

Prikaz prosečnih normalnih vrednosti vitamina D3 po mesecima praćenja u odnosu na donje granične vrednosti za žene i muškarce je dat na grafiku 2.



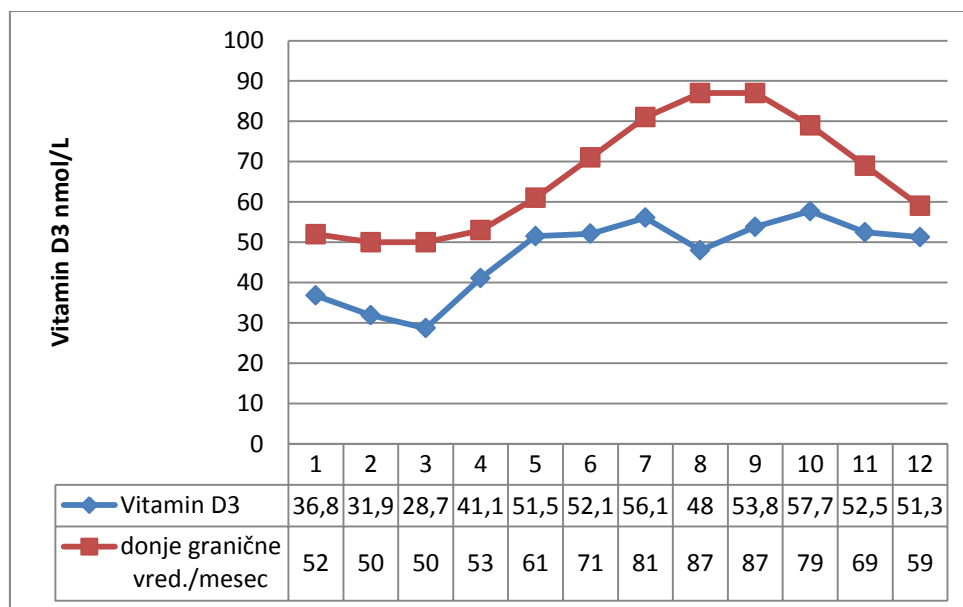
Graf. 2. Prikaz prosečnih normalnih vrednosti vitamina D3, u odnosu na donju granicu za žene i muškarce

Prosečne vrednosti vitamina D3 po mesecima, ukupno i po polu, kod bolesnika koji su uključeni u studijsku i kontrolnu grupu je prikazan na grafikonu 3.

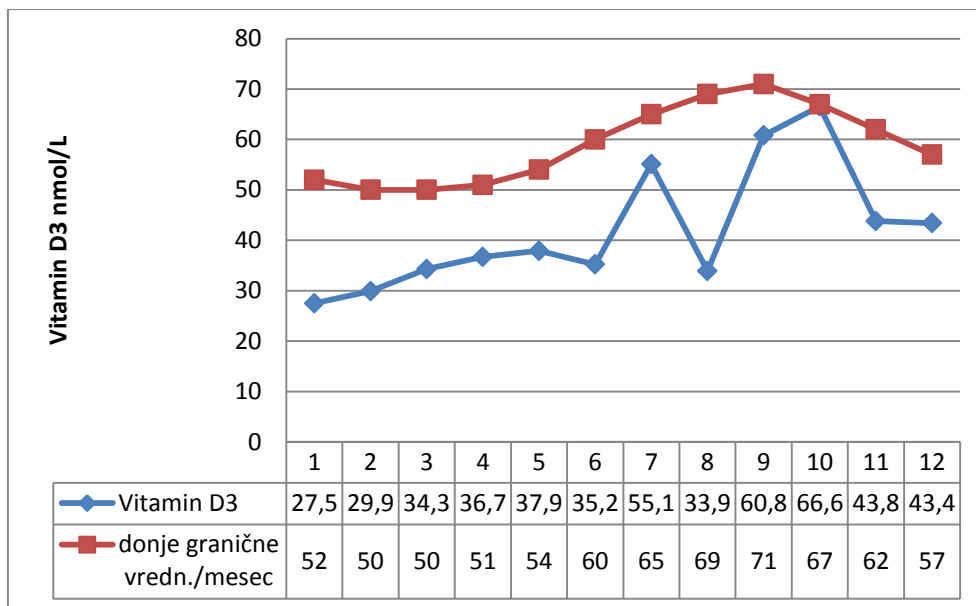


Graf. 3. Prosečne vrednosti vitamina D3 po mesecima tokom godine kod ispitanika u studijskoj i kontrolnoj grupi

Prosečne vrednosti vitamina D3 po mesecima, kod svih ispitanika u studijskoj i kontrolnoj grupi, u odnosu na pol su date na grafikonima 4 i 5.

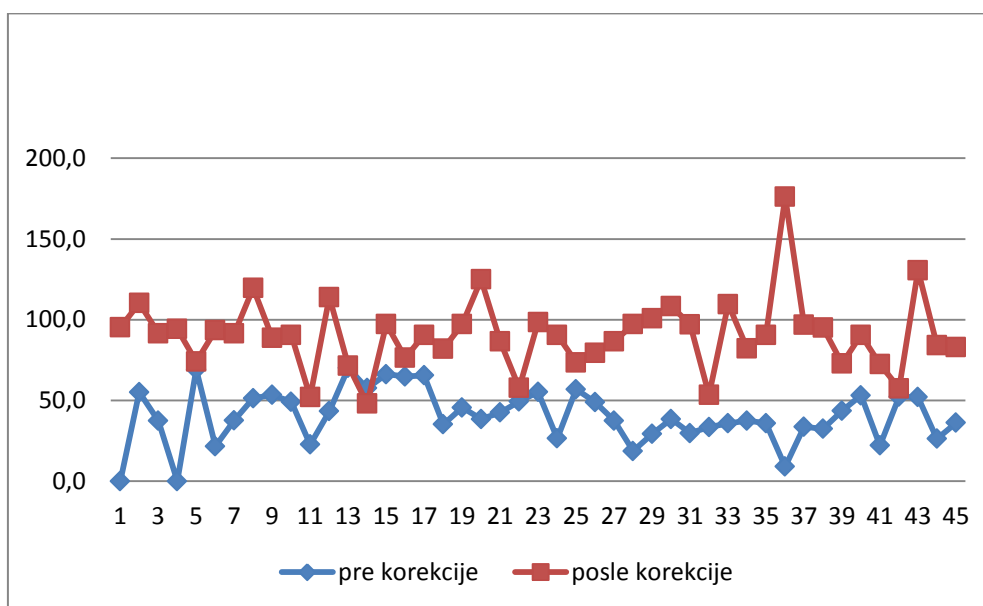


Graf. 4. Prosečne vrednosti deficita vitamina D3 tokom godine kod muškaraca



Graf. 5. Prosečne vrednosti deficita vitamina D3 tokom godine kod žena

Pojedinačne vrednosti vitamina D3 u studijskoj grupi prilikom uključenja i na kraju istraživanja su date na grafikonu 6.



$p=0.002 < 0,05$

Graf. 6. Prikaz pojedinačnih vrednosti vitamina D3 u studijskoj grupi na početku i na kraju istraživanja

Vrednosti vitamina D3 koje su izmerene kod bolesnika u studijskoj grupi na početku ($42,8 \pm 15,22$) i na kraju ($90,59 \pm 23,74$) istraživanja pokazuju statistički značajnu razliku ($p=0,002$).

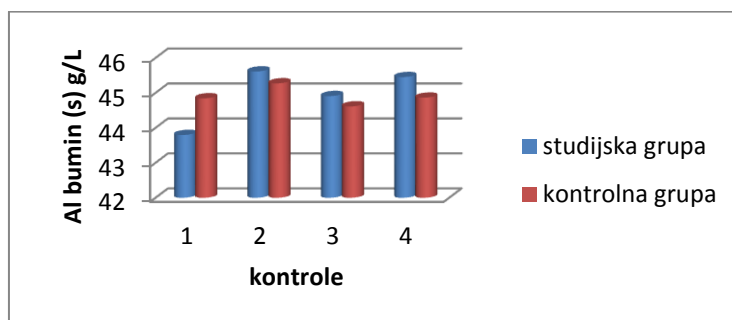
Prilikom uključanja u studiju nije nađena statistički značajna razlika u vrednostima vitamina D3 ($p=0,919$) kod muškaraca ($43,14 \pm 15,11$ nmol/L) i žena ($42,78 \pm 15,37$ nmol/L). Na kraju istraživanja je prosečna vrednost vitamina D3 kod muškaraca bila $91,26 \pm 29,96$ a kod žena $89,97 \pm 13,21$ nmol/L ($p=0,983$).

Postoji statistički značajna razlika ($p=0,038$) između odstupanja u nivou vitamina D3 kod bolesnika prilikom uključanja u studiju do donje granične normalne vrednosti između letnjeg i zimskog perioda u studijskoj i kontrolnoj grupi zajedno, kao i u studijskoj grupi ($p=0,03$) pri čemu je sniženje do normalnih vrednosti ovog vitamina veće u letnjem periodu. Letnji period je definisan kao period od aprila do kraja septembra a zimski period od novembra do kraja marta. U kontrolnoj grupi takođe postoji razlika izmerenih vrednosti vitamina D3 i donjih graničnih normalnih vrednosti za ovaj vitamin, koja je izraženija leti ali nije statistički značajna ($p=0,449$). Takođe postoji razlika i po polu koja nije statistički značajna ($p=0,21$) i koja je izraženija u toku letnjeg perioda i to kod muškaraca.

4.1.2. Metabolički pokazatelji

Albumin

Vrednosti albuminemije u studijskoj grupi pokazuju statistički značajnu razliku između I i II $t=-3,14$ $p=0,003$ i I i IV kontrole $t=-2,430$ $p=0,020$, dok u kontrolnoj grupi nema statistički značajne razlike između kontrola. Grafik 7.



Graf. 7. Prosečne vrednosti albumina u serumu tokom praćenja u obe ispitivane grupe

4.1.3. Parametar glikoregulacije

U obe praćene grupe je na kraju istraživanja registrovan porast vrednosti **HbA1c** koji je izraženiji u kontrolnoj grupi $t=-1,459$ $p=0,152$ nego u studijskoj grupi $t=-0,466$ $p=0,64$.

4.1.4. Lipidni parametri

U odnosu na ukupni **holesterol** je utvrđen porast vrednosti u obe praćene grupe, koji je veći u kontrolnoj grupi $t=-1,783$ $p=0,08$ nego u studijskoj grupi $t=-0,212$ $p=0,83$.

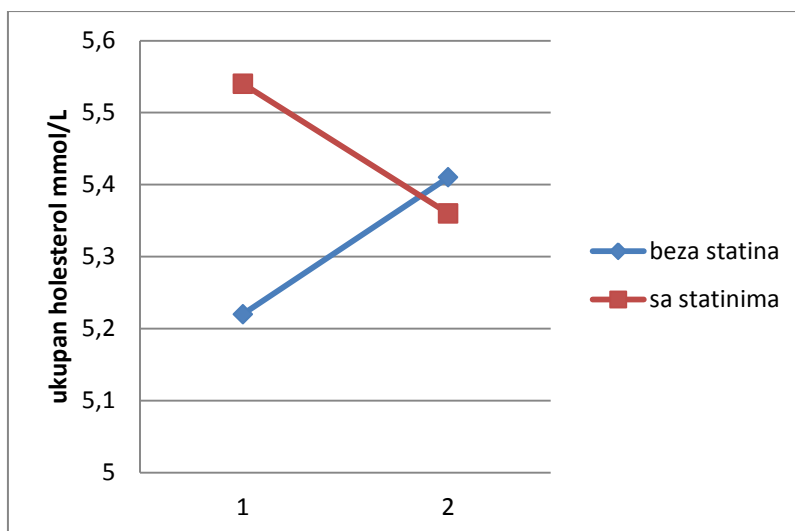
Nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima **triglicerida**, u studijskoj grupi je došlo do smanjenja njihove vrednosti $t=1,81$ $p=0,077$, dok je u kontrolnoj grupi registrovan porast njihove vrednosti $t=-2,11$ $p=0,04$.

U studijskoj grupi je registrovan porast vrednosti **HDL-holesterola** koji je na granici statističke značajnosti $t=-1,95$ $p=0,057$, dok se u kontrolnoj grupi registruje pad vrednosti HDL-holesterola $t=-1,78$ $p=0,083$.

U studijskoj grupi nije zabeležena promena vrednosti **LDL-holesterola** $t=0,33$ $p=0,74$ dok je u kontrolnoj grupi došlo do porasta njegove vrednosti $t=-1,78$ $p=0,083$. U studijskoj grupi je registrovan pad vrednosti Faktora Rizika – **FAKRIZ-a** (non HDL tj. ukupni holesterol / HDL holesterol) $t=1,1$ $p=0,275$ dok je u kontrolnoj grupi došlo do njegovog porasta koji je na granici statističke značajnosti $t=2,025$ $p=0,05$.

Utvrđena je veća razlika između vrednosti **INDART-a** (LDL-holesterol/HDL holesterol) u kontrolnoj grupi $t=1,641$ $p=0,109$ nego u studijskoj grupi $t=0,893$ $p=0,377$ pri čemu je u kontrolnoj grupi registrovan porast vrednosti INDART-a a u studijskoj grupi je utvrđeno njegovo smanjenje.

U studijskoj grupi bolesnika koji su bili podeljeni na podgrupe bolesnika koji su uzimali preparate statina i one koji nisu, registrovana je veća razlika u vrednosti ukupnog holesterola u grupi bolesnika koji nisu uzimali statine $t=0,970$ $p=0,34$ nego u grupi bolesnika koji su ih koristili $t=0,629$ $p=0,437$ s tim što je u grupi bolesnika bez statina došlo do porasta vrednosti holesterola a u grupi sa statinima do njegovog smanjenja. Grafik 8a.

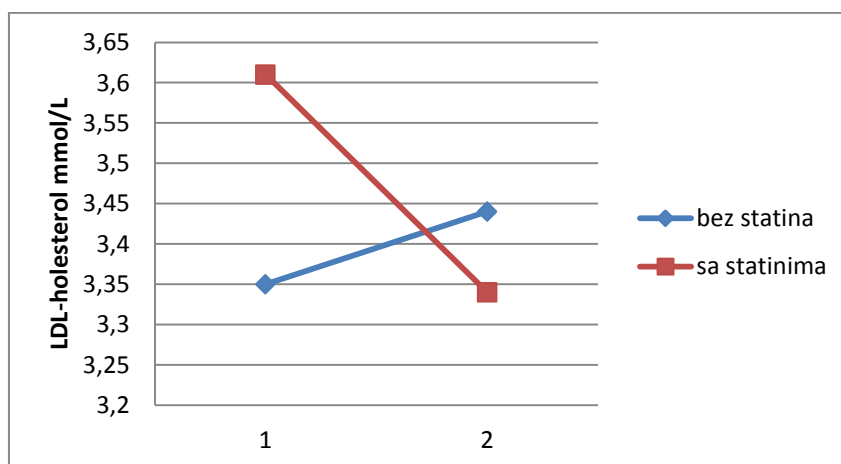


Graf. 8a. Vrednost ukupnog holesterola sa i bez primene statina u studijskoj grupi

U kontrolnoj grupi bolesnika podgrupe bolesnika koji su uzimali preparate statina i one koji nisu, registrovana je veća razlika u vrednosti ukupnog holesterola u grupi bolesnika koji nisu uzimali statine $t=-1,673$ $p=0,106$ nego u grupi bolesnika koji su ih koristili $t=-0,797$ $p=0,437$ s tim što je u obe grupe došlo do porasta vrednosti holesterola u serumu tj. veći porast holesterola je bio u podgrupi bolesnika koji nisu uzimali statinske preparate.

U studijskoj grupi bolesnika koji su bili podeljeni na podgrupe bolesnika koji su uzimali preparate statina i one koji nisu, registrovana je veća razlika u vrednosti LDL-holesterola u grupi bolesnika koji su uzimali statine $t=1,073$ $p=0,301$ nego grupi bolesnika koji su ih nisu koristili $t=-0,565$ $p=0,577$ s tim što je u grupi bolesnika bez statina došlo do porasta vrednosti LDL-holesterola dok je u grupi sa statinima došlo do njegovog smanjenja.

Graf. 8b.

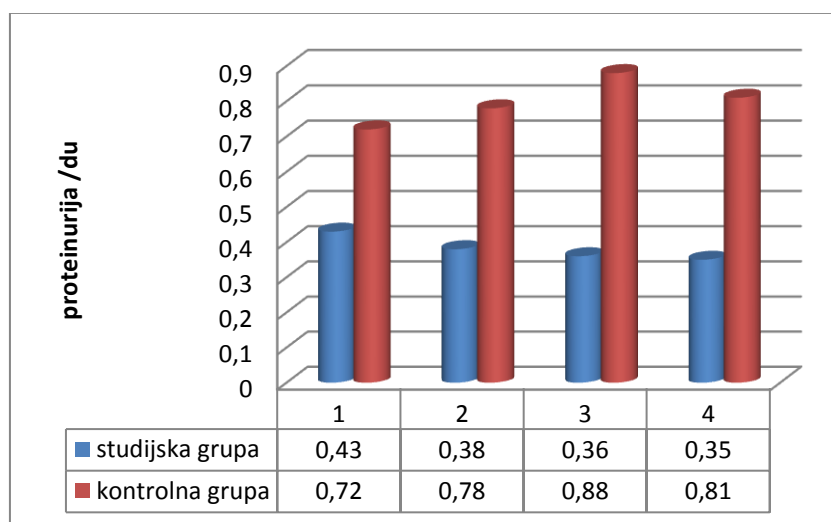


Graf. 8b. Vrednost LDL-holesterola u studijskoj grupi sa i bez primene statina

U kontrolnoj grupi bolesnika koji su bili podeljeni na podgrupe bolesnika koji su uzimali preparate statina i one koji nisu, registrovana je veća razlika u vrednosti LDL-holesterola u grupi bolesnika koji su uzimali statine $t=-0,723$ $p=0,483$ nego u grupi bolesnika koji su ih nisu koristili $t=-1,803$ $p=0,083$ s tim što je u obe grupe bolesnika došlo do porasta vrednosti LDL-holesterola koji je bio veći u grupi bolesnika bez primene preparata statina.

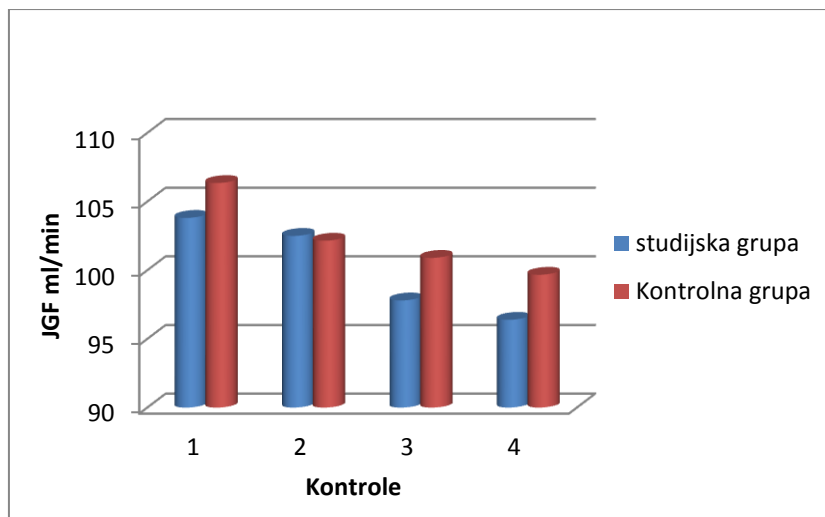
4.1.5. Parametri bubrežne funkcije

U studijskoj grupi bolesnika je registrovano kontinuirano smanjenje 24h proteinurije i utvrđena je statistički značajna razlika između I i IV kontrole $t=2,670$ $p=0,011$ tj. između vrednosti na početku i na kraju istraživanja. U kontrolnoj grupi se registruje porast proteinurije bez statističke značajnosti između kontrola. Grafik 9.



Graf. 9. Prosečne vrednosti proteina u 24h urinu u obe ispitivane grupe

Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima jačine glomerulske filtracije-JGF između kontrola. U obe grupe je utvrđeno blago sniženje vrednosti JGF tokom istraživanja koje nije pokazalo statistički značajnu razliku između kontrola, mada je razlika vrednosti JGF na početku i u odnosu na završetak istraživanja bila veća u studijskoj grupi ($t=1,81$ $p=0,077$) nego u kontrolnoj grupi ($t=1,641$ $p=0,108$). Grafik 10.

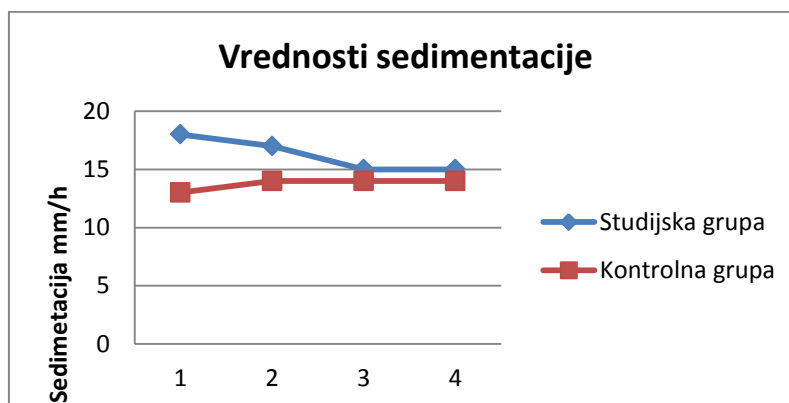


Graf. 10. Prosečne vrednosti JGF u obe ispitivane grupe

4.1.6. Parametri inflamacije

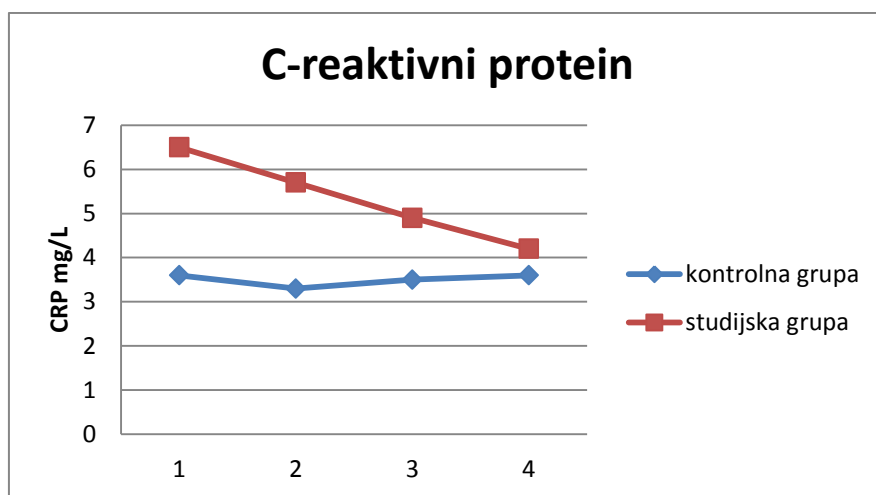
Nije postojala statistički značajna razlika u vrednostima **sedimentacije** – SE u obe grupe tokom praćenja. Najveća razlika je registrovana u studijskoj grupi između I i III kontrole $t=1,915$ $p=0,062$, dok je u kontrolnoj grupi najveća razlika zabeležena između I i IV kontrole $t=-0,802$ $p=0,427$. U studijskoj grupi bolesnika je registrovan blagi i kontstantni pad u vrednostima SE dok je u kontrolnoj grupi inicijalno došlo do blagog porasta vrednosti SE.

Utvrđen je blagi pad vrednosti sedimentacije u studijskoj grupi sa najvećom razlikom između I i III kontrole $t=1,915$ $p=0,062$ i I i IV kontrole $t=1,8$ $p=0,078$ koje nisu bile statistički značajne, dok je u kontrolnoj grupi registrovan blagi porast sedimentacije u kojoj je nađena najveća razlika između I i IV kontrole $t=-0,802$ $p=0,427$. Grafik 11.



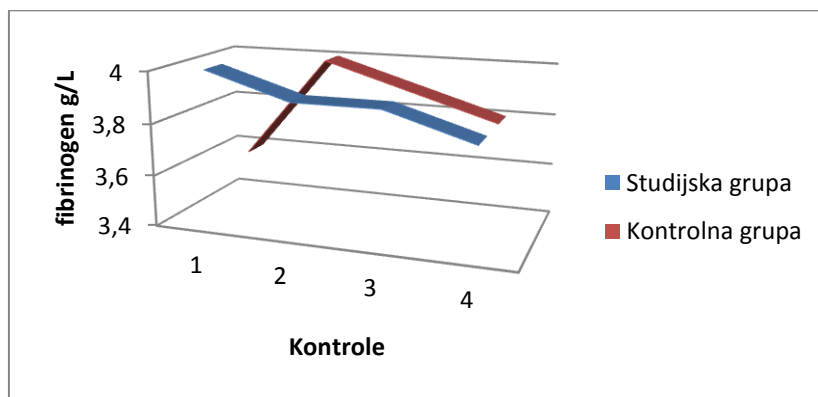
Graf. 11. Prosečne vrednosti sedimentacije u obe ispitivane grupe

Tokom praćenja nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima C-reaktivnog proteina – CRP-a u obe grupe bolesnika. Najveća razlika je registrovana u studijskoj grupi između I i IV kontrole $t=1,663$ $p=0,104$, dok je u kontrolnoj grupi najveća razlika zabeležena između I i II kontrole $t=-0,893$ $p=0,376>0,05$. U studijskoj grupi je zabeležen kontinuirani pad u vrednostima CRP-a dok je u kontrolnoj grupi inicijalno došlo do blagog porasta vrednosti CRP-a. Grafik 12.



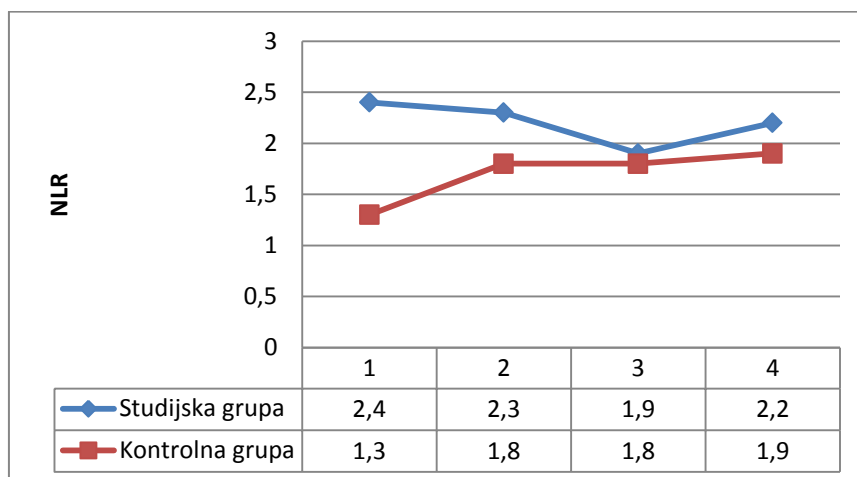
Graf. 12. Prosečne vrednosti C-reaktivnog proteina u obe ispitivane grupe

Registrovana je statistički značajna razlika u vrednostima fibrinogena samo u kontrolnoj grupi između I i II kontrole $t=-3,074$ $p=0,004$ koja je nastala zbog porasta vrednosti fibrinogena, dok je u studijskoj grupi nađen kontinuirani i blagi pad u njegovih vrednosti. Grafik 13.



Graf. 13. Vrednosti fibrinogena u obe ispitivane grupe

Pod uticajem D vitamina je kod svih ispitanika u studijskoj grupi registrovano kontinuirano pozitivno delovanje na neutrofilno-limfocitni odnos (Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio – NLR) kao pokazatelja upale, koje je ispoljilo statistički značajnu razliku između I i II kontrole i I i III kontrole tj. ($p=0,047$ i $p=0,011$). Grafik 14. Tabela 11.



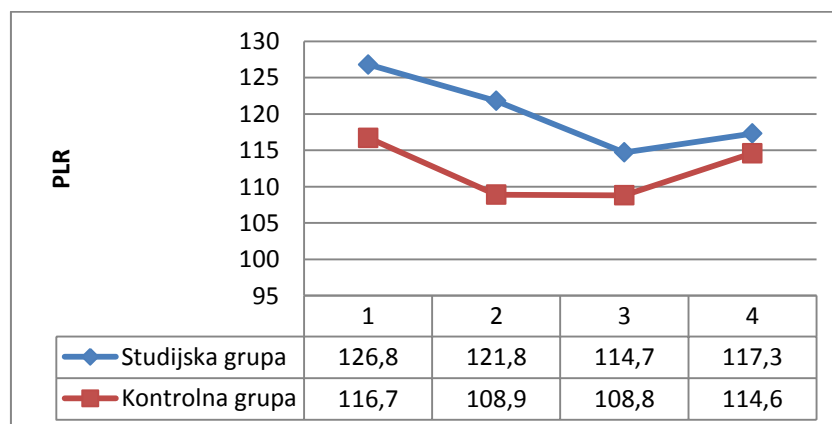
Graf. 14. Neutrofilno-limfocitni odnos (neutrophil-to lymphocyte ratio-NLR) u obe ispitivane grupe

U odnosu na trombocitno-limfocitni odnos (Platelet-to Lymphocyte Ratio-PLR) je registrovan efekat delovanja vitamina D3 koji nije pokazao statističku značajnost. Grafik 15. Tabela 11.

Tabela 11. Vrednosti NLR i PLR tokom praćenja

	NLR I	NLR II	NLR III		PLR I	PLR II	PLR III
NLR 0	0,391	0,011*	0,209	PLR 0	0,697	0,541	0,301
NLR I		0,047*	0,358	PLR I		0,155	0,288
NLR II			0,093	PLR II			0,388

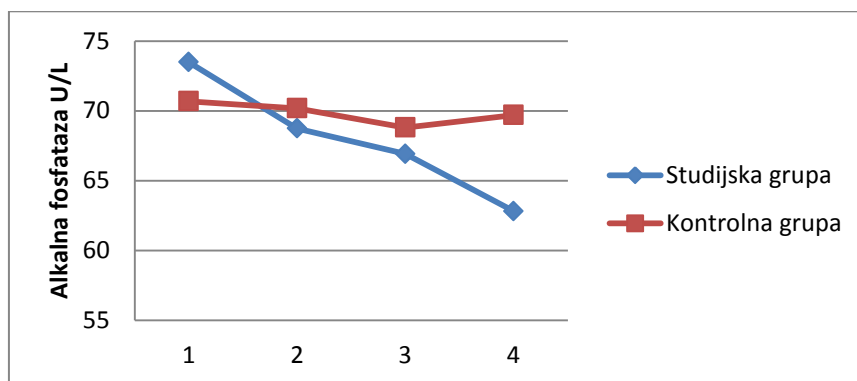
$p < 0,05$ NLR-Nutrophyl-to-Lymohocyte Ratio PLR-Platelet to-Lymohocyte Ratio



Graf. 15. Trombocitno-limfocitni odnos (Platelet-to-lymphocyte Racio –PLR) u obe ispitivane grupe

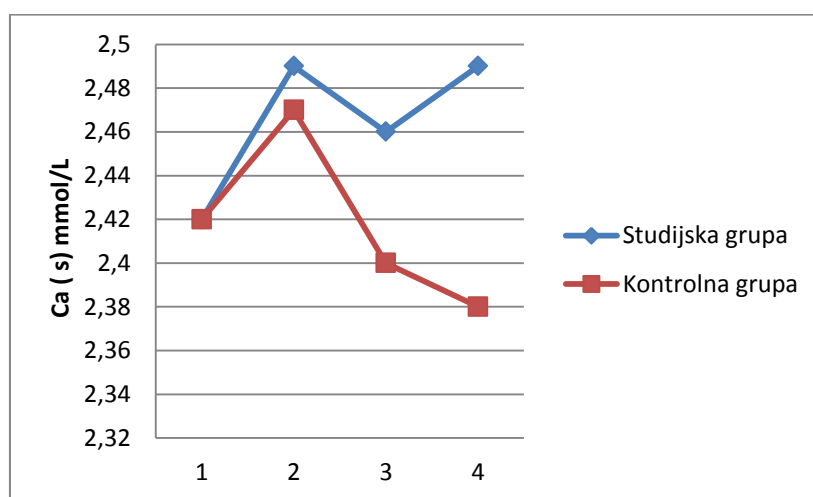
4.1.7. Parametri metabolizma kostiju

Vrednosti **alkalne fosfataze** u studijskoj grupi su pokazale statistički značajnu razliku između I i III kontrole $t=2,091$ $p=0,043$ i između I i IV kontrole $t=2,389$ $p=0,022$, dok u kontrolnoj grupi nema statistički značajne razlike. Grafik 16.



Graf. 16. Prosečne vrednosti alkalne fosfataze u obe ispitivane grupe

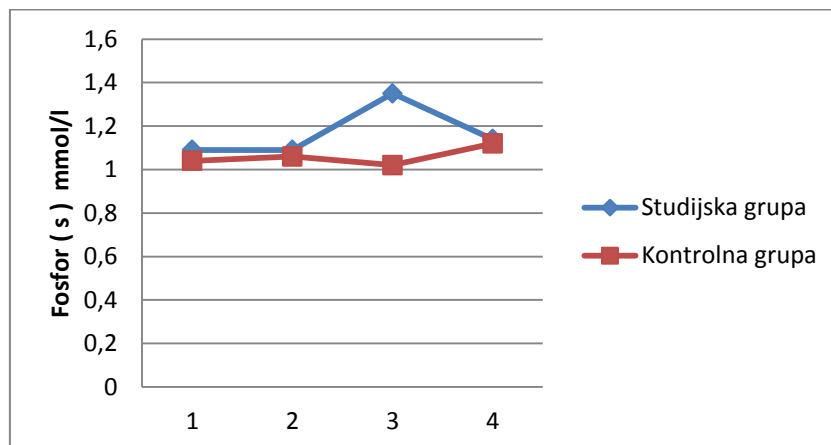
Registrovana je statistički značajna razlika u vrednosti **klacijuma u serumu** u studijskoj grupi između I i II kontrole $t=-3,894$ $p=0,00<0,001$ kao i između I i III kontrole $t=-2,027$ $p=0,049$ i I i IV kontrole $t=-2,624$ $p=0,012$ dok je između II i III kontrole vrednost razlike na granici statističke značajnosti $t=1,964$ $p=0,056$. U kontrolnoj grupi nema statistički značajnih razlika u vrednostima kalcijuma u serumu između kontrola. Grafik 17.



Graf. 17. Prosečne vrednosti kalcijuma u serumu tokom praćenja u obe ispitivane grupe

Vrednost **fosfata u serumu** tokom ispitivanja u studijskoj grupi nije pokazala statistički značajne razlike između kontrola dok je u kontrolnoj grupi registrovana statistički

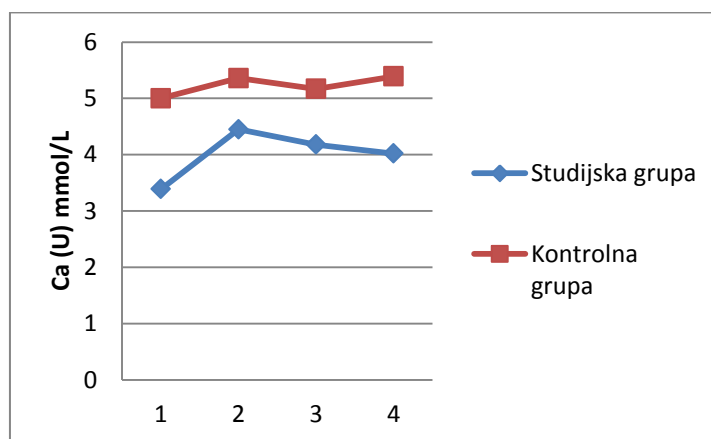
značajna razlika između I i IV kontrole $t=-2,247$ $p=0,03$, II i IV kontrole $t=-2,154$ $p=0,037$ i III i IV kontrole $t=-4,706$ $p=0,001$. Grafik 18.



Graf. 18. Prosečne vrednosti fosfata u serumu tokom praćenja u obe ispitivane grupe

Vrednost **kalcijuma u mokraći** u inicijalnoj fazi studije u studijskoj grupi je rastao te je nađena statistički značajna razlika koja je bila najizraženija između I i II kontrole $t=3,387$ $p=0,002$ kao i između I i III kontrole kada je porast vrednosti kalcijuma bio manje izražen $t=2,664$ $p=0,011$, nakon čega su vrednosti kalcijuma bile u daljem blagom porastu međutim, bez statistički značajne razlike. Prosečne vrednosti kalcijuma u mokraći su ostale u referentnom obsegu.

Prosečna vrednost kalcijuma u mokraći u kontroloj grupi je bila veća od vrednosti u studijskoj grupi, kretanje njegovih vrednosti je bilo bez značajnijih promena i nije nađena statistički značajna razlika između kontrola. Grafik 19.



Graf. 19. Prosečne vrednosti kalcijuma u urinu tokom praćenja u obe ispitivane grupe

4.2. Korelaciona statistika

Značajna pozitivna povezanost postoji u kontrolnoj grupi između nivoa vitamina D3 i vrednosti kalcijuma u serumu na početku ($r=0,303$) $p=0,043$ i u studijskoj grupi na kraju istraživanja ($r=0,312$) $p=0,49$, alkalne fosfataze na početku ($r=0,298$) $p=0,047$ i fosfata u serumu u studijskoj grupi ($r=0,343$) $p=0,030$ na kraju istraživanja.

Pozitivna povezanost bez statističke značajnosti je utvrđena između nivoa vitamina D3 i nivoa albumina [$(r=0,086)$; $p=0,581$ i $(r=0,003)$; $p=0,987$], fibrinogena [$(r=0,206)$ $p=0,18$ i $(r=0,037)$ $p=0,821$], ukupnog holesterola [$(r=0,119)$; $p=0,438$ i $(r=0,231)$; $p=0,152$] i jačine glomerulske filtracije [$(r=0,055)$ $p=0,72$ i $(r=0,113)$ $p=0,486$], na početku i na kraju istraživanja.

Negativna povezanost bez statističke značajnosti je utvrđena između nivoa vitamina D3 i SE [$(r=-0,098)$ $p=0,521$ i $(r=-0,024)$ $p=0,885$], triglicerida [$(r=-0,031)$; $p=0,842$ i $(r=-0,236)$; $p=0,142$], FAKRIZ-a [$(r=-0,077)$ $p=0,622$ i $(r=-0,216)$ $p=0,181$], INDART-a [$(r=-0,053)$; $p=0,737$ i $(r=-0,233)$; $p=0,148$] i HbA1c [$(r=-0,2)$ $p=0,188$ i $(r=-0,0125)$; $p=0,463$] na početku i na kraju istraživanja i BMI [$(r=-0,197)$ $p=0,195$, na početku istraživanja.

Varijabilna povezanost postoji između vrednosti vitamina D3 i HDL-holesterola [$(r=0,176)$; $p=0,246$ i $(r=-0,36)$ $p=0,825$], LDL-holesterola [$(r=0,152)$; $p=0,326$ i $(r=-0,24)$ $p=0,136$], alkalne fosfataze [$(r=0,89)$; $p=0,568$ i $(r=-0,007)$ $p=0,967$] i kalcijuma u urinu [$(r=0,109)$; $p=0,491$ i $(r=-0,033)$ $p=0,836$], s tim što u početnoj fazi porasta vrednosti vitamina D3 postoji pozitivna povezanost a u kasnijoj fazi je ona negativna.

Varijabilna povezanost u obrnutom smislu postoji između vitamina D3 i 24h proteinurije [$(r=-0,0165)$ $p=0,28$ i $(r=0,062)$ $p=0,706$] i crp-a [$(r=-0,0086)$; $p=0,577$ i $(r=0,021)$ $p=0,986$] gde inicijalno postoji negativna povezanost koja u kasnijoj fazi postaje pozitivna. Tabela 12.

Tabela 12. Korelaciona analiza varijabli

varijabla	Kontr. grupa	Stud.grupa		Stud.grupa
	Vitamin D3 I		Vitamin D3 II	
Albumin I	-0,258/0,087	0,086/0,581	Albumin IV	0,003/0,987
CRP I	-0,059/0,702	-0,086/0,577	CRP IV	0,021/0,986
FIBRINOGEN I	0,395/0,008	0,206/0,18	FIBRINOGEN IV	0,037/0,821
SE I	0,235/0,12	-0,098/0,521	SE IV	-0,024/0,885
HOL-uk I	0,209/0,168	0,119/0,438	HOL –uk II	0,231/0,152
TGG I	0,134/0,38	-0,031/0,842	TGG II	-0,236/0,143
HDL-hol I	0,21/0,166	0,176/0,246	HDL-hol II	-0,036/0,825
LDL-hol I	0,172/0,265	0,151/0,326	LDL-hol II	-0,24/0,136
FAKRIZ I	-0,136/0,378	-0,077/0,622	FAKRIZ II	-0,216/-0,181
IA I	-0,097/0,050	-0,053/0,737	IA II	-0,233/0,148
HbA1c I	0,071/0,643	-0,2/0,188	HbA1c II	-0,125/0,463
Ca (s)	0,303/0,043	0,064/0,678	Ca (s) IV	0,312/0,049
Ca (u)	-0,23/0,128	0,109/0,491	Ca (u) IV	-0,033/0,836
P I	-0,084/0,59	0,045/0,0768	P IV	0,343/0,030
Alk.fosf	0,298/0,047	0,89/0,568	Alk. fosf IV	-0,007/0,967
JGF I	-0,173/0,256	0,055/0,720	JGF II	0,113/0,486
Prot 24h (u) I	0,051/0,0738	-0,165/0,280	Prot 24h (u) IV	0,062/0,706
BMI	0,22/0,146	-0,197/0,195	-	

Napomene: CRP-C reaktivni protein, SE-sedimentacija, HbA1c-hemoglobin A1c, HOL-uk-ukupni holesterol, HDL-high density lipoprotein-holesterol, LDL- low density lipoprotein-holesterol, TGG-trigliceridi, FAKRIZ-faktor rizika (non HDL tj. ukupni holesterol – HDL holesterol), IA- index ateroskleroze (LDL/HDL holesterol), Ca(s)-kalcijum u serumu, Ca(u)-kalcijum u urinu, P-fosfati, alk.fosf.-alkalna fosfataza, JGF- jačina glomerulske filtracije, prot 24h(u)-proteinurija u 24h urinu, BMI-body mass index.

Tabela 13. Testiranje normalnosti distribucije

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PLR	0,073	31	0,200*	0,979	31	0,778
HbA1c	0,096	31	0,200*	0,964	31	0,370
Ukupni holesterol	0,136	31	0,153	0,954	31	0,207
ALK_FOSFATAZA	0,085	31	0,200*	0,980	31	0,804
JGF	0,094	31	0,200*	0,983	31	0,884
Trigliceridi	0,170	31	0,023	0,911	31	0,014
HDL-holesterol	0,200	31	0,003	0,745	31	0,000
LDL-holesterol	0,123	31	0,200*	0,945	31	0,110
PRO_24h urinu	0,367	31	0,000	0,412	31	0,000
NLR	0,124	31	0,200*	0,959	31	0,273
CRP	0,107	31	0,200*	0,921	31	0,026

Kako većina varijabli ima signifikantnost veću od 0,05, zaključujemo da pretpostavka o normalnosti raspodele nije narušena i da je možemo kao takvu prihvatiti.

U odnosu na JGF nađena je statistički značajna korelacija samo sa kalcijumom u urinu. Utvrđen je pozitivan korelacioni trend sa albuminima i vitaminom D3 u serumu kao i sa INDART-om, veoma niske korelacione jačine, i negativan korelacioni trend sa HbA1c $r=0,295$, sa trigliceridima $r=0,205$, sa ukupnim holesterolom $r=0,231$, sa LDL-holesterolom $r=0,282$ i 24h-proteinurijom $r=0,065$. Tabela 14.

Tabela 14. Korelaciona matrica JGF sa praćenim parametrima

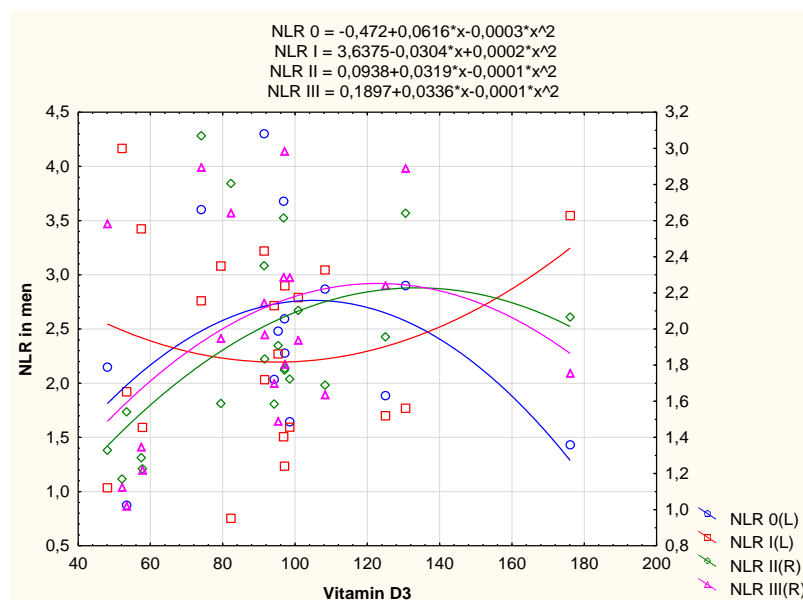
JGF	HbA1c	INDART	FAKRIZ	TGG	LDL	HDL	HOL	CRP	VitD3	biuret	alb	CaU	CaS
1	-0,112	0,009	-0,037	-0,135	-0,116	-0,053	-0,127	-0,023	0,005	-0,195	0,014	0,460	-0,058
	0,295	0,935	0,734	0,205	0,282	0,617	0,231	0,832	0,960	0,065	0,896	0,000**	0,585

** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

Napomene: CRP-C reaktivni protein, HbA1c-hemoglobin A1c, HOL-uk-ukupni holesterol, HDL-high density lipoprotein-holesterol, LDL-low density lipoprotein-holesterol, TGG-trigliceridi, FAKRIZ-faktor rizika (non HDL tj. ukupni holesterol – HDL holesterol), INDART-index ateroskleroze (LDL/HDL holesterol), Ca(s)-kalcijum u serumu, Ca(u)-kalcijum u urinu, JGF- jačina glomerulske filtracije, biuret-proteinurija u 24h urinu.

4.3. Prosta linearna kvadratna regresiona analiza delovanja vitamina D3 na NLR kod žena i muškaraca

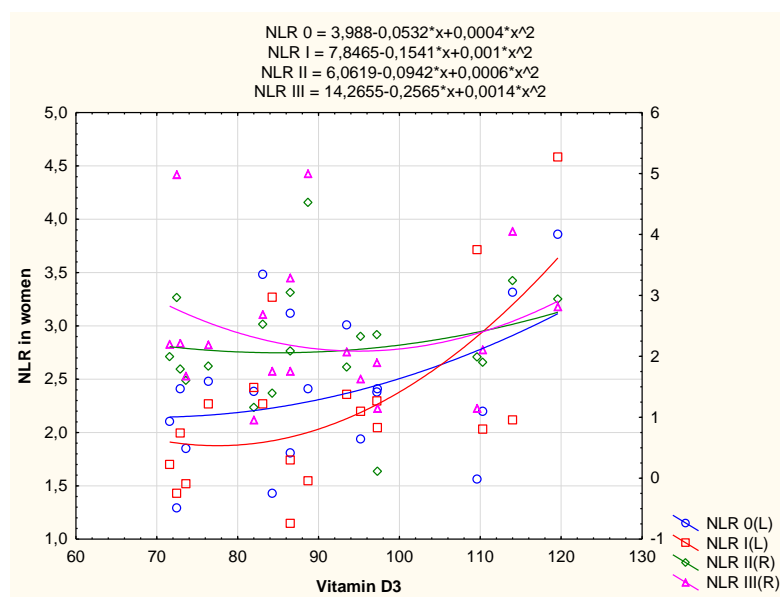
Jednostavnom linearnom kvadratnom regresijskom analizom uticaja vitamina D3 na NLR kod **muškaraca** zaključili smo da NLR raste do tačke maksimalne funkcije t_{max} (102,67; 2,69) i nakon što ta vrednost NLR padne do tačke minimalnog t_{min} (76,2; 2,48) i vrednost po kojoj će se NLR kretati nalazi se u intervalu od 2,48 do 2,69 što je u intervalu referentne vrednosti za određenu starost. Grafik 20.



Graf 20. NLR regresione funkcije kod muškaraca

Jednostavnom linearnom kvadratnom regresijskom analizom delovanja vitamina D3 na NLR kod **žena** zaključujemo da NLR pada na tačku minimalne funkcije t_{min} (66,5; 2,22) i

da će se naknadno povećavati. U sledećoj kontroli, NLR pada na t_{min} (77,05; 1,91) i tada počinje rasti. U sledećoj fazi, NLR će pasti do tačke t_{min} (78,5; 2,36), a zatim će početi rasti. U sljedećoj kontroli NLR će pasti na t_{min} (91,61; 2,51). Regresijski model na prvoj kontroli pokazuje statističku značajnost ($F=5,396$; $p=0,016$), dok za preostala 3 regresijska modela nema statističku značajnost. Koeficijent korelacije je $r1=0,414$, $r2=0,635$, $r3=0,2$, $r4=0,239$. Grafik 21.



Graf 21. NLR regresione funkcije kod žena

4.4. Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu - ceo uzorak

U višestrukom linearnom regresionom modelu za zavisnost proteina u 24h urinu od uticaja nezavisnih varijabli - triglicerida, HbA1c, ukupnog holesterola, HDL-holesterola i LDL-holesterola dobijen je regresioni model. Jačina veze između zavisne varijable proteina u 24h urinu (Tabela 15) i nezavisnih napred navedenih varijabli pokazuje relativno slabu povezanost ($r=0,321$).

Tabela 15. Rezime regresionog modela

Model	R	R ²	Prilagodjeni R ²	Std. greška jednačine
1	0,321	0,103	0,033	0,7360664

a. Prediktori: (Constant), Trigliceridi, HbA1C II, Holesterol uk II, HDL hol II, LDL hol II

Analizom varijanse (Tabela 16) kod regresije moguće je izvršiti testiranje hipoteze da je $\beta = 0$, kao i testiranje linearnosti regresije. U ovom drugom slučaju treba dokazati da se srednje vrednosti μ za svako X nalaze na liniji regresije. Ukoliko je poređenjem sa tabelama F distribucije za $F_{(\alpha;1 \text{ i } n-2)}$ izračunato F manje, tada se hipoteza prihvata dok se u suprotnom odbacuje.

U konkretnom primeru odnos varijansi $F=0,762$ $p=0,585$ pokazuje da između varijabli ne postoje visoko statistički značajne razlike.

Tabela 16. Analiza varijanse modela

		ANOVA				
Model		Suma kvadrata	Stepen slobode	Sredine kvadrata	F	p
1	Regresija	2,061	5	0,412	0,761	0,585
	Reziduali	17,879	33	0,542		
	Ukupno	19,940	38			

a. Zavisna varijabla: Prot 24h urin

b. Prediktori: (Constant), Trigliceridi, HbA1c, Holesterol uk., HDL hol, LDL hol

Dobijeni koeficijenti (Tabela 17) pokazuju da na proteine u 24h urinu HbA1c utiče pozitivno ali varijabla nema statističku značajnost $p=0,824$. Ukupni holesterol utiče na smanjenje proteina u 24h urinu i kao varijabla nema statistički značajan uticaj ($p=0,993$). HDL-holesterol deluje stimulatивно na proteine u 24h urinu i varijabla nema statističku značajnost ($p=0,122$). LDL-holesterol deluje stimulatивно ali ni on nema statistički značajan uticaj ($p=0,638$). Trigliceridi deluju takođe stimulatивно ali ni oni nemaju statistički značajan uticaj ($p=0,724$).

Tabela 17. Regresioni koeficijenti

Model		Nestandardni Koeficijenti B	Standardni Koeficijenti Std. greška	Standardni Koeficijenti Beta	t	p
1	(Constant)	-0,675	1,322		-0,511	0,613
	HbA1c II	0,005	0,023	0,040	0,224	0,824
	Holesterol uk	-1,598E-5	0,002	-0,002	-0,009	0,993
	HDL hol	0,356	0,224	0,274	1,589	0,122
	LDL hol	0,063	0,133	0,086	0,475	0,638
	Trigliceridi	0,055	0,155	0,064	0,356	0,724

a. Zavisna varijabla: 24PROurin IV

Jednačina višestruke linearne regresije za zavisnost proteina u 24h urinu u studijskoj grupi i HbA1c, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i LDL-holesterola na kraju istraživanja gde su u model ubačene **prosečne** vrednosti nezavisnih varijabli glasi:

$$Y = -0,675 + (\text{SG HbA1c} \times 48,68) - (\text{Ukupni holesterol} \times 5,39) + (\text{HDL-holesterol} \times 1,32) + (\text{LDL-holesterol} \times 3,38) + (\text{Trigliceridi II} \times 1,81) = 0,3505$$

Vrednost proteina u 24h urinu za prosečne vrednosti u regresionoj funkciji u studijskoj grupi iznosiće 0,3505 g/du.

Prost linearni krivolinijski model za zavisnost proteina u 24h urinu od uticaja vitamina D3 pokazuje da je jačina linearne veze relativno slaba ($r=0,157$) (Tabela 18) i model nema statističku značajnost $p=0,628$ (Tabela 19). Međutim, iz modela je primetno da će vrednost proteina u modelu rasti do određene granice a nakon toga će dolaziti do opadanja vrednosti proteina u urinu (grafik 22). Iz ovog modela zaključujemo da sa povećavanjem nivoa vitamina D3 u krvi vremenom dolazi do pada proteina u urinu.

Tabela 18. Rezime regresionog modela

R	R ²	Prilagodjeni R ²	Std. greška jednačine
0,157	0,025	-0,028	0,726

Nezavisna varijabla vitamin D3 II.

Tabela 19. Analiza varijanse modela

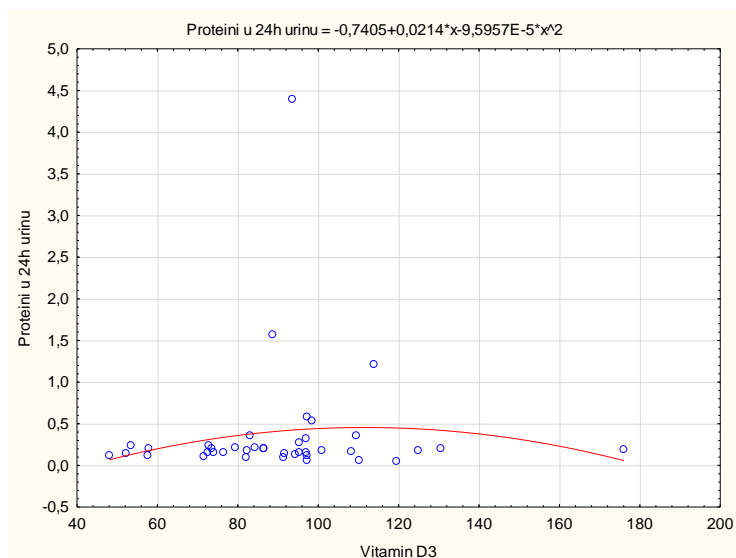
ANOVA

	Suma kvadrata	Stepen slobode	Sredine kvadrata	F	p
Regresija	0,496	2	0,248	0,471	0,628
Reziduali	19,483	37	0,527		
Ukupno	19,978	39			

Nezavisna varijabla vitamin D3 II.

Tabela 20. Koeficijenti prostog regresionog modela

	Nestandardni Koeficijenti		Standardni Koeficijenti		p
	B	Std. greška	Beta	t	
D3_II	0,021	0,022	0,711	0,954	0,346
D3_II ** 2	-9,596E-5	0,000	-0,665	-0,893	0,378
(Constant)	-0,741	1,140		-0,649	0,520



Graf. 22. Kretanje proteina u 24h urinu u zavisnosti od vitamina D3

Kompleksni višestruki regresioni model uticaja vitamina D3 u interrekciji sa ostalim nezavisnim varijablama (HbA1c, ukupni holesterol, trigliceridi HDL-holesterol, LDL-holesterol) ima relativno slabu linearnu vezu ($r=0,390$) (Tabela 21) i model nema statističku značajnost $p=0,448$ (Tabela 22).

Tabela 21. Rezime regresionog modela

Model	R	R ²	Prilagodjeni R ²	Std. greška jednačine
1	0,390	0,152	-0,002	0,71631

a. Prediktori: (Constant), D3_II, HDL hol, LDL hol, Trigliceridi, HbA1c, Holesterol uk.

Tabela 22. Analiza varijanse modela

Model		Suma kvadrata	Stepen slobode	Sredine kvadrata	F	p
1	Regresija	3,046	6	0,508	0,989	0,448
	Reziduali	16,932	33	0,513		
	Ukupno	19,978	39			

a. Zavisna varijabla: Prot 24h urin

b. Prediktori: (Constant), D3-II, HDL hol, LDL hol, Trigliceridi, HbA1c, Holesterol uk.

Ekstrapolacijom novo-dobijenog modela gde smo za nezavisne varijable primenili ispod-prosečne vrednosti nezavisnih varijabli u studijskoj grupi dobili smo rezultate proteina u 24h urinu koji odgovaraju vrednostima manjim od 0,15 g/du tj. 0,0652 g/du. (Tabela 23).

$$Y = -1,747 + (\text{HbA1c} \times 40) - (\text{Ukupni holesterol} \times 4,0) + (\text{HDL-holesterol} \times 1,1) + (\text{LDL-holesterol} \times 2,4) + (\text{Trigliceridi II} \times 1,2) + (\text{Vitamin D3} \times 100) = 0,0652$$

U novoformiranom modelu ni jedna varijabla nema statističku značajnost. HbA1c ima jako mali stimulativni uticaj na proteine u 24h urinu ($p=0,919$), dok je uticaj ukupnog holesterola prilično veliki i takođe deluje stimulativno ($p=0,248$). Trigliceridi deluju negativno na proteine u 24h urinu bez značajnosti ($p=0,714$) a HDL-holesterol deluje stimulativno u visokom koeficijentu ($p=0,301$). Uticaj LDL-holesterola je negativan uz visok koeficijent ($p=0,301$) dok vitamin D3 deluje stimulativno na proteine u 24h urinu ($p=0,425$) (Tabela 23).

Tabela 23. Koeficijenti regresionog modela

Model		Nestandardni Koeficijenti		Standardni Koeficijenti	t	p
		B	Std. greška	Beta		
1	(Constant)	-1,747	1,422		-1,229	0,228
	HbA1c	0,003	0,025	0,021	0,103	0,919
	Holesterol uk.	0,675	0,575	1,114	1,175	0,248
	Trigliceridi	-0,073	0,197	-0,086	-0,370	0,714
	HDL hol	0,242	0,231	0,187	1,051	0,301
	LDL hol	-0,661	0,628	-0,930	-1,051	0,301
	D3 II	0,004	0,005	0,140	0,807	0,425

a. Zavisna varijabla: Prot 24h urin

4.5. Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu po polu

4.5.1. Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu – za žene

U višestrukom linearnom regresionom modelu za zavisnost proteina u 24h urinu kod žena od uticaja HbA1c, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i LDL-holesterola dobijen je regresioni model. Jačina veze između zavisne varijable 24h proteina u urinu i nezavisnih napred navedenih varijabli pokazuje jaku linearnu vezu ($r=0.78$) (Tabela 24).

Tabela 24. Rezime regresionog modela

Model	R	R ²	Prilagodjeni R ²	Std. greška jednačine
1	0,780 ^a	0,608	0,457	0,75049

a. Prediktori: (Constant), Trigliceridi, HDL hol, LDL hol, Hb1Ac, Holesterol uk.

Analizom varijanse kod regresije moguće je izvršiti testiranje hipoteze da je $\beta = 0$,

kao i testiranje linearnosti regresije. U ovom drugom slučaju treba dokazati da se srednje vrednosti μ za svako X nalaze na liniji regresije. Ukoliko je poređenjem sa tabelama F distribucije za $F_{(\alpha;1 \text{ i } n-2)}$ izračunato F manje, tada se hipoteza prihvata dok se u suprotnom odbacuje.

U konkretnom primeru odnos varijansi $F=4,036$ $p=0,02$ pokazuje da između varijabli postoje visoko statistički značajne razlike. Model ima statističku značajnost (Tabela 25).

Tabela 25. Analiza varijanse modela

ANOVA

Model		Suma kvadrata	Stepen slobode	Sredine kvadrata	F	p
1	Regresija	11,365	5	2,273	4,036	0,020
	Reziduali	7,322	13	0,563		
	Ukupno	18,687	18			

a. Zavisna varijabla: Prot 24h urin

b. Prediktori: (Constant), Holesterol uk.,HDL hol,Hb1Ac Trigliceridi, LDL hol.

Dobijeni koeficijenti (Tabela 26) pokazuju da na proteine u 24h urinu HbA1c utiče pozitivno ali varijabla nema statističku značajnost ($p=0,467$). Ukupni holesterol utiče na povećanje proteina u 24h urinu i kao varijabla ne utiče statistički značajno na proteine u 24h urinu ($p=0,76$). HDL-holesterol deluje stimulatивно na proteine u 24h urinu i varijabla ima statističku značajnost ($p=0,002$). LDL-holesterol deluje negativno tj. destimulatивно i nema statistički značajan uticaj ($p=0,535$). Trigliceridi deluju stimulatивно ali ni oni nemaju statistički značajan uticaj ($p=0,303$).

Tabela 26. Koeficijenti višestrukog regresionog modela

Model		Nestandardni Koeficijenti		Standardni Koeficijenti	t	p
		B	Std. greška	Beta		
1	(Constant)	-3,675	2,169		-1,694	0,114
	Hb1Ac II	0,029	0,038	0,153	0,749	0,467
	Holesterol uk.	0,235	0,754	0,258	0,312	0,760
	HDL hol	1,982	0,520	0,780	3,814	0,002
	LDL hol	-0,509	0,799	-0,490	-0,637	0,535
	Trigliceridi	0,347	0,323	0,272	1,074	0,303

a. Zavisna varijabla: PRO 24h urin-IV

Jednačina višestruke linearne regresije za zavisnost proteina u 24h urinu u studijskoj grupi na kraju istraživanja od HbA1C, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i LDL-holesterola kod žena gde su u model ubačene **prosečne** vrednosti nezavisnih varijabli glasi:

$$Y = -3,675 + (\text{SG HbA1c II} \times 50,38) + (\text{Holesterol II} \times 5,7) + (\text{HDL II} \times 1,36) - (\text{LDL II} \times 3,6) + (\text{Trigliceridi II} \times 1,81) = 0,628$$

Vrednost proteina u 24h urinu za prosečne vrednosti nezavisnih varijabli kod žena u regresionoj funkciji u studijskoj grupi iznosiće 0,628. g/du.

Ukoliko u jednačinu višestruke linearne regresije za zavisnost proteina u 24h urinu kod žena od HbA1C, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i LDL-holesterola na kraju istraživanja ubacimo **maksimalne** vrednosti nezavisnih varijabli u studijskoj grupi dobijamo:

$$Y = -3,675 + (\text{HbA1c} \times 61,6) + (\text{Ukupni holesterol} \times 8,21) + (\text{HDL-holesterol} \times 2,3) - (\text{LDL-holesterol} \times 5,66) + (\text{Trigliceridi} \times 4,68) = 3,33$$

Vrednost proteina u 24h urinu za maksimalne vrednosti nezavisnih varijabli u regresionoj funkciji u studijskoj grupi za žene iznosiće 3,33. g/du

Zbog visokih vrednosti proteina u 24h urinu u iznosu od 0,628 g/du koje smo dobili pri prosečnim vrednostima nezavisnih varijabli u model smo ubacili i dodatnu varijablu vitamina D3 uz ranije navedene nezavisne varijable - HbA1c, ukupni holesterol, trigliceridi, HDL-holesterol i LDL-holesterol, na kraju istraživanja. Iz dobijenih rezultata zaključujemo da model ima jaku korelacionu vezu ($r=0,834$) (Tabela 27) a dobijeni novi regresioni model ima statističku značajnost $F=3,82$; $p=0,030$ (Tabela 28). Dobijeni koeficijenti pored ostalih nezavisnih varijabli pokazuju da vitamin D3 utiče stimulatивно na vrednost proteina u 24h urinu iako varijabla nema statističku značajnost $p=0,146$ (Tabela 29).

Tabela 27. Rezime modela

Model	R	R ²	Prilagodjeni R ²	Std. greška jednačine
1	0,834 ^a	0,696	0,514	0,74881

a. Predictors: (Constant), D3II, Trigliceridi, HDL hol, LDL hol, Hb1Ac, Holesterol uk.

Tabela 28. Analiza varijanse modela

		ANOVA				
Model		Suma kvadrata	Stepen slobode	Sredine kvadrata	F	p
1	Regresija	12,852	6	2,142	3,820	0,030
	Reziduali	5,607	10	0,561		
	Ukupno	18,459	16			

a. Zavisna varijabla: Prot 24h urin

b. Prediktori: (Constant), D3II, SG Trigliceridi, HDL hol, LDL hol, Hb1Ac, Holesterol uk.

Tabela 29. Koeficijenti višestrukog regresionog modela

Model		Nestandardni Koeficijenti		Standardni Koeficijenti	t	p
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-7,789	3,257		-2,391	0,038
	Trigliceridi	,293	0,389	0,219	0,754	0,468
	HDL hol	2,175	0,560	0,820	3,885	0,003
	LDL hol	-0,538	1,206	-0,501	-0,446	0,665
	Hb1ACI	0,055	0,042	0,294	1,323	0,215
	Holesterol uk.	0,331	1,122	0,354	0,295	0,774
	D3_II	0,023	0,015	0,341	1,578	0,146

a. Zavisna varijabla: SG PRO 24-IV

Izvršenim ekstrapolacijama (Tabela 29) dobijenog regresionog modela gde smo primenili prosečne vrednosti nezavisnih varijabli dobili smo vrednost proteina u 24h urinu od 0,506 g/du, što je za 24% bolji rezultat ali još uvek daleko od graničnih vrednosti za isključenje dijabetesne nefropatije. Ponovnom ekstrapolacijom modela gde smo prethodno utvrdili da je za normalnu vrednost proteina u 24h urina kod žena potrebno primeniti vrednosti nezavisnih varijabli koje se kreću **između minimalnih i prosečnih** vrednosti istih, dobijen je model koji glasi:

$$Y = -7,789 + (\text{HbA1c} \times 42) + (\text{Holesterol} \times 4,5) + (\text{HDL} \times 1,4) - (\text{LDL} \times 2,5) + (\text{Trigliceridi} \times 1,3) + (\text{D3} \times 90) = 0,0912.$$

Dobijeni rezultat zavisne varijable proteina u 24h urinu (0,0912 g/du) pokazuje vrednost zavisne varijable koja je manja od 0,15 g/du za zadate parametre ekstrapolisanog modela.

4.5.2. Višestruki linearni regresioni model za proteine u 24h urinu – za muškarce

U višestrukom linearnom regresionom modelu za zavisnost proteina u 24h urinu kod muškaraca od uticaja - triglicerida, HbA1c, ukupnog holesterola, HDL-holesterola i LDL-holesterola dobijen je regresioni model. Jačina veze između zavisne varijable proteina u 24h urinu i nezavisnih napred navedenih varijabli pokazuje značajnu linearnu vezu ($r=0,538$) (Tabela 30).

Tabela 30. Rezime regresionog modela

Model	R	R ²	Prilagodjeni R ²	Std. greška jednačine
1	0,538	0,289	0,053	0,12189

a. Prediktori: (konstant), Trigliceridi, Holesterol uk., HbA1c, HDL hol, LDL hol

Analizom varijanse (Tabela 31) kod regresije moguće je izvršiti testiranje hipoteze da je $\beta=0$, kao i testiranje linearnosti regresije. U ovom drugom slučaju treba dokazati da se srednje vrednosti μ za svako X nalaze na liniji regresije. Ukoliko je poređenjem sa tabelama F distribucije za $F_{(\alpha;1 \text{ i } n-2)}$ izračunato F manje, tada se hipoteza prihvata dok se u suprotnom odbacuje.

U konkretnom primeru odnos varijansi $F = 1,22$ $p=0,347$ pokazuje da između varijabli ne postoje visoko statistički značajne razlike. Model nema statističku značajnost.

Tabela 31. Analiza varijanse modela

		ANOVA				
Model		Suma kvadrata	Stepen slobode	Sredine kvadrata	F	p
1	Regresija	0,091	5	0,018	1,222	0,347
	Reziduali	0,223	15	0,015		
	Ukupno	0,314	20			

a. Zavisna varijabla: Prot 24h urin

b. Prediktori: (konstant), Trigliceridi, Holesterol uk., HbA1c, HDL hol, LDL hol

Dobijeni koeficijenti (Tabela 32) pokazuju da na proteine u 24h urinu kod muškaraca HbA1c utiče negativno ali varijabla nema statističku značajnost $p=0,166$. Ukupni holesterol ne utiče na povećanje proteina u 24h urinu i kao varijabla nema statistički značajan uticaj ($p=0,989$). HDL-holesterol deluje destimulativno na proteine u 24h urinu i varijabla nema statističku značajnost ($p=0,139$). LDL-holesterol deluje pozitivno tj. stimulativno ali nema

statistički značajan uticaj ($p=0,148$). Trigliceridi deluju stimulatивно ali ni oni nemaju statistički značajan uticaj ($p=0,105$).

Tabela 32. Koeficijenti regresionog modela

Model		Nestandardni Koeficijenti		Standardni Koeficijenti	t	p
		B	Std. greška	Beta		
1	(Constant)	0,502	0,324		1,549	0,142
	HbA1c	-0,011	0,007	-0,433	-1,457	0,166
	Holestero uk.	0,000	0,029	0,003	0,013	0,989
	HDL hol	-0,073	0,047	-0,393	-1,562	0,139
	LDL hol	0,062	0,041	0,464	1,525	0,148
	Trigliceridi	0,058	0,034	0,424	1,723	0,105

a.Zavisna varijabla: SG PROTEINI 24h-IV

Jednačina višestruke linearne regresije za zavisnost proteina u 24h urinu na kraju istraživanja u studijskoj grupi i HbA1c, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i LDL-holesterola kod muškaraca gde su u model ubačene **prosečne** vrednosti nezavisnih varijabli glasi:

$$Y = 0,502 - (\text{HbA1c} \times 0,011) + (\text{Ukupni holesterol} \times 0,0) - (\text{HDL-holesterol} \times 0,073) + (\text{LDL-holesterol} \times 0,062) + (\text{Trigliceridi} \times 0,058) = 0,192$$

Vrednost proteina u 24h urinu za prosečne vrednosti u regresionoj funkciji u studijskoj grupi kod muškaraca iznosiće 0,192. g/du.

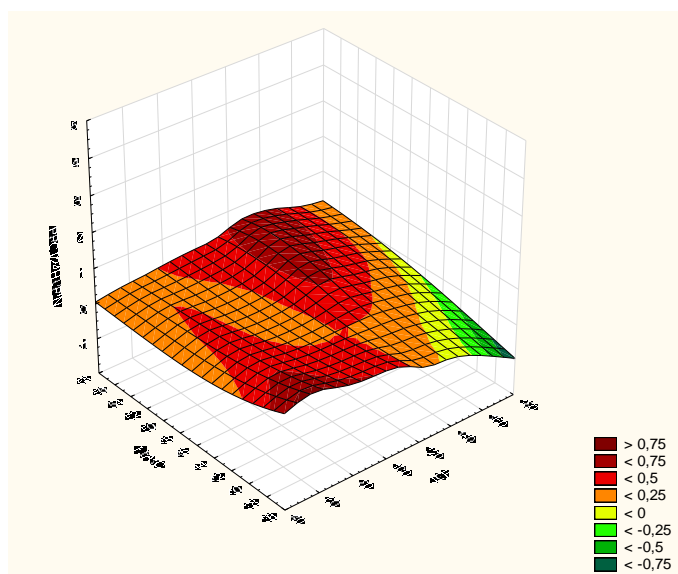
Jednačina višestruke linearne regresije za zavisnost proteina u 24h urinu od HbA1c, ukupnog holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i LDL-holesterola kod muškaraca na kraju istraživanja gde su u model ubačene **maksimalne** vrednosti nezavisnih varijabli glasi:

$$Y = 0,502 - (\text{HbA1c} \times 0,011) + (\text{Ukupni holesterol} \times 0,0) - (\text{HDL-holesterol} \times 0,073) + (\text{LDL-holesterol} \times 0,062) + (\text{Trigliceridi} \times 0,058) = 0,158$$

Vrednost proteina u 24h urinu za maksimalne vrednosti u regresionoj funkciji u studijskoj grupi kod muškaraca iznosiće 0,158. g/du.

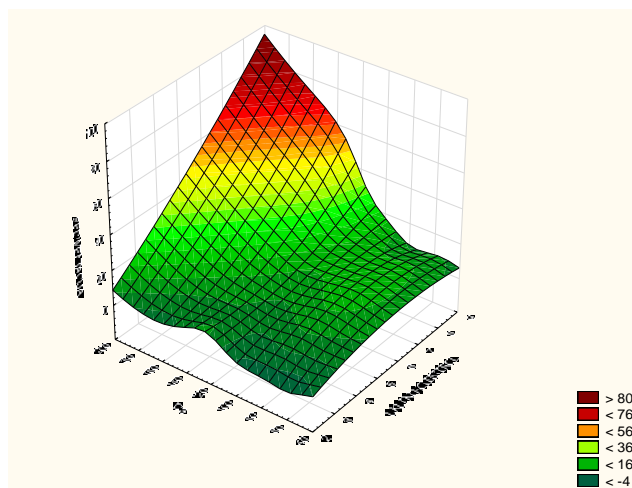
4.6. Trodimenzionalni grafici kretanja pojedinih zavisnih varijabli u studijskoj grupi u zavisnosti od odabranih nezavisnih varijabli

Posmatrajući 3D grafik uticaja HbA1c i JGF na proteine u 24h urinu zaključujemo da ukoliko imamo maksimalnu vrednost JGF i vrednost HbA1c do 45 mmol/mol vrednost proteina u 24h urinu će biti u okviru referentnih vrednosti tj. do 0,15 g/du. Ukoliko se naruši ovaj balans u smislu smanjenja vrednosti JGF i porasta HbA1c preko 45 mmol/mol dolaziće do porasta vrednosti proteina 24h urinu. Grafik 23.



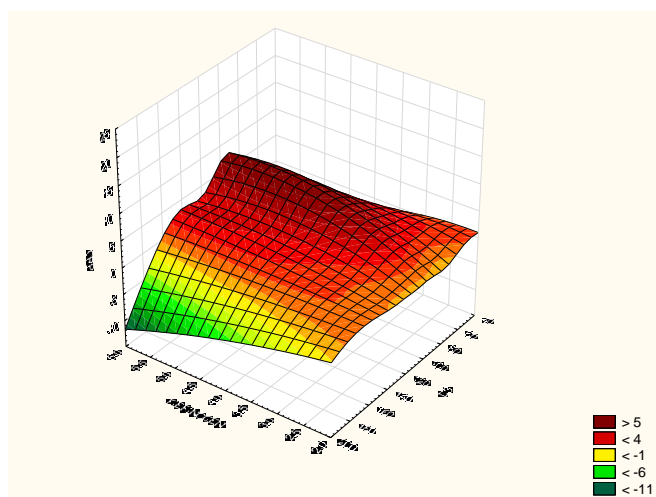
Graf. 23. Trodimenzionalni grafik kretanja vrednosti proteina u 24h urinu u zavisnosti od HbA1c i JGF u studijskoj grupi.

Posmatrajući uticaj Vitamina D3 i holesterola na sedimentaciju zaključujemo da će vitamin D3 imati pozitivan uticaj do vrednosti od 140 nmol/L i vrednosti holesterola do 6 mmol/L na postizanje referentnih vrednosti sedimentacije. Nakon prekoračenja navedenih vrednosti dolazi do porasta sedimentacije. Zaključujemo da su ekstremne vrednosti sedimentacije u studijskoj grupi relativno retke jer se radi o jednom malom odsečku u trodimenzionalnom koordinatnom sistemu. Grafik 24.



Graf. 24. Trodimenzionalni grafik kretanja vrednosti sedimentacije u zavisnosti od ukupnog holesterola i vitamina D3 u studijskoj grupi.

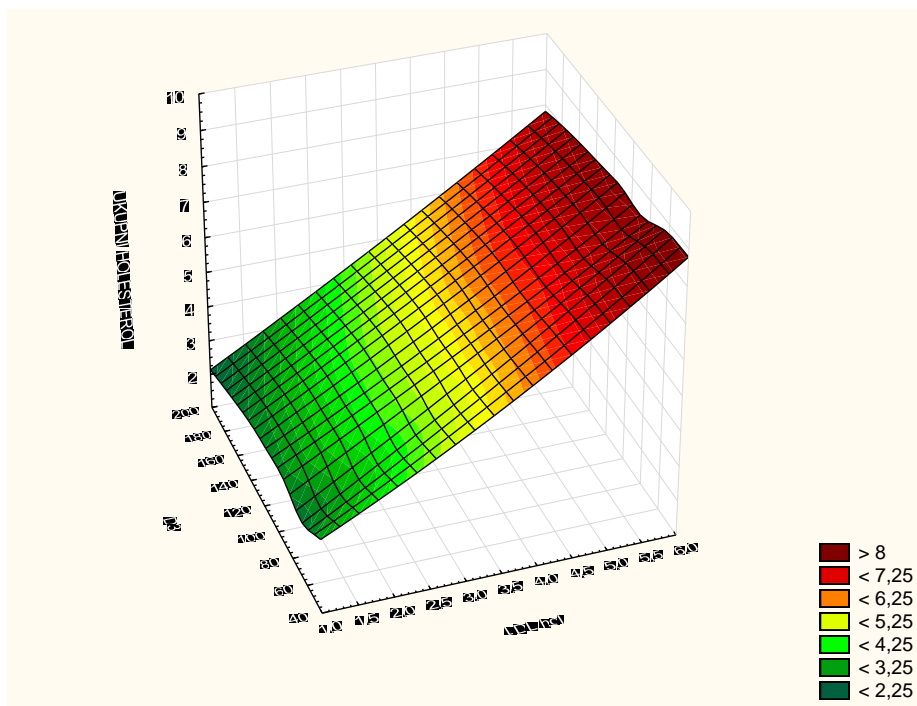
Posmatrajući uticaj fibrinogena i vitamina D3 na vrednost CRP-a u analiziranoj studijskoj grupi zaključujemo da nivo vitamina D3 preko 140 nmol/L utiče na normalne vrednosti CRP-a bez obzira na visinu fibrinogena. Vrednosti vitamina D3 ispod 140 nmol/L i fibrinogena do 3,5 g/L omogućavaju normalan nivo CRP-a, sve ostale varijacije utiču na rast CRP-a preko referentnih vrednosti. Grafik 25.



Graf. 25. Trodimenzionalni grafik kretanja vrednosti CRP-a u zavisnosti od fibrinogena i vitamina D3 u studijskoj grupi

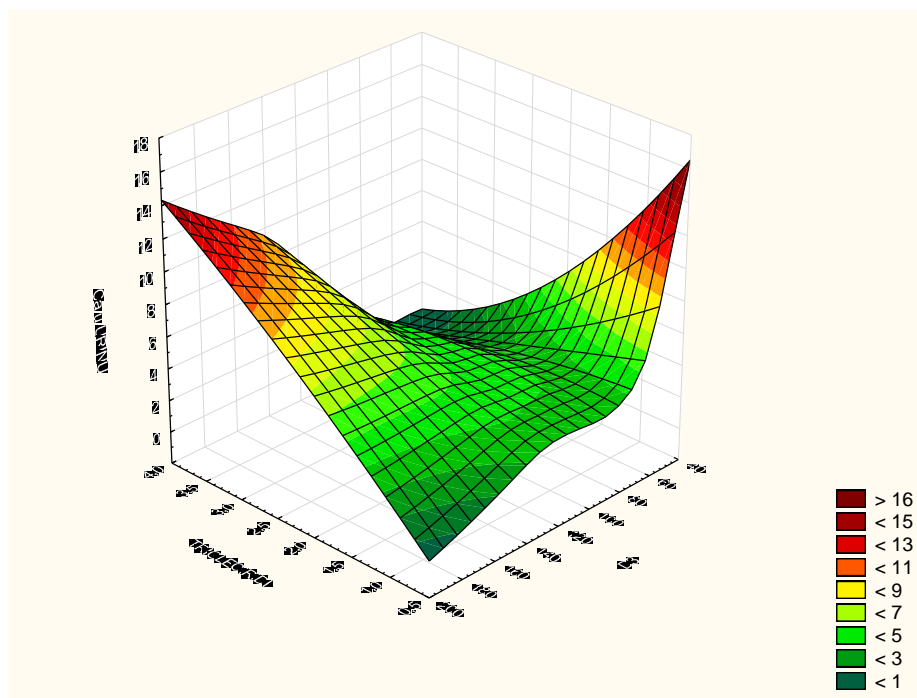
Posmatrajući vrednosti ukupnog holesterola u zavisnosti od uticaja vitamina D3 i LDL-holesterola zaključujemo da će normalan nivo ukupnog holesterola biti kada je LDL-

holesterol na nivou od 4,5 mmol/L bez obzira na nivo vitamina D3 (vitamin D3 ublažava negativan uticaj LDL-holesterola do granice od 4,5). Grafik 26.



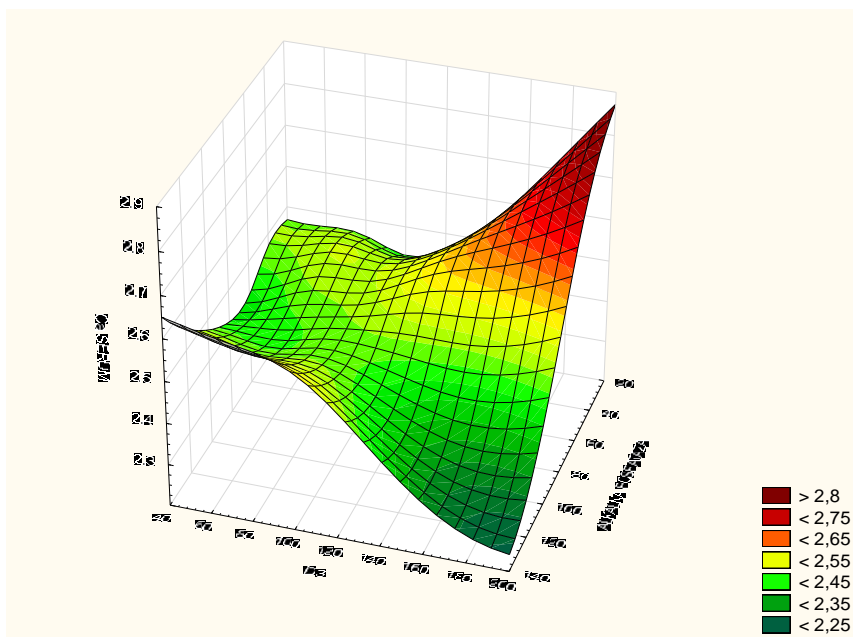
Graf. 26. Trodimenzionalni grafik kretanja vrednosti holesterola u zavisnosti od vitamina D3 i LDL-holesterola u studijskoj grupi

Visina kalcijuma u urinu u zavisnosti od uticaja triglicerida i vitamina D3 će se kretati na nivou referentnih vrednosti u intervalu vrednosti nivoa triglicerida od 3 mmol/L i vrednosti vitamina D3 od 180 nmol/L pa do vrednosti triglicerida od 1 mmol/L i vitamina D3 od 60 nmol/L. Ekstremna vrednost kalcijuma u urinu će se dešavati i pri kretanju triglicerida do 1mmol/L i vitamina D3 od 50 nmol/L i manje (tj. kada su oba jako niska), kao i kada su vrednosti triglicerida preko 3 mmol/L i vitamina D3 preko 180 nmol/L (tj. kada su obe vrednosti jako visoke). Primetno je da u uzorku postoje ekstremne vrednosti kalcijuma u urinu ali su one relativno retke. Grafik 27.



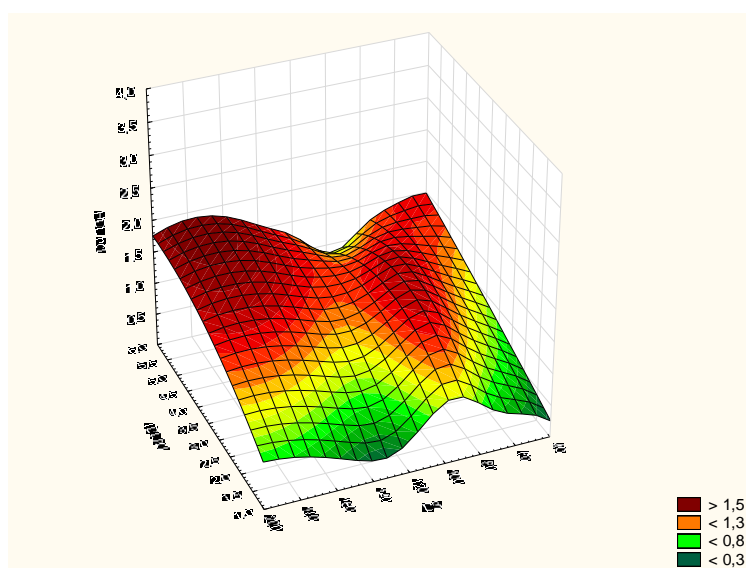
Graf. 27. Trodimenzionalni grafik kretanja vrednosti kalcijuma u urinu u zavisnosti od triglicerida i vitamina D3 u studijskoj grupi

Vrednosti kalcijuma u serumu u zavisnosti od uticaja vitamina D3 i alkalne fosfataze će biti na nivou referentnih vrednosti osim u slučajevima kada je vrednost alkalne fosfataze manja od 40 U/L a vrednost vitamina D3 veća od 160 nmol/L. Posmatrajući ceo uzorak zaključujemo da ekstremne vrednosti kalcijuma u serumu ima relativno mali broj bolesnika. Grafik 28.



Graf. 28. Trodimenzionalni grafik kretanja kalcijuma u serumu u zavisnosti od alkalne fosfataze i vitamina D3 u studijskoj grupi

Vrednost HDL-holesterola u zavisnosti od LDL-holesterola i vitamina D3 će se kretati u okviru referentnih vrednosti tj. $>1,3$ mmol/L pri visini LDL holesterola od 3,5 mmol/L i više i vrednosti vitamina D3 većoj od 60-150 nmol/L. Pomatrajući ceo uzorak zaključujemo da relativno visok procenat bolesnika ima zadovoljavajući nivo HDL-a uslovljeno primenom vitamina D3. Grafik 29.



Graf. 29. Trodimenzionalni grafik kretanja vrednosti HDL-holesterola serumu u zavisnosti od LDL-holesterola i vitamina D3 u studijskoj grupi

5. DISKUSIJA

Zastupljenost deficita vitamina D3 je mnogo veća kod bolesnika sa dijabetesnom bolesti tipa 2 nego u populaciji zdravih osoba (199). Bolesnici sa DM tipa 2 i deficitom vitamina D3 imaju veći rizik za razvoj dijabetesne nefropatije (200). Štaviše, deficit vitamina D3 se povećava sa progresijom dijabetesne nefropatije tako da je utvrđeno da se vrednosti serumskih 25(OH)D mogu posmatrati kao značajan inverzni prediktor progresije nefropatije (201). Vitamin D3 je sastavni deo procesa glukoznog metabolizma kroz uticaj na insulinsku sekreciju i senzitivnost (202). Druga parakrina delovanja, koja nisu vezana direktno za njegov klasičan uticaj na metabolizam kalcijuma i kostiju, ostvaruju se uticajem na vitamin D receptore (VDR), koji se ispoljavaju na različitim ćelijskim linijama i tkivnim strukturama, uključujući i pankreatične beta ćelije (203). Ove parakrine efekte vitamin D3 ostvaruje povećavajući nivo intracelularnog kalcijuma kao i transkripciju insulinskih receptora (204).

Povoljno delovanje na smanjenje proteinurije vitamin D3 ostvaruje direktnim i indirektnim mehanizmima. Direktno delovanje se ispoljava uticajem na nivou glomerula (mezigijumske ćelije i podociti) umanjnjem apoptoze i gubitka podocita (143, 144). Takođe, vitamin D3 inhibira proliferaciju mezigijumskih ćelija (148). U odnosu na tubulo-intersticijum vitamin D3 umanjuje ekspresiju fibronektina, kolagena I i kolagena III, i istovremeno u značajnoj meri obnavlja ekspresiju VDR-a (150).

Indirektni mehanizam povoljnog delovanja vitamina D3 kod dijabetesnih bolesnika se ispoljava putem smanjenja inflamacije što je veoma značajno budući da postoje pokazatelji koji ukazuju da je dijabetesna bolest stanje hronične inflamacije niskog stepena ili tzv. stanje "metaflamacije". "Metaflamacija" je forma sistemske i hronične inflamacije niskog stepena koja se javlja u metaboličkim oboljenjima (205). Pored inhibitornog efekta na dendritičke ćelije i makrofage vitamin D3 ima i direktni efekat na CD4+ T-ćelije u pojačanju Th2 ćelijskog odgovora, koji umiruje imuni odgovor (156). Vitamin D3 je moćan negativni endokrini regulator RAAS-a i deluje dominantno kao supresor biosinteze renina (163). Poznato je da vitamin D3 reguliše insulinsku senzitivost putem stimulacije ekspresije insulinskih receptora (166). Intracelularni kalcijum je ključni faktor periferne insulinske rezistencije. Smanjeni nivo kalcijuma dovodi do smanjene signalne transdukcije što rezultira smanjenom aktivnošću glikozog transporta (169). Vitamin D ostvaruje povoljno delovanje

na insulinsku senzitivnost povećavajući nivo intracelularnog kalcijuma kao i transkripciju insulinskih receptora (205).

Nivo vitamina D3 varira tokom godine u skladu sa promenama godišnjih doba. Njegove koncentracije u krvi su povezane sa izlaganjem delovanju UV svetlosti, takođe i sa nutritivnim unosom koji zavisi od dostupnosti različitih vrsta sezonski uslovljenih namirnica (206). Zbog ovih sezonskih varijacija koje su posebno izražene u umerenim klimatskim oblastima vitamin D3 dostiže najviše vrednosti u kasno leto i ranu jesen a najniže vrednosti u kasnu zimu i rano proleće (181).

Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi zastupljenost deficita vitamina D3 kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom sa posebnim osvrtom na uticaj sezonskih varijacija. Takođe i da se ispita postojanje drugih mehanizama njegovog povoljnog delovanja, kao što su anti-inflamatorno delovanje, uticaj na različite metaboličke pokazatelje kao što su pokazatelji glikoregulacije, lipidni parametri i pokazatelji bubrežne funkcije: veličina proteinurije i jačina glomerulske filtracije.

5.1. Prevalencija deficita vitamina D3 kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom

Kao što je navedeno kod bolesnika sa DM tipa 2 postoji povećana učestalost deficita vitamina D3 (199, 207). Takođe je utvrđeno da su niže vrednosti vitamina D3 u jakoj korelaciji sa većom prevalencijom mikrovaskularnih komplikacija kao što su nefropatija i retinopatija (209). Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio da se utvrdi zastupljenost nedostatka vitamina D3 kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom.

Prosečna vrednost vitamina D3 je na početku istraživanja kod svih ispitanika iznosila $45,1 \pm 15,6$ nmol/L. U istraživanju Majiti S i saradnika, vrednost vitamina D3 je bila $49,6 \pm 8,9$ nmol/L u grupi ispitanika starijih od 45 godina (209). Razlika u dobijenim vrednostima se može objasniti različitom starosnom strukturom ispitanika u istraživanjima.

Učestalost bolesnika sa nedostatkom vitamina D3 u ispitivanom uzorku od 109 bolesnika je bila 82,56%, dok je normalne vrednosti vitamina D3 imalo 17,43% ispitanika, od toga je bilo 10 (52,63%) muškaraca i 9 (47,36%) žena. Ovi rezultati su dobijeni na osnovu klasifikacije nivoa vitamina D3 na snižene i normalne vrednosti, koja je rađena prema tabeli Bollanda i sar. (Tabela 8.) modifikovanoj prema našim geografskim uslovima. Ova tabela

izražava donje normalne granične vrednosti vitamina D3 za svaki mesec tokom godine, posebno za muškarce i za žene.

Ovaj način klasifikacije deficita vitamina D3 nije uobičajen prilikom praćenja bolesnika. Bolji uvid u pogledu poređenja sa rezultatima drugih autora se može dobiti ukoliko se rezultati izraze na osnovu klasifikacije prema kojoj su normalne vrednosti vitamina D3 određene vrednostima >75 nmol/L, deficit vrednostima između 45 i 75 nmol/L a nedostatak vitamina D3 vrednostima < 45 nmol/L (210). Na osnovu ovog kriterijuma u našem uzorku je normalnu vrednost vitamina D3 imalo 18 (16,51 %) bolesnika, deficit je imalo 48 bolesnika (44,03%) i nedostatak je utvrđen kod 43 (39,44%) bolesnika.

Poznato je da je deficit vitamina D3 izraženiji kod dijabetesnih bolesnika nego u zdravoj populaciji. U ispitivanju Bayani MA i sar. među bolesnicima prosečne životne dobi $51,2 \pm 7,98$ godina srednja vrednost vitamina D3 je iznosila $46,75 \pm 25,5$ nmol/L, dok je u grupi zdravih ispitanika prosečne životne dobi $50,6 \pm 7,73$ godina srednja vrednost bila $61,5 \pm 33,75$. Među dijabetesnim bolesnicima je utvrđena vrednost vitamina D3 u referentnim granicama kod 10,3% bolesnika, deficit kod 64,2%, a nedostatak kod 25% (211). Razlika u zastupljenosti bolesnika sa deficitom i nedostatkom vitamina D3 između naše grupe bolesnika i grupe citiranog autora se može delimično objasniti razlikom u prosečnoj starosti dijabetesnih bolesnika uzimajući u obzir da se izraženost deficita vitamina D3 povećava sa starenjem (212), takođe i različitim klimatskim uslovima (panonsko-kontinentalna klima u Srbiji i planinsko kontinentalna klima u severnom Iranu) kao i načinom ishrane. Moguće je da je zbog blizine Kaspijskog jezera zastupljenost ribe u ishrani ovih stanovnika veća, dok je među našim stanovništvom ograničen unos masnog mesa, kao nutritivnog izvora vitamina D.

I neka druga istraživanja pokazuju rezultate koji su komparabilni sa našim rezultatima. U ispitivanju Aljabri SK. i saradnika kod bolesnika sa DN je nađena sledeća prevalencija statusa vitamina D: normalna vrednost je utvrđena kod 17% bolesnika, deficit kod 55,6% i nedostatak kod 27,3%. Prosečna starost bolesnika je bila $54,4 \pm 16,5$ godina (213). U našoj grupi starijih bolesnika je bio zastupljeniji nedostatak (39,44%) a manje je bio zastupljen deficit (44,03%) vitamina D3.

Budući da su bolesnici uključivani u studiju tokom cele godine tj. svih dvanaest meseci na mesečnom nivou, analizirana je razlika između odstupanja u nivou vitamina D kod bolesnika prilikom uključivanja u studiju do donje granične normalne vrednosti za svaki mesec u godini. Bolesnici su po vremenu uključivanja u studiju podeljeni na dva perioda: letnji i

zimski. Letnji period je definisan kao period od aprila do kraja septembra a zimski period od novembra do kraja marta. Nađena je statistički značajna razlika između vrednosti vitamina D3 u zimskom i letnjem periodu u studijskoj i kontrolnoj grupi zajedno ($n=90$), kao i u studijskoj grupi ispitanika ($n=45$), pri čemu je sniženje do normalnih vrednosti ovog vitamina bilo veće u letnjem periodu. U kontrolnoj grupi ($n=45$) je takođe utvrđena razlika izmerenih vrednosti vitamina D3 i donjih graničnih normalnih vrednosti, koja je izraženija leti, u odnosu na pol je izraženija kod muškaraca, ali ni jedna od dobijenih razlika nije statistički značajna. Naši rezultati ne odgovaraju rezultatima Carnevale V i sar. koji su utvrdili prisutvo deficita vitamina D3 kod 17,8% ispitanika u celom uzorku zimi i 2,2% ispitanika leti, dok je u žena deficit registrovan kod 27,85 ispitanica zimi i 3,4% leti. Kod muškaraca nije utvrđena razlika u učestalosti deficita vitamina D3 u letnjem i zimskom period (214). U navedenom istraživanju je postavljena jedinstvena granična vrednost za hipovitaminozu D3 koja je iznosila 75 nmol/L, a ispitanicima je određivan njegov nivo dva puta u toku godine, u februaru i avgustu. U istraživanje su bile uključene zdrave osobe mlađe životne dobi (muškarci prosečne starosti $39,4\pm 7,8$ i žene prosečne starosti $36,9\pm 6,4$ godina) koje verovatno imaju drugačije dijetalne navike i zastupljenije aktivnosti na otvorenom prostoru koje proizilaze iz dobrog zdravstvenog stanja. Poznato je da sinteza D vitamina u koži pod uticajem UV zraka značajno doprinosi njegovoj koncentraciji u letnjem periodu a sposobnost sinteze vitamina D se smanjuje sa starenjem (215).

U dosadašnjim istraživanjima je ukazano na postojanje razlike u nivou vitamina D3 kod žena i muškaraca. Definisane su i sezonski prilagođene donje granične referentne vrednosti vitamina D3 koje su različite kod muškaraca i žena (182). Ova razlika se objašnjava različitim BMI između polova (216), razlikama u životnim navikama i kulturološkim i religijskim faktorima koji su povezani sa izlaganjem sunčevoj svetlosti, fizičkim aktivnostima i primenom sredstava za zaštitu kože od oštećenja UV zracima (217). Takođe su od značaja i polno uslovljene razlike u metabolizmu vitamina D (218).

Kod naših bolesnika nije utvrđena razlika u nivou vitamina D3 u odnosu na pol, njegova srednja vrednost je kod uključenja u studiju bila za žene $42,78\pm 15,37$ a za muškarce $43,14\pm 15,1$ ($p=0,413$). Bolesnici su bili starije srednje životne dobi (muškarci= $64,98\pm 7,58$ i žene= $64,19\pm 7,05$ godina), i nije utvrđena razlika između srednjih vrednosti BMI kod muškaraca ($29,09\pm 4,0$) i žena ($30,07\pm 4,7$) $p=0,345$. Izlaganje sunčevoj svetlosti izraženo kroz aktivnosti u spoljnjem prostoru je smanjeno zbog životne dobi i pridruženih bolesti a

dijetalne navike u zimskom periodu omogućavaju značajniji nutritivni unos vitamina D što rezultira manjim deficitom vitamina D u zimskom nego letnjem periodu.

5.2. Uticaj primene holekaciferola na metaboličke parametre

Mehanizam povoljnog delovanja vitamina D se ostvaruje putem direktnog delovanja na povećanje insulinske sekrecije što se ostvaruje preko VDR-a na β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca (219). Drugi mehanizam delovanja je indirektni i ostvaruje se putem uticaja na homeostazu kalcijuma koji je zastupljen u mnogim mehanizmima glikoregulacije (220).

Istraživanja su ukazala da deficit vitamina D predstavlja rizik za nastanak DM tipa 2 (221). Deficit vitamina D je značajno veći u dijabetesnih bolesnika nego u zdravih subjekata (211). Izraženost deficita međutim nije povezan sa kontrolom glikemije, nije nađena razlika između deficita vitamina D u grupama bolesnika koji su imali dobru ($HbA1c \leq 7\%$) i lošu ($HbA1c > 7\%$) glikemijsku kontrolu (222). Postoje i istraživanja sa suprotnim rezultatima koja su pokazala da je deficit vitamina D značajno povezan sa glikemijskom kontrolom (223). Preventivna primena suplementacije sa 4000 i.j. vitamina D3 dnevno tokom 3 meseca kod bolesnika sa predijabetesom nije ispoljila povoljan efekat na HbA1c (224).

Ghavam S i sar. su utvrdili postojanje obrnutog linearnog odnosa između vitamina D i HbA1c ($p < 0,37$). U našem istraživanju je takođe nađena negativna povezanost između vitamina D3 i HbA1c pri uključenju i nakon suplementacije [$(r = -0,2)$ $p = 0,188$ i $(r = -0,0125)$ $p = 0,463$].

U istraživanju Buhary BM i sar. su dobijeni izrazito povoljni rezultati koji ukazuju na značajnu povezanost između vitamina D i HbA1c. Nađena je inverzna korelacija između 25(OH)D i HbA1c na početku istraživanja pre suplemetacije ($r = -0,14$, $p < 0,0000002$) koja se održala i nakon suplemetacije vitaminom D ($r = -0,16$, $p < 0,000001$). Štaviše, ona je bila zastupljena u sve tri podgrupe deficita vitamina D (grupa $D < 20$, grupa $\geq 20 < 50$, grupa $\geq 50 < 75$ nmol/L) s tim što je bila statistički značajna samo u grupi bolesnika sa najizraženijim deficitom vitamina D. Za vrednost vitamina D u grupi insuficijencije vitamina D srednja vrednost HbA1c je iznosila $85,3 \pm 7,5$ mmol/mol što su značajno veće vrednosti nego kod naših bolesnika (225). Kriterijum za uključenje u našu studiju je bio HbA1c < 53 mmol/mol što je uzeto kao granica vrednosti HbA1c u odnosu na rizik od nastanka mikrovaskularnih

komplikacija. U istraživanju Buhary BM i sar. su uključivani oboleli od DM tip 1 i DM tip 2 prosečne starosti $43,124 \pm 19,46$ godina, čiji je HbA1c nakon 9 meseci suplementacije bio $56,5 \pm 4,3$ mmol/mol (226). U našem istraživanju je nakon 6 meseci suplementacije HbA1c iznosio $48,83 \pm 5,5$ mmol/mol, dakle došlo je do blagog porasta vrednosti HbA1c.

U najnovijoj meta-analizi Wang Y i sar. efekat suplementacije je bio procenjivan u deset randomizovanih kliničkih studija koje su uključivale 692 bolesnika sa DN. Primena vitamina D3 je ispoljila povoljan efekat na 24h proteinuriju, na pokazatelje upale ali ne i na HbA1c. $p=0,84$. Isti efekat je postignut kod bolesnika koji su primali kalcitriol, alfacalcidol ili holekalciferol, pri čemu je značajno da prilikom primene kalcitriola nije bilo razlike u efektu u zavisnosti od primenjene doze: niska doza ($\leq 0,25$ mg/d) $p=0,70$, visoka doza ($>0,25$ mg/d) $p=0,84$ ili dužine suplementacije: kraća primena (2-3 meseca) $p=0,70$, ili duža primena (4-6 meseci) $p=0,84$ (227). S obzirom na ovako izraženu inkohherentnost u dobijenim rezultatima neophodne su nove studije koje će sveobuhvatno procenjivati efekat suplementacije vitaminom D na vrednosti HbA1c.

5.3. Uticaj primene holekaciferola na parametre inflamacije

Dijabetes je hronična sistemska bolest u čijem razvoju, progresiji i patogenezi komplikacija hronična inflamacija ima važnu ulogu (228). Imuni odgovor i metabolička regulacija su veoma integrisani u meri u kojoj je njihovo funkcionisanje međusobno zavisno. Disfunkcija ovog homeostatskog mehanizma može dovesti do metaboličkih poremećaja, kao što je DM tip 2 (229). Vitamin D kao imunomodulatorni agens ima signalnu ulogu u urođenom (antimikrobna aktivnost i antigena prezentacija) i adaptivnom imunom (T i B limfocitna funkcija) odgovoru. Ova interreakcija uključuje koordinisanu aktivnost vitamin D aktivacionog enzima 1α -hidroksilaze (CYP27B1) i vitamin D receptora (VDR) u posredovanju kod intrakrinih i parakrinih delovanja vitamina D (230).

Neutrofilno-limfocitni odnos (Neutrophil-to-lymphocyte ratio-NLR) i trombocitno-limfocitni odnos (platelet-to-lymphocyte ratio-PLR) kao i C-reaktivni protein (CRP) su indikatori inflamacije. DN je jedna od značajnih komplikacija dijabetesne bolesti i stoga je identifikacija markera za detekciju ranih stadijuma ovog oboljenja veoma značajna (231). Huang W. i sar. su ukazali da pored ostalih, povišene vrednosti NLR-a mogu biti pouzdan prediktivni marker za nastanak ranog stadijuma DN. Alsayyad MM. i sar. su procenjivali prognostičku vrednost limfocitno-monocitnog odnosa (lymphocyte to monocyte ratio-

LMR), NLR-a i PLR-a u bolesnika sa DN, poredeći ih međusobno. Dobijeni rezultati su pokazali da u predviđanju rizika za nastanak DN po pitanju specifičnosti, na prvom mestu je NLR a potom LMR i tek potom PLR, dok je po pitanju senzitivnosti nakon NLR-a slede PLR i LMR (232).

Naši rezultati pokazuju da je NLR kao marker inflamacije kod svih bolesnika na početku istraživanja bio $2,36 \pm 0,98$ a za PLR $121,77 \pm 42,24$ što pokazuje da su dobijeni rezultati povišeni u odnosu na normalne vrednosti kod zdrave populacije. Normalne vrednosti ovih parametara zavise od rase, životne dobi i pola i stoga se kao komparabilni uzorak ispitanika po navedenim karakteristikama može uzeti kontrolna grupa zdravih ispitanika u istraživanju Stojković Lalošević M. i sar. U tom ispitivanju su normalne vrednosti bile: za NLR $1,82 \pm 0,83$ i za PLR $97,51 \pm 31,67$ (233).

Vrednosti NLR-a su različite u odnosu na pol, kod žena životne dobi mlađe od 50 godina NLR ima više vrednosti nego za muškarce iste životne dobi, dok u grupi životne dobi starije od 50 godina, vrednosti su obrnute. Ove promene nastaju zbog izmenjenosti hematopoeze koja nastaje tokom menopauze. Povlačenje neutrofila iz kostne srži kao i odlaganje apoptoze su pod uticajem estrogena i progesterona. Smanjeno stvaranje ovih hormona dovodi do povećanja stope apoptoze neutrofila kao i do povećanog stvaranja limfocita. Postoje takođe, polne razlike u vrednosti PLR-a koje su veće kod žena nego muškaraca (234). Ova razlika može biti povezana sa većim brojem trombocita u žena (235). Kod starijih osoba smanjenje rezervi hematopoetskih ćelija dovodi do smanjenog stvaranja trombocita (236). Naši rezultati potvrđuju da su vrednosti NLR-a niže u žena ($2,18 \pm 0,72$) nego u muškaraca ($2,58 \pm 1,01$) kao što su i vrednosti PLR-a niže u žena ($118,59 \pm 57,51$) nego u muškaraca ($123,15 \pm 54,43$). Polne razlike u delovanju vitamina D3 u pogledu vrednosti parametara kojima se prate njegovi efekti pokazuju da je protektivno delovanje vitamina D3 veće u žena što ujedno može objasniti zašto su donje granične normalne vrednosti ovog vitamina niže u žena nego u muškaraca (181). (Tabela 1).

C-reaktivni protein se stvara u jetri i u kliničkoj primeni se koristi kao parametar inflamacije. Međutim, neki pokazatelji sugerišu da manji porast CRP-a ima negativne prognostičke implikacije. Naime, veći broj bolesti koje po tradicionalnim kriterijumima nisu inflamatorne prirode su povezane sa blago povišenim vrednostima CRP-a. Ova veza je utvrđena i kod insulinske rezistencije, metaboličkog sindroma i same dijabetesne bolesti (237).

Čak i u zdravoj populaciji manji porast vrednosti CRP-a može da ukaže na razvoj mnogih bolesti i na korelaciju sa lošijom prognozom. Klasična definicija inflamacije je odgovor na ozledu tkiva. Ozleda dovodi do distresnog stanja u ćeliji što predstavlja okidač za nastanak posledične inflamacije. Ovi događaji rezultiraju metaboličkim oštećenjem i lokalnim stvaranjem citokina. Tako gledajući manji porast CRP-a bi mogao da odražava oštećenje ćelije koje može nastati zbog širokog spektra uzroka koji ne moraju nužno biti zapaljenske prirode. Sa ovog aspekta vrednosti CRP-a manje od 3 mg/L predstavljaju stvarno normalne vrednosti, dok vrednosti veće od 10 mg/L ukazuju na klinički i prognostički značajno inflamatorno stanje (238).

Kod naših ispitanika je na početku studije srednja vrednost CRP-a bila u studijskoj grupi $6,45 \pm 7,95$ a u kontrolnoj grupi $3,6 \pm 4,37$ mg/L. Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima CRP-a u obe grupe bolesnika tokom praćenja. Najveća razlika je registrovana u studijskoj grupi između I i IV kontrole $t=1,663$ $p=0,104$, dok je u kontrolnoj grupi najveća razlika zabeležena između I i II kontrole $t=-0,893$ $p=0,376$. U studijskoj grupi je zabeležen kontinuirani pad u vrednostima CRP-a dok je u kontrolnoj grupi inicijalno došlo do blagog porasta vrednosti CRP-a. Slični rezultati su dobijeni i u odnosu na vrednosti sedimentacije. Ovakav nalaz ukazuje na delovanje D3 vitamina na smanjenje tkivnog distresa i bolju prognozu bolesti.

5.4. Uticaj primene holeciferola na lipidne parametre

Studija preseka na velikom broju ispitanika je ukazala na povezanost između visokih vrednosti 25(OH)D i niskih vrednosti ukupnog holesterola, LDL-holesterola, visokih vrednosti HDL-holesterola, kao i niskih triglicerida (239). Međutim, kada su urađena longitudinalna istraživanja nije potvrđeno da promena vrednosti 25(OH)D iz stanja deficijencije u suficijenciju ispoljava pozitivni efekat na lipidni profil, naime utvrđen je porast ukupnog i HDL-holesterola, bez promena u LDL-holesterolu i trigliceridima. Štaviše, u tom dvostruko slepom, placebo kontrolisanom istraživanju je u grupi bolesnika koji su primali preparate vitamina D nakon 4 nedelje registrovan porast LDL-holesterola kod (52% versus 36%) a nakon 8 nedelja kod (55% versus 37%) (240).

U našem istraživanju je u studijskoj grupi utvrđen porast vrednosti ukupnog holesterola ($5,37 \pm 1,19$ na početku i $5,39 \pm 1,15$ na kraju istraživanja) koji je bio veći u kontrolnoj grupi ($5,52 \pm 1,07$ na početku i $5,83 \pm 0,081$ na kraju praćenja); porast vrednosti HDL-holesterola koji je na granici statističke značajnosti $t = -1,95$ $p = 0,057 > 0,05$ u studijskoj grupi ($1,15 \pm 0,28$ na početku i $1,3 \pm 0,54$ na kraju praćenja), dok je u kontrolnoj grupi došlo do njegovog pada ($1,2 \pm 0,28$ na početku i $1,18 \pm 0,28$ na kraju). U studijskoj grupi nije zabeležena promena vrednosti LDL-holesterola ($3,45 \pm 1$ na početku i $3,45 \pm 0,99$ na kraju studije) dok je u kontrolnoj grupi došlo do porasta njegove vrednosti ($3,49 \pm 0,9$ na početku $3,77 \pm 0,3$ na kraju studije). Registrovano je smanjenje vrednosti triglicerida u studijskoj grupi ($2,13 \pm 1,4$ na početku i $1,77 \pm 0,3$ na kraju istraživanja) dok je u kontrolnoj grupi ($1,8 \pm 0,8$ na početku i $2,16 \pm 1,2$ na kraju praćenja) došlo do njegovog porasta. Ni u jednoj kategoriji promena nije ispoljila statističku značajnost. Dakle, naši rezultati se u potpunosti poklapaju sa rezultatima Ponda i sar. osim što je u našem istraživanju registrovano smanjenje triglicerida u grupi bolesnika koji su uzimali D3 vitamin.

Povezanost koja je nađena u studijama preseka između visokih vrednosti 25(OH)D i faktora rizika za kardiovaskularne bolesti uključujući i lipidni profil je verovatno posledica konfundirajućih faktora. Nesporan je značaj uticaja međusobne uzročnosti između visokog nivoa vitamina D i zdravlja, naime dobro zdravstveno stanje koje je povezano sa prediktorima kao što su krvni pritisak, glukoza u krvi, metabolizam i lipidni profil, omogućava više boravka u spoljnjem prostoru i veće izlaganje UV zracima (241).

Povoljan efekat u odnosu na lipide koji je registrovan u našem, kao i u nekim drugim istraživanjima se delom može objasniti postojanjem zajedničkih biosintetskih puteva. Vitamin D3 povećava intestinalnu absorpciju kalcijuma i samim tim povećava količinu sapuna formiranih od kalcijuma i masnih kiselina koji se izlučuju putem stolice. Povećani nivo kalcijuma redukuje formiranje i oslobađanje hepatskih triglicerida, dok u adipocitima $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibira lipolizu. Od značaja je povoljan uticaj vitamina D3 na glikozni metabolizam koji se ostvaruje putem povećanja insulinske sekrecije i senzitivnosti. Navedeni mehanizmi bi mogli biti odgovorni za porast triglicerida i smanjenje HDL-holesterola koji se viđa u stanjima deficita vitamina D3 (242).

Do sada je, prema literaturi, urađeno nekoliko istraživanja koja su ispitivala uticaj korekcije nivoa vitamina D na lipidni profil kod dijabetesnih bolesnika i dobijeni su nekonzistentni rezultati. U ispitivanju Jorde i sar. primenom holekaciferola nije postignuta

modifikacija u praćenim lipidnim parametrima (ukupni holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol i trigliceridi) (243). U istraživanju Talei i sar. primena 50.000 i.j. holekalciferola nedeljno i Sadiya i sar. primena 6.000 i.j. dnevno nije imala uticaja na lipidni profil (244, 245). U studiji Ramiro-Lozano i sar. je nađena statistički značajna redukcija nivoa ukupnog holesterola i nesignifikantni trend smanjenja vrednosti LDL-holesterola, non-HDL holesterola i triglicerida i bez promene u vrednosti HDL-holesterola (246). Rezultati našeg istraživanja delimično odgovaraju rezultatima poslednjeg navedenog ispitivanja kod dijabetesnih bolesnika. Velika nekonzistentnost u dobijenim rezultatima ukazuje na značajan uticaj konfauding faktora i potrebu za dodatnim istraživanjima koja bi imala za cilj da ih definišu.

U istraživanju Kane L i sar. je ukazano na jedan od mogućih faktora koji utiču na promenu pojedinih vrednosti lipidnog profila prilikom primene vitamina D. Naime, zapaženo je da prilikom kombinovane primene atorvastatina i vitamina D vrednost ukupnog holesterola i LDL-holesterola je bila niža, čak i prilikom primene nižih doza atorvastatina. Vitamin D3 je u grupi bolesnika koji su uzimali atorvastatin snizio ukupni holesterol za 12% ($p=0,06$) i LDL-holesterol za 14% ($p=0,05$) u odnosu na placebo. Prilikom istraživanja potencijalnih mehanizma koji bi bili u osnovi ove pojave korišćeni su surogat serumski marker za apsorpciju holesterola u crevima (kampesterol) i endogenu biosintezu holesteola (lantosterol). Koncentracije kampesterola su bile niže nakon primene vitamina D3 u grupi bolesnika koji su primali i preparate statina (od $0,710\pm 0,41$ do $0,582\pm 0,31$) dok su bile nepromenjene u placebo grupi ($0,408\pm 0,186$ i $0,408\pm 0,173$) $p=0,05$. U grupi bolesnika koji su primali vitamin D3 ali bez statina lantosterol je bio više koncentracije nego u placebo grupi ($p=0,001$). Potencijalno objašnjenje ove pojave je u direktnom uticaju vitamina D3 ili njegovih metabolita na metabolizam holesterola, tj. na smanjene resorpcije i/ili endogene sinteze holesteola. Međutim, izostanak efekta vitamina D na snižavanje holesterola bez istovremene primene statina ukazuje da pod njegovim uticajem ne postoji klinički relevantna inhibicija HMG-CoA reduktaze ili biotransformacija holesterola. Dakle, samo istovremena primena vitamina D3 i statina međusobnom interreakcijom u metabolizmu holesterola dovodi do povoljnog efekta u odnosu na ukupni holesterol i LDL-holesterol (247).

U studijskoj grupi naših ispitanika koji su pored holekalciferola primali i preparate statina je registrovana veća razlika u vrednosti ukupnog holesterola u podgrupi bolesnika koji nisu uzimali statine $t=-0,970$ $p=0,34$ nego u podgrupi bolesnika koji su ih koristili $t=0,629$ $p=0,437$ s tim što je u grupi bolesnika bez statina došlo do porasta vrednosti holesterola

(5,22±1,09 i 5,42±1,089) a u grupi sa statinima do njegovog smanjena (5,254±1,44 i 5,36±1,32).

U kontrolnoj grupi ispitanika u podgrupi bolesnika koji su uzimali preparate statina i onoj u kojoj nisu, registrovana je veća razlika vrednosti ukupnog holesterola između vrednosti na početku i na kraju praćenja u podgrupi bolesnika koji nisu uzimali statine $t=1,673$ $p=0,106$ nego u podgrupi bolesnika koji su ih koristili $t=-0,797$ $p=0,437$ s tim što je u obe podgrupe došlo do porasta vrednosti holesterola u serumu tj. veći porast holesterola je bio u podgrupi bolesnika koji nisu uzimali statinske preparate (5,6±1,21 i 5,8±1,34 vs 5,24±0,91 i 5,59±1,58).

U studijskoj grupi bolesnika koji su bili podeljeni na podgrupe bolesnika koji su uzimali preparate statina i one koji nisu, registrovana je veća razlika u vrednosti LDL-holesterola na početku i na kraju praćenja, u podgrupi bolesnika koji su uzimali statine $t=1,073$ $p=0,301$ nego u podgrupi bolesnika koji su ih nisu koristili $t=-0,565$ $p=0,577$ s tim što je u podgrupi bolesnika bez statina došlo do porasta vrednosti LDL-holesterola (3,35±0,91 i 3,44±0,88) dok je u podgrupi sa statinima došlo do njegovog smanjena (3,6±1,16 i 3,34±1,18).

U kontrolnoj grupi bolesnika koji su bili podeljeni na podgrupe bolesnika koji su uzimali preparate statina i one koji nisu, registrovana je veća razlika između vrednosti LDL-holesterola na početku i na kraju istraživanja u podgrupi bolesnika koji su uzimali statine $t=0,723$ $p=0,483$ nego u podgrupi bolesnika koji su ih nisu koristili $t=-1,803$ $p=0,083$ s tim što je u obe grupe bolesnika došlo do porasta vrednosti LDL-holesterola koji je bio veći u grupi bolesnika bez primene preparata statina (3,59±1,03 i 3,89±1,2 vs 3,29±0,58 i 3,54±1,5).

5.5. Uticaj primene holekaciferola na parametre koštanog metabolizma

U stanjima deficita vitamina D3 inicijalni kompenzatorni mehanizam je povišena sekrecija paratireoidnog hormona - PTH koja stimuliše bubrege na povećano izlučivanje fosfata i smanjeno izlučivanje kalcijuma. Kod naših bolesnika je u kontrolnoj grupi registrovano statistički značajno smanjenje nivoa fosfata tokom praćenja dok je u studijskoj grupi bolesnika koji su uzimali vitamin D nivo fosfata bio bez značajnosti razlike, ali sa tendencijom porasta. Deficit vitamina D3 smanjuje intestinalnu absorpciju kalcijuma za 15%-30% što povećava nivo serumskog PTH (248). Nivo kalcijuma u krvi dugo ostaje normalan

sve do najtežih stadijuma deficita vitamina D. Alkalna fosfataza koja je značajna za formiranje i mineralizaciju kosti, je obično povišena kao odgovor na delovanje PTH-a koji dovodi do stimulacije osteoblastne aktivnosti. Kombinacija normalne vrednosti kalcijuma u serumu, sniženih fosfata i povišene alkalne fosfataze može ukazivati na poremećen metabolizam vitamina D. Deficit vitamina D je međutim, najčešće povezan sa normalnim vrednostima kalcijuma i fosfata u serumu, visoko normalnim ili povišenim vrednostima PTH, normalnim ili povišenim vrednostima alkalne fosfataze i niskim 24h izlučivanjem kalcijuma u urinu. Izuzetno se hipokalcemija i hipofosfatemija viđa kod bolesnika sa izraženim i dugotrajnim deficitom vitamina D (249). Upravo zbog toga ovi klinički parametri (kalcijum, fosfat i alkalna fosfataza) sami po sebi nemaju potrebnu senzitivnost za detekciju umerenog deficita vitamina D (250). Kod naših bolesnika koji su uzimali preparat holekalciferola kalcijum i fosfat u serumu rastu kao znak porasta vrednosti vitamina D dok se registruje pad vrednosti alkalne fosfataze kao izraz supresije tj. normalizacije prethodno povišenih vrednosti PTH. Heaney i sar. su utvrdili da se maksimalna absorpcija kalcijuma u bubrezima kod muškaraca događa kada su vrednosti 25(OH)D 70 do 90 nmol/L koje inače predstavljaju graničnu vrednost za početak supresije PTH (251).

Vrednosti alkalne fosfataze kod naših 90 bolesnika su na uključenju u istraživanje iznosile $72,08 \pm 32,43$ U/L dok je kod 111 bolesnika u istraživanju Shaheen S. i sar. prosečna vrednost alkalne fosfataze kod svih ispitanika bila u referentnim vrednostima i iznosila je $135,97 \pm 68,141$ U/L. Najizraženiji porast vrednosti alkalne fosfataze je bio utvrđen u grupi bolesnika sa umerenim deficitom vitamina D te je zaključeno da alkalna fosfataza ne može da se koristi kao screening test za isključenje deficita vitamina D (251). U istraživanju Leaf ED i sar. u kojoj je primenjivano 50.000 i.j./ergokalciferola nedeljno nije registrovana promena u vrednostima kalciurije ($6,4 \pm 1,3$ i $6,37 \pm 2,2$) na početku i na kraju praćenja. Izdvojena je manja podgrupa bolesnika (10%) koja je ispoljila porast kalciurije veći od 5 mmol/du, kod koje je registrovan i značajan porast u izlučivanja natrijuma u urinu (252).

U istraživanju Penniston LK i sar. u kojem je kod postmenopauzalnih žena primenjivana takođe doza od 50.000 i.j. ergocalciferola dnevno tokom 15 dana nije registrovan porast vrednosti kalciurije, štaviše kod četiri ispitanice koje su pri uključenju u ispitivanje imale vrednosti kalciurije veće od 6,5 mmol/l koja je bila određena kao cut-off vrednost rizika za formiranje kamena, replacijom D vitamina je postignuto smanjenje vrednosti kalciurije (253).

Prilikom uključenja u naše istraživanje svi bolesnici koji su zadovoljavali kriterijume za uključenje a kod kojih je registrovana vrednost kalciurije iznad granične vrednosti od 7,5 mmol/du su svrstani u kontrolnu grupu radi izbegavanja rizika od porasta kalciurije tokom primene vitamina D. Mehanizam kojim suplementi vitamina D potencijalno povećavaju rizik od hiperkalciurije nije u potpunosti razjašnjen. Iako postoje podaci koji ukazuju da suplementi vitamina D povećavaju rizik od hiperkcemije povećavajući absorpciju kalcijuma u crevima epizode hiperkalciurije nisu u korelaciji sa hiperkalcemijom (254).

U istraživanju Maryam T i sar. je registrovan porast kalciurije od 3,74 do 5,7 mmol/du, dok je u našem istraživanju nakon inicijalnog porasta vrednosti kalciurije sa 3,34 na 4,5 mmol/du registrovana stagnacija njegovih vrednosti sa blagim padom do kraja praćenja (255). U istraživanju navedenog autora je zaključeno da i pored porasta kalciurije prilikom suplemetacije sa vitaminom D registrovani porast nije bio u korelaciji sa porastom vrednosti D vitamina niti promenama vrednosti PTH. Ukazano je da drugi, prevashodno dijetalni faktori mogu biti povezani sa hiperkalciurijom. Tako je u 24h urinu je registrovan značajan porast vrednosti izlučene uree zbog povećanog unosa proteina, Na i sukroze, takođe je nađen i porast CaOxSS i CaPSS koji nije imao statističku značajnost a ukazuje na rizik od formiranja kamena (254).

Nivo PTH je povećan kod bolesnika sa deficitom vitamina D dok se tokom suplemetacije ovim vitaminom očekuje smanjenje nivoa PTH. Smanjenje serumskog PTH bi mogao da dovede da porasta urinarnog kalcijuma zbog smanjenja resorpcije kalcijuma u renalnim tubulima (255).

Izostanak očekivane korelacije između porasta kalcijuma u serumu i urinu prilikom suplemetacije vitaminom D se može objasniti na dva načina. Najpre, čvrsto regulisna konverzija 25(OH)D u 1,25(OH)₂D pod delovanjem 25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilaze (CYP27B1) ograničava sintezu aktivne forme vitamina D₃ i na taj način prevenira prekomernu intestinalnu resorpciju kalcijuma. Potom, povećana reabsorpcija kalcijuma u crevima neće rezultirati porastom kalciurije zbog dodatnog deponovanja kalcijuma u kostima u cilju obnavljanja njihovog mineralnog sadržaja (256). U istraživanju Leafa i sar. nije registrovan očekivani pad u vrednosti PTH što objašnjava, delom izostanak značajnijeg porasta kalciurije, budući da su poznati efekti PTH na smanjenje izlučivanja kalcijuma putem urina (257).

Iako dugotrajna suplemetacija vitaminom D povećava rizik od nastanka hiperkalcemije i hiperkalciurije, nije utvrđeno da se povećava i rizik od formiranja kamena u bubregu (254). Rizik se povećava samo u podgrupi bolesnika kod kojih je istovremeno povećan i unos kalcijuma u kombinovanim prepatima sa vitaminom D. Postoje osobe koje imaju predispoziciju za formiranje kamena u mokraćnim putevima a koje su verovatno sklone povećanoj transformaciji 25(OH)D u klacitriol, sa istovremeno smanjenjem kapacitetom za njegovu razgradnju, ili su pak u pitanju osobe koje imaju “senzitivniji” signalni sistem vitamina D (257).

5.6. Uticaj primene holekaciferola na parametre bubrežne funkcije

U mnogim studijama je prepoznata renoprotektivna uloga vitamina D. Od posebnog je značaja njegova primena kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom (176, 178). Očekuje se da vitamin D svojim delovanjem može da uspori progresiju DN. Smanjenje albuminurije se smatra za važan prediktivni faktor u pogledu budućeg ishoda bubrežne funkcije (226). Meta-analiza Zhao J i sar. je pokazala da vitamin D₃ umanjuje proteinuriju i da štiti bolesnike sa DN od oštećenja bubrega, nezavisno od regulacije arterijske tenzije i glikemije (258), za razliku od druge meta-analize Derakhshanian H i sar. koja to ne potvrđuje (259).

Meta-analiza Wang Y i sar. nije utvrdila da primena suplementacije vitaminom D smanjuje kreatinemiju ili povećava JGF (201). Takođe i u nekim drugim istraživanjima je došlo do smanjenja albuminurije iako nije istovremeno došlo do promene u JGF (260). S obzirom da redukcija proteinurije nije praćena poboljšanjem bubrežne funkcije, moguće je da su neki drugi faktori rizika kao što su glikemija, krvni pritisak i profil lipida u korelaciji sa smanjenjem bubrežne funkcije.

U našoj studiji nije utvrđena značajna razlika u vrednostima jačine glomerulske filtracije-JGF između kontrola. U obe grupe je registrovano blago snižavanje vrednosti JGF tokom istraživanja koje ne pokazuje statistički značajnu razliku između kontrola, mada je razlika vrednosti JGF na početku i na kraju studije bila veća u studijskoj grupi ($t=1,81$, $p=0,077$) nego u kontrolnoj grupi ($t=1,641$ $p=0,108$).

Takođe, nije nađena značajna korelacija JGF sa praćenim parametrima osim sa kalcijumom u urinu. Utvrđen je pozitivan korelacioni trend sa albuminima i vitaminom D₃ u serumu kao i sa INDART-om, veoma niske korelacione jačine, i negativan korelacioni trend

sa HbA1c $r=0,295$, sa trigliceridima $r=0,205$, sa ukupnim holesterolom $r=0,231$, sa LDL-holesterolom $r=0,282$ i 24h-proteinurijom $r=0,065$. Tabela 14.

Iako su do sada rađena istraživanja koja su ispitivala uticaj visokih i niskih doza vitamina D, naš cilj je bio da se odredi delotvornost primene niskih doza holekaciferola na proteinuriju kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom. Budući da je istraživanje rađeno kod bolesnika koji su se kontrolisali u ambulanti za dijabetes i nefrologiju nije očekivano da bi primenom nižih doza moglo doći do pojave ozbiljnijih nusfekata ove terapije, što je od značaja za njegovu eventualnu dugotrajniju primenu.

Poznato je iz ranije objavljenih istraživanja da se prilikom kratkotrajnije primene nižih doza vitamina D3 postižu komparabilni rezultati sa onim koji su dobijeni prilikom primene visokih doza vitamina D3. Sprovedena su istraživanja sa značajno manjim dozama vitamina D3 (holekaciferol 800 jed./dan i kalcitirol 0,5 µg/dan) tokom 8 i 24 nedelja, a čiji su rezultati bili komparabilni sa onima koji su dobijeni primenom visokih doza ovih preparata (176, 177).

U istraživanju Bonakdarana i sar. u kojem su bolesnici sa deficitom vitamina D3 primali u terapiji klacitriol od 0,5 µg u trajanju od 8 nedelja je utvrđen povoljan efekat delovanja preparata na stopu albuminske ekskrecije (albumin excretion Rate –AER) koji nije bio statistički značajan $p=0,22$. Međutim nađena je značajna korelacija između 25(OH)D i mikroalbuminurije ($p=0,04$) u bolesnika sa deficitom vitamin D (176).

U istraživanju Huang Y. i sar. primenjivana je fiksna doza holekalciferola od 800 i.j. dnevno tokom 6 meseci. Postignuto je signifikantno sniženje vrednosti mikroalbuminurije u ranom stadijumu primenjene terapije, pri čemu je tokom daljeg praćenja došlo do gubitka ovog pozitivnog efekta. Najizraženije smanjenje proteinurije je postignuto tokom drugog meseca primene holekalciferola. ACR se smanjio sa 97,39 mg/g (62,43–476,70) na 71,65 mg/g (40,40–469,98) u drugom mesecu praćenja bolesnika ($p=0,01$) da bi nakon toga došlo do njegovog porasta na 120,36 mg/g (33,89–695,26) ($p=0,239$) na kraju istraživanja (177).

Kod naših bolesnika je praćena 24-h proteinurija koja je inicijalno bila veća od 0,15 gr dnevno što je korišćeno kao kriterijum za postojanje dijabetesne nefropatije. U oba istraživanja su praćeni parametri na svaka dva meseca tako je komparabilan trend kretanja dobijenih rezultata.

U našem istraživanju je tokom kontrola u studijskoj grupi registrovan kontinuirani pad 24h proteinurije koji je bio značajan između I i IV kontrole $t=2,670$, $p=0,011$ tj. između

vrednosti na početku i na kraju istraživanja. U kontrolnoj grupi je registrovan porast proteinurije bez statističke značajnosti između kontrola. Sličan rezultat je odnosu na kontrolnu grupu dobijen i u studiji Huang Y. i sar. (177).

U istraživanju Kim MJ. i sar. (178) bolesnici su bili lečeni različitim režimima i preparatima vitamina D3 u dozi koja je bila zavisna od njegovih inicijalnih vrednosti, ali je kod svih ispitanika postignut značajan porast vitamina D3 [25(OH)D i 1,25(OH)₂D] u serumu. 82% bolesnika je postiglo suficijentan nivo 25(OH)D nakon 2 meseca i 78% nakon 4 meseca suplemencije (smanjenje % bolesnika koji su imali suficijetni nivo vitamina D). I u ovom istraživanju je najznačajnije sniženje urinarno-albuminsko kreatininskog odnosa (urin albumin creatinin ratio-uACR) postignuto nakon 2 meseca (sa 16,4 mg/mmol (9,7–27,4) na 12,2 mg/mmol (7,1–20,7) ($p=0,0011$), uz dalje minimalno sniženje u četvrtom mesecu na 12 mg/mmol (7,0–20,8) ($p=0,0201$ vs bazalne vrednosti) (179).

U našem istraživanju je takođe uočeno najveće smanjenje 24h proteinurije nakon 2 meseca $p=0,187$, koje se daljim kontrolama značajno manje (između II i III kontrole $p=0,694$ i između III i IV kontrole $p=0,59$).

Na osnovu svih navedenih rezultata se čini da je antiproteinurički efekat vitamina D3 najveći tokom prvih meseci tretmana i on se potom smanjuje. Moguće je da se efekat delovanja smanjuje zbog značajnije aktivacije kontraregulatornih mehanizama, pre svega 24-hidroksilaze. Izgleda da se nakon određenog porasta vrednosti 25(OH)D aktivacija 24-hidroksilaze značajno povećava uzrokujući pojačanu deaktivaciju aktivog vitamina D3 (262). Drugo moguće objašnjenje ovog fenomena je u pojačanom stvaranju proteina koji vezuje vitamin D (vitamin D binding protein-VDBP) koji ima ulogu u održavanju nivoa slobodnog (nevezanog) vitamina D koji je na raspolaganju specifičnim tkivima i ćelijama (179).

U kompleksnim višestrukim regresionim modelima uticaj vitamina D3 na proteine u 24h urinu se ispoljava kao rezultat interrekcije sa ostalim nezavisnim varijablama u modelu kao što su HbA1C, ukupni holesterol, trigliceridi, HDL-holesterol i LDL-holesterol što nas dovodi do zaključka da on deluje stabilizirajuće na proteinuriju ali do određene granice. Model daje granične vrednosti proteina u 24h urinu od 0,15 g/du koje su odrednica za postojanje dijabetesne nefropatije, pri nižim vrednostima ostalih varijabli kao i vrednostima vitamina D3 minimalno od 60 nmol/L. Doziranje vitamina D3 preko ove granice a uz povišene vrednosti ostalih varijabli u modelu dovodi do porasta vrednosti proteinurije preko navedene granične vrednosti. Da bi model dao optimalnu vrednost proteinurije <0,15 g/du

potrebno je da ostale nezavisne varijable budu ispod vrednosti koje su bile registrovane u studijskoj grupi. U tom slučaju se može postići doziranje vitamina D3 u meri koja omogućava njegove vrednosti u krvi i do 100 nmol/L. U modelu se vidi da je od posebnog značaja snižavanje vrednosti LDL-holesterola.

Iz dobijenih višestrukih regresionih modela i za muškarce i žene zaključujemo da vitamin D3 kod žena ima uticaj koji nije statistički značajan ali je pozitivan i povoljno deluje na vrednost proteina u 24h urinu. Za razliku od ženskog dela populacije kod muškaraca uticaj vitamina D3 na proteine u 24h urinu je mnogo manji. Projektovana vrednost proteina u 24h urinu kod muškaraca je na nivou referentnih vrednosti tj. do graničnih vrednosti od 0,150 g/du koje definišu dijabetesnu nefropatiju, bez nezavisne varijable vitamina D3 u posmatranom modelu. Kod žena takav model je davao izuzetno visoku vrednost proteina u 24h urinu od 0,628 g/du što je neprihvatljivo. Korigovanjem modela dobili smo značajno umanjenje vrednosti proteina u 24h urinu (za 24%) ali ni ta vrednost se nije kretala u referentnim granicama. Formiranjem novog regresionog modela i korekcijom nezavisnih varijabli na nivo između minimalnih i prosečnih, dobijeni rezultati su zadovoljni graničnu vrednost proteina u 24h urinu od 0,150 g/du koja je postavljena za definisanje postojanja DN.

Kada se primenjuju konstatne doze vitamina D u cilju korekcije njegovog nivoa u organizmu, odgovor organizma na osnovu praćenih parametara se ponaša prema zakonima normalne raspodele (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk test za normalnost distribucije), što predstavlja analogiju sa prirodnim kretanjem referentnih vrednosti za ovaj vitamin tokom godine (Tabela 7). Upravo zbog ovog smanjenja delovanja tokom kontinuirane primene preporučujemo ili povećanje doze uz praćenje pojave znakova predoziranja, ili njegovu intermitentnu primenu. Prema našim rezultatima, period delovanja traje oko 4 meseca, što bi ujedno i predstavljao predloženi interval primene vitamina D.

6. ZAKLJUČCI

- Zastupljenost bolesnika sa deficitom vitamina D3 u ispitivanom uzorku od 109 bolesnika je bila 82,56%, dok je normalne vrednosti vitamina D3 imalo 17,43% ispitanika. Ovi rezultati su dobijeni na osnovu klasifikacije nivoa vitamina D3 na snižene i normalne vrednosti, koja je rađena prema tabeli koja izražava donje normalne granične vrednosti vitamina D3 za svaki mesec tokom godine, za muškarce i žene.
- Kada se dobijeni rezultati izraze na osnovu klasifikacije prema kojoj su normalne vrednosti vitamina D3 određene vrednostima >75 nmol/L, deficit - vrednostima između 45 i 75 nmol/L, a nedostatak vitamina D3 vrednostima <45 nmol/L, normalnu vrednost vitamina D3 imalo 18 (16,51%) bolesnika, deficit 48 bolesnika (44,03%) i nedostatak je utvrđen kod 43 (39,44%) bolesnika.
- Odstupanje od graničnih vrednosti vitamina D3 je izraženije u letnjem periodu u odnosu na zimski period, nađena razlika je bila statistički značajna u celom uzorku ispitanika kao i u studijskoj grupi.
- Ne postoji razlika u vrednostima vitamina D3 dobijenim prilikom uključenja u istraživanje između muškaraca i žena, ali je kod muškaraca utvrđeno veće odstupanje od graničnih vrednosti u letnjem periodu u odnosu na zimski period.
- Utvrđen je porast HbA1c koji je bio veći u kontrolnoj grupi ispitanika, dok je nađena negativna povezanost između vitamina D3 i HbA1c pri uključenju u istraživanje i nakon suplementacije.
- Suplementacija vitaminom D3 je imala povoljan efekat na lipidni profil. Registrovan je porast vrednosti ukupnog holesterola koji je bio izraženiji u kontrolnoj grupi, pad vrednosti triglicerida u grupi bolesnika koji su uzimali vitamin D3 i njihov porast u kontrolnoj grupi ispitanika. U studijskoj grupi je registrovan porast vrednosti HDL-holesterola koji je bio na granici statističke značajnosti dok je istovremeno nađeno njegovo smanjenje u kontrolnoj grupi. Vrednost LDL holesterola je ostala bez promene pod delovanjem vitamina D3, dok je u kontrolnoj grupi došlo do njegovog porasta.
- Primenom vitamina D3 se postiže smanjenje faktora za procenu rizika od kardiovaskularnih bolesti. Vrednosti Faktora Rizika–FAKRIZ-a (non HDL tj. ukupni

holesterol /HDL holesterol) su smanjene u studijskoj grupi, dok je u kontrolnoj grupi došlo do granično značajnog porasta. U studijskoj grupi je došlo do sniženja vrednosti indexa ateroskleroze-INDART-a (LDL/HDL holesterol), dok je u kontrolnoj grupi utvrđen njegov porast. Ni jedna od ovih promena nije bila statistički značajna.

- Registrovan je pad vrednosti ukupnog holesterola i LDL-holesterola kod bolesnika koji su istovremeno sa primenom vitamina D3 koristili i preparate statina. U grupi bolesnika koji su koristili preparat vitamina D3 a nisu koristili preparate statina je došlo do porasta njihovih vrednosti.
- Primenom vitamina D3 je došlo do signifikatnog smanjenja proteinurije, dok je istovremeno u kontrolnoj grupi zabeležen njen porast, što potvrđuje njegov povoljan uticaj na očuvanje glomerula. Međutim, višestruki regresioni modeli ukazuju da se uticaj vitamina D3 na proteinuriju ispoljava kao rezultat interrekcije sa ostalim metaboličkim varijablama iz čega se zaključuje da on deluje stabilizirajuće na proteinuriju, ali do određene granice. Optimalno dejstvo na proteinuriju pri projektovanom nivou vitamina D3 od 100 nmo/L se može postići ukoliko su ostali metabolički parametri dobro kontrolisani i to ispod vrednosti koje su registrovane kod naših bolesnika.
- Vitamin D3 ima povoljan uticaj na proteinuriju kod žena, dok je kod muškaraca njegovo delovanje slabije izraženo.
- Primena vitamina D3 ne dovodi do značajnog sniženja JGF.
- Utvrđeno je snižavanje vrednosti sedimentacije, CRP-a i fibrinogena koje je bilo bez statističke značajnosti.
- Ustanovljeno je kontinuirano pozitivno delovanje vitamina D3 na neutrofilno-limfocitni odnos - NLR i efekat delovanja na trombocitno-limfocitni odnos -PLR kao nove markere inflamacije.
- Vrednosti alkalne fosfataze se značajno smanjuju tokom šestomesečne primene holekalciferola verovatno kao izraz normalizacije vrednosti PTH. Bezbednosni profil vrednosti kalcijuma u serumu i urinu tokom dugotrajnije primene je dobar, utvrđeno je blago smanjenje kalciurije tokom terapije.
- Na osnovu svih rezultata se zapaža da je antiproteinurički i antiinflamatorni efekat vitamina D3 najveći tokom prvih meseci lečenja i da se on potom smanjuje.

Korekcija deficita vitamina D3 kod bolesnika sa dijabetesnom nefopatijom se preporučuje zbog višestrukog povoljnog delovanja koje uključuje smanjenje proteinurije, anti-inflamatorno delovanje i pozitivno dejstvo na lipidni profil. Njegova dugotrajna primena u odnosu na koštani metabolizam je bezbedna i povoljna. Budući da se antiproteinurični i anti-inflamatorni efekat smanjuju tokom vremena, preporučujemo da se razmotri njegova intermitetna primena i to u intervalima od 4 meseca. Procena o periodima njegove primene i pauze u suplemetaciji se donosi na osnovu navika bolesnika u pogledu režima ishrane i izlaganja UV zracima.

7. LITERATURA

1. Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, Urashima M. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes* 2016;7(5):89-100.
2. Verroust PJ, Birn H, Nielsen R, Kozyraki R, Christensen EI. The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int* 2002;62:745–56.
3. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:641–49.
4. Obi Y, Hamano T, Isaka Y. Prevalence and Prognostic Implications of Vitamin D Deficiency in Chronic Kidney Disease. *Disease Markers* 2015.1-9. 10.1155/2015/868961.
5. Peng Q, Yang S, Lao X, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in VDR and DBP genes with HBV-related hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. *PLoS One* 2014;9(12):e116026.
6. Powe C.E, Evans M.K, Wenger J.et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med* 2013;369(21):1991–2000.
7. Bhan I, Powe C.E, Berg A.H, et al. Bioavailable vitamin D is more tightly linked to mineral metabolism than total vitamin D in incident hemodialysis patients. *Kidney International* 2012;82(1):84–9.
8. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev* 2016;96:365–408.
9. Orlov I, Rochel N, Moras D, Klaholz B.P. Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO J* 2012;31:291–300.
10. Sutton L.M.A, MacDonald. N.P. Vitamin D: More Than a “Bone-a-Fide” Hormone. *MolEndocrinol* 2003;17(5):777–9.

11. Wan L.Y, Zhang Y.Q, Chen M.D, Liu C.B. et al. Relationship of structure and function of DNA-binding domain in vitamin D receptor. *Molecules* 2015;20:12389–99.
12. Zheng J, Chang M.R, Stites E.Y, Yong Wang Y, et al. HDX reveals the conformational dynamics of DNA sequence specific VDR co-activator interactions. *Nature Communications* volume 8, Article number: 923 (2017) Cited 2018.dec.24th, Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-00978-7>.
13. Burris T.P. et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol* 2013;65:710–78.
14. Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* 2000;5(1):173–9.
15. Pike W.J, Meyer B.M. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinol MetabClin North Am* 2010;39(2): 255–69.
16. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, et al.. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;17;296(5571):1313–6.
17. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2004;92(3):436–44.
18. Demay M, MacDonald P, Skorija K, Dowd D, et al. Role of the vitamin D receptor in hair follicle biology. *J Steroid BiochemMol Biol* 2007;103(3–5):344–6.
19. Adorini L. Regulation of immune responses by vitamin D receptor ligands. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, editors. *Vitamin D. 2.* New York: Elsevier/Academic Press; 2005;631–48.
20. Sakharkar P, Deb S, Vu D. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism: Implications on Non-Bone Diseases. *J Basic ClinPharma* 2017;8:6-10.
21. Schuch NJ, Garcia VC, Vívolo SRGF, Martini LA. Relationship between Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *Nutr J* 2013;12:96.
22. Baig S, Moatter T. Vitamin D is Not Just About Healthy Bones Anymore. *J Coll Physicians Surg Pak* 2010;20(6):355-6.

23. Bikle D. Extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its health implications. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2009;7(2):114–125.
24. Persson F, Rossing P. Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective. *Kidney Int* 2018;8(1):2-7.
25. Parving H.H, Mauer M, Fioretto P, et al .Diabetic nephropathy. In B. Brenner (Ed.), *Brenner and Rector's The Kidney*, Vol. 1, Philadelphia:Elsevier; 2012;1411- 54.
26. Cachat F, Combescure C, Cauderay M, Girardin E, et al. A systematic review of glomerular hyperfiltration assessment and definition in the medical literature. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:382–89.
27. Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, et al. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol* 2017;28(4):1023-39.
28. Klessens CQ, Woutman TD, Veraar KA, Zandbergen M, et al. *Kidney Int* An autopsy study suggests that diabetic nephropathy is underdiagnosed. *Kidney Int* 2016;90(1):149-56.
29. Sharma A, Mucino MJ, Ronco C. Review Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 2014;127(1-4):94-100.
30. Bankir L, Roussel R, Bouby N. Protein- and diabetes-induced glomerular hyperfiltration: Role of glucagon, vasopressin, and urea. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015;309:2–23.
31. Muskiet MH, Smits MM, Morsink LM, Diamant M. The gut-renal axis: Do incretin-based agents confer renoprotection in diabetes? *Nat Rev Nephrol* 2014;10:88–103.
32. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: The sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:1461–69.
33. Ruggenenti P, Porrini EL, Gaspari F, Motterlini N, et al. GFR Study Investigators: Glomerular hyperfiltration and renal disease progression in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35(10):2061-8.
34. Trevisan R, Dodesini A, R. The Hyperfiltering Kidney in Diabetes. *Nephron* 2017;136:277-80.
35. Lu CC, Ma KL, Ruan XZ, Liu BC. Intestinal dysbiosis activates renal renin-angiotensin system contributing to incipient diabetic nephropathy. *Int J Med Sci.*

- 2018;15(8):816-822. Cited december 14th 2018. Available from <http://www.medsci.org/v15p0816.htm>.
36. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59:251–87.
 37. Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:274–81.
 38. Wysocki J, Ye M, Khattab AM, Fogoet A et al. Angiotensin-converting enzyme 2 amplification limited to the circulation does not protect mice from development of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2017;91:1336–46.
 39. Liu Z, Huang XR, Chen HY, Fung E, et al. Deletion of Angiotensin-Converting Enzyme-2 Promotes Hypertensive Nephropathy by Targeting Smad7 for Ubiquitin Degradation. *Hypertension* 2017;70:822–30.
 40. Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes* 2014;5:202–7.
 41. Navaneethan SD, Nigwekar SU, Sehgal AR, Strippoli GFM. Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:542–51.
 42. Lindhardt M, Persson F, Currie G, Pontillo C, et al. Proteomic prediction and Renin angiotensin aldosterone system Inhibition prevention Of early diabetic nephropathy in Type 2 diabetic patients with normoalbuminuria (PRIORITY): essential study design and rationale of a randomised clinical multicentre trial *BMJ Open* 2016;6:e010310.
 43. Schjoedt KJ, Andersen S, Rossing P. Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. *Diabetologia* 2004;47:1936–9.
 44. Epstein M, Williams GH, Weinberger M, Levin A, et al. Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:940–51.

45. Nielsen SE, Persson F, Frandsen E, Sugaya T, et al. Spironolactone diminishes urinary albumin excretion in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria: a randomized placebo-controlled crossover study. *Diabet Med* 2012;29:e184–90.
46. Zhang Y, Zhao S, Wu D, Liu X, et al. MicroRNA-22 Promotes Renal Tubulointerstitial Fibrosis by Targeting PTEN and Suppressing Autophagy in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* 2018;2018:4728645.
47. Franconi F, Campesi I, Occhioni S, Tonolo G. Sex-gender differences in diabetes vascular complications and treatment. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2012;12(2):179–196.
48. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, et al. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells – renoprotection in diabetic nephropathy? *PloS One* 2013;8(2):e54442.
49. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. SAVOR-TIMI 53 Steering Committee and Investigators. *N Engl J Med* 2013;369(14):1317–26.
50. Dadras F, Sheikh V, Khoshjou F. Epithelial and endothelial mesenchymal transition and their role in diabetic kidney disease. *J Renal Inj Prev* 2018;7(1):1-6.
51. Wolf G, Sharma K. Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Natural History of Diabetic Nephropathy chapter 30. 2016; cited 2018. dec.10th. Available from: <https://abdominalkey.com/pathogenesis-clinical-manifestations-and-natural-history-of-diabetic-nephropathy/>
52. Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004;82:175–82.
53. Han F, Xue M, Chang Y, Li X, et al. Triptolide Suppresses Glomerular Mesangial Cell Proliferation in Diabetic Nephropathy Is Associated with Inhibition of PDK1/Akt/mTOR Pathway. *Int J Biol Sci* 2017;13(10):1266–75.
54. Jiang C, Fang X, Zhang H, Wang X, et al. AMD3100 combined with triptolide inhibit proliferation, invasion and metastasis and induce apoptosis of human U2OS osteosarcoma cells. *Biomedicine & pharmacotherapy=Biomedecine& pharmacotherapie*. 2017;86:677–85.

55. McCarthy KJ, Wassenhove-McCarthy DJ. The glomerular basement membrane as a model system to study the bioactivity of heparansulfateglycosaminoglycans. *Microsc Microanal* 2012;18(1):3-21.
56. Zhang J, Wang, Y, Gurung P, et al. The relationship between the thickness of glomerular basement membrane and renal outcomes in patients with diabetic nephropathy. *ActaDiabetol* 2018;55:669.
57. Marshall C.B. Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic? *Am J Physiol Renal Physiol* 2016;311:831-43.
58. Carranza K, Veron D. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrologia* 2015;35:131-8.
59. Katsuyuki T, Jun W. VEGF-Targeting Strategies against Diabetic Nephropathy: Obsolete or Still Promising? *Biomed J Sci&Tech Res* 2018;2(3). BJSTR.MS.ID.000758.
60. Badal SS, Danesh FR. New insights into molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases* 2014;63(2):63-83.
61. Ahmadi SAY, Ahmadi P.S, Tavaf I M, Hasanvand A. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Controversies about Nephrotic Syndrome and Diabetic Nephropathy: A Systematic Review. *Int J Intg Med Sci* 2016;3(2):229-31.
62. Tanabe K, Lanaspá MA, Kitagawa W, Rivard CJ, et al. Nicorandil as a novel therapy for advanced diabetic nephropathy in the eNOS-deficient mouse. *American journal of physiology Renal physiology* 2012;302(9):1151-60.
63. Wanic K, Krolewski B, Ju WJ, Placha G, et al. Transcriptome Analysis of Proximal Tubular Cells (HK-2) Exposed to Urines of Type 1 Diabetes Patients at Risk of Early Progressive Renal Function Decline. *Plos One* 2013;8(3).
64. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *J Renal Inj Prev* 2013;2(2):59-62.
65. Advani A. Vascular endothelial growth factor and the kidney: something of the marvellous. *Curr Opin Nephrol Hy* 2014;23(1):87-92.
66. Chang AS, Hathaway CK, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor- β 1 and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015;310(8):689-96.

67. Qiao Y-C; Chen Y-L, Pan Y-H, Ling W, et al. Changes of transforming growth factor beta 1 in patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis *Medicine* 2017;96:15.
68. Voelker J, Berg PH, Sheetz M, Kevin D. Anti-TGF- β 1 Antibody Therapy in Patients with Diabetic Nephropathy. *JASN* 2017;28(3):953-62.
69. Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Cell biology of diabetic nephropathy: roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes. *J Diabetes Investig* 2015;1(6):3-15.
70. Haoran D, Qingquan L, Baoli L. Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* 2017:2017, Article ID 2615286 Cited 2018. Dec 12th. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/2615286>.
71. Lin J. S, Susztak K. Podocytes: the weakest link in diabetic kidney disease. *Curr Diabetes Rep* 2016;5(16):45.
72. Jo H.A, Kim J.Y, Yang S.H, Han S.S, et al. The role of local IL6/JAK2/STAT3 signaling in high glucose-induced podocyte hypertrophy. *Kidney Res Clin Pract* 2016;4(35):212-8.
73. Lu Q, Ji H-J, Zhou Y-X, Yao X-Q et al. Quercetin inhibits the mtorc1/p70s6k signaling-mediated renal tubular epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis in diabetic nephropathy. *Pharmacol Res* 2015;99:237-47.
74. Loeffler I, Wolf G. Epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy: fact or fiction? *Cell* 2015;4(4):631-52.
75. Liu L, Fu W, Xu J, Shao L, and Wang Y. Effect of bmp7 on podocyte transdifferentiation and smad7 expression induced by hyperglycemia. *Clinical Nephrology* 2015;2(84):95-9.
76. Mathew S, X. Chen X, Pozzi A, Zent R. Integrins in renal development. *Pediatr Nephrol* 2012;6(27):891-900.
77. Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study. 2012; *PLoS One* 2012;7(5) article e36041.
78. Khurana S, Bruggeman A L, Kao H-Y. Nuclear hormone receptors in podocytes. *Cell & Bioscience* 2012;2:33.

79. Yu D, Petermann A, Kunte U, Rong S, et al. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2015;16(6):1733–41.
80. Kriz WB, Hähnel B, Hosser H, Rösener S, and Waldherr R. Structural analysis of how podocytes detach from the glomerular basement membrane under hypertrophic stress. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:207.
81. Susztak K, Raff A.C, Schiffer M, Böttinger E.P. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55(1):225–33.
82. Kawanami D, Matoba K, Utsunomiya K. Signaling pathways in diabetic nephropathy. *Histol Histopathol* 2016;31(10):1059–67.
83. Kim Y, Park C.W. Adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy kidney. *Kidney Res Clin Pract* 2016;2(35):69–77.
84. Xiao L, Wang M, Yang S, Liu F, and Sun L. A glimpse of the pathogenetic mechanisms of Wnt/ β -catenin signaling in diabetic nephropathy. *Bio Med Research International* 2013;2013:pages 7. Article ID 987064.
85. Yuan Y, Xu X, Zhao C, Zhao M, et al. The roles of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in aldosterone mineralocorticoid receptor-induced podocyte injury. *Lab Invest* 2015;12(95):1374–86.
86. Zhuang A, Forbes J.M. Stress in the kidney is the road to pERdition: is endoplasmic reticulum stress a pathogenic mediator of diabetic nephropathy? *J Endocrinol* 2014;3(222):97–111.
87. Rong G, Tang X, Guo T, Guo T, Duan N, et al. Advanced oxidation protein products induce apoptosis in podocytes through induction of endoplasmic reticulum stress. *J Physiol Biochem* 2015;3(71):455–70.
88. Cao Y, Hao Y, Li H, Liu X, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose. *Int J Mol Med* 2014;4(33):809–16.
89. Colgan S.M, Hashimi A.A, Austin R.C. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert Rev Mol Med* 2011;(13):article e4.

90. Chen Y, Liu C.P, Xu K.F, Mao X.D, et al. Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *Am J Nephrol* 2008;6(28):1014–22.
91. Pourghasem M, Shafi H, Babazadeh Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. *Caspian J Intern Med* 2015;3(6):120–7.
92. Inoki K, Mori H, Wang J, Wang J, Suzuki T, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest* 2011;6(121):2181–96.
93. Blattner S.M, Hodgin J.B, Nishio M, Wilie S.A, et al. Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury. *Kidney Inter* 2013;5(84):920–30.
94. Komers R. Rho kinase inhibition in diabetic kidney disease. *J Clin Pharmacol* 2013;4(64):551–9.
95. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 2012 Jul 1;523(1):123-33.
96. Wang Z, Wang Y, Xu B, Liu J, et al. Vitamin D improves immune function in immunosuppressant mice induced by glucocorticoid. *Biomed Res* 2017;6(1):120-4.
97. Lai Y-H, Fang T-C. The pleiotropic effect of vitamin D. *ISRN Nephrology* 3013;2013, Article ID 898125.
98. Sharifi A, Hosseinzadeh-Attar MJ, Vahedi H, Nedjat S. A randomized controlled trial on the effect of vitamin D3 on inflammation and cathelicidin gene expression in ulcerative colitis patients. *Saudi J Gastroenterol* 2016;22(4):316-23.
99. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, et al. Vitamin D inhibits macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 2012;188(5):2127–35.
100. Calton EK, Keane KN, Newsholme P, Soares MJ. The Impact of Vitamin D Levels on Inflammatory Status: A Systematic Review of Immune Cell Studies. Polyak SJ, ed. *PLoS ONE* 2015;10(11):e0141770.
101. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, Palumbo M, et al. Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. *Cellular Immunology* 2012;280(1):36–43.

102. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, et al. Vitamin D₃ down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006;36(2):361–70.
103. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:58.
104. Ojaimi S, Skinner NA, Strauss BJ, Sundararajan V, et al. Vitamin D deficiency impacts on expression of toll-like receptor-2 and cytokine profile: a pilot study. *J Transl Med* 2013;11:176.
105. Lydia A, Asanuma K, Nonaka K, Takagi M, et al. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. *Am J Nephrol* 2012;35:58–68.
106. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:3382–93.
107. Martinesi M, Treves C, d'Albasio G, Bagnoli S, et al. Vitamin D derivatives induce apoptosis and downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(5):597–604.
108. Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC. 1, 25(OH)₂ Vitamin D₃ inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;119(1-2):73-83.
109. Garcia IM, Altamirano L, Mazzei L, Fornes M, et al. Role of mitochondria in paricalcitol-mediated cytoprotection during obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:1595–605.
110. Bae S, Singh SS, Yu H, Lee JY, et al. Vitamin D signaling pathway plays an important role in the development of heart failure after myocardial infarction. *J Appl Physiol* 2013;114(8):979-87.
111. Zinser M, Welsh J. Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in Vitamin D₃ receptor null mice. *Molecular Endocrinology* 2004;18(9):2208–23.
112. Valrance M.E, J. Welsh J. Breast cancer cell regulation by high-dose Vitamin D compounds in the absence of nuclear Vitamin D receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:221–5.

113. Kitson T.M, Stuart K, Roberts K.S. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol*2012;57:897–9.
114. Inazaki K, et al. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2004;6(2):597–604.
115. Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, et al. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001;4(1):89–100.
116. Flanders KC, et al. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* 2002;60(3):1057–68.
117. Zhao J, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio* 2002;82(3):585–93.
118. Spath L, Olivieri A, Lavra L, Fidanza L, et al. Antiproliferative Effects of 1 α -OH-vitD₃ in malignant melanoma: potential therapeutic implications. *Sci Rep* 2017;7:40370.
119. Kaissling B, Lehir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*2013;1832(7):931–9.
120. Bonventre J.V. Antifibrotic vitamin D analogs. *J Clin Invest* 2013;123(11): 4570-3.
121. Ichiako I, Tsuyoshu W, Masato A, Rumi A, et al. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis *J Clin Invest* 2013;123(11):4579–94.
122. Lac P.T., Choi K, Liu I-A, Meguerditchian S, et al. The effects of changing vitamin D levels on anemia in chronic kidney disease patients: a retrospective cohort review. *Clin. Nephrol.* 2010;74(1): 25–32.
123. Santoro D, Caccamo D, Lucisano S, Buemi M, et al. Interplay of vitamin D, erythropoiesis, and the renin-angiotensin system. *Biomed Res Int* 2015;2015:145828.
124. Icardi A, Paoletti E, de Nicola L, Mazzaferro S, et al. Renal anaemia and EPO hyporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(7):1672–9.
125. Sun C.C., Vaja V, Babitt J.L, Lin H.Y. Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *Am J Hematol* 2012;87(4):392–400.

126. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011;62:347–60.
127. Ganz T. Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun* 2012;4(5–6):446–53.
128. Zughaier S, Alvarez J. A, Sloan J. H, Konrad R. J, Tangpricha V. The role of vitamin D in regulating the iron-hepcidin-ferroportin axis in monocytes. *J Clin Transl Endocrinol* 2014;1(1):19–25.
129. Kunutsor SK, Apekey TA, Steur M. Vitamin D and risk of future hypertension: meta-analysis of 283,537 participants. *Eur J Epidemiol* 2013;28(3):205–21.
130. Li Y.C, Kong J, Wei M, Chen Z.-F, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110(2):229–38.
131. Vaidya A, Sun B, Larson C, Forman JP, Williams JS. Vitamin D3 therapy corrects the tissue sensitivity to angiotensin ii akin to the action of a converting enzyme inhibitor in obese hypertensives: an interventional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(7):2456–65.
132. McMullan CJ, Borgi L, Curhan GC, Fisher N, Forman JP. The effect of vitamin D on renin-angiotensin system activation and blood pressure: a randomized control trial. *J Hypertens* 2017;35(4):822-29.
133. Thadhani R, Appelbaum E, Pritchett Y, Chang Y, et al. Vitamin D therapy and cardiac structure and function in patients with chronic kidney disease: the PRIMO randomized controlled trial. *JAMA* 2012;307(7): 674–84.
134. Wang A. Y-M, Fang F, Chan J, Wen Y-Y, et al. Effect of paricalcitol on left ventricular mass and function in CKD—the OPERA trial. *JAMA*.2014;25,(1): 175–86.
135. Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical vitamin D action. *Nutrients* 2010;2(4):408–25.
136. Li M, Chen P, Li J, Chu R, et al. Review: the impacts of circulating 25-hydroxyvitamin D levels on cancer patient outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(7):2327-36.

137. Jones G, Proser DE, Kaufmann M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 2014;55(1):13-31.
138. Friedrich M, Rafi L, Mitschele T. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Re* 2003;164:239-46.
139. Edwards J.B. Anticancer Effects of Vitamin D. *Am J Hematol Oncol* 2015;11(10):27-36.
140. Whitlatch LW, Young MV, Schwartz GG, et al. 25-Hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase activity is diminished in human prostate cancer cells and is enhanced by gene transfer. *J Steroid biochem mol biol* 2002;81(2):135-140.
141. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzell JD, Weiss NS. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis* 2007;50:69-77.
142. Guan X, Yang H, Zhang W, Wang H, Liao, L. Vitamin D receptor and its protective role in diabetic nephropathy. *Chin Med J* 2014;127. 365-9.
143. Wang Y, Borchert ML, Deluca HF. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int* 2012;81:993-1001.
144. Li CY. Vitamin D receptor signaling in renal and cardiovascular protection. *Semin Nephrol* 2013;33:433-47.
145. Deb DK, Zhang Z, Sun T, Liu W, et al. Vitamin D receptor signaling in podocytes protects against diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1977-86.
146. Trohatou O, Tsilibary EF, Charonis A, Iatrou C, Drossopoulou G. Vitamin D₃ ameliorates podocyte injury through the nephrin signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2017;21(10):2599-609.
147. Song Z, Guo Y, Zhou M, Zhang X, et al. The PI3K/p-Akt signaling pathway participates in calcitriol ameliorating podocyte injury in DN rats. *Metabolism* 2014;63:1324–33.
148. Xing L, Liu Q, Fu S, Yang L, et al. PTEN Inhibits High Glucose-Induced Phenotypic Transition in Podocytes. *J Cell Biochem* 2015;116:1776–84.
149. Panichi V, Migliori M, Taccola D, Filippi C, et al. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. *Kidney Int* 2001;60:87–95.

150. Li Y, Spataro BC, Yang J, Dai C, Liu Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney Int* 2005;68:1500-1510.
151. Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, Inokami T, et al. Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney Int* 2003;64:414-20.
152. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:152-76.
153. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* 1983;221:1181-3.
154. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000;374:334-8.
155. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler et al. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: A novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:621-9.
156. Panichi V, De Pietro S, Andreini B, Bianchi AM, et al. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. *Kidney Int* 1998;54:1463-9.
157. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167:4974-80.
158. Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, et al. Immunobiology 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology* 2012;217(12):1292-1300.
159. Bakke D, Sun J. Ancient Nuclear Receptor VDR With New Functions: Microbiome and Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2018;24(6):1149-54.
160. Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res* 2014;7:69-87.
161. Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008;73:163-71.

162. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang et al. Vitamin D: A negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89–90:387–92.
163. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110:229–38.
164. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: Blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15896–901.
165. Kramer CK, Swaminathan B, Hanley AJ, Connelly PW, et al. Prospective associations of vitamin D status with β -cell function, insulin sensitivity, and glycemia: the impact of parathyroid hormone status. *Diabetes* 2014;63(11):3868–79.
166. Dunlop TW, Väisänen S, Frank C, Molnár F, et al. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and its nuclear receptor. *J Mol Biol* 2005;349:248–60.
167. Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, Urashima M. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes* 2016;7(5):89–100.
168. Cheng Q, Boucher BJ, Leung PS. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia* 2013;56:553–62.
169. de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Shahinfar S, et al. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: Lessons from RENAAL. *Kidney Int* 2004;65(6):2309 – 20.
170. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9752):1543–51.
171. Petrovic M, Dragović T, Petrovic S, Obrencevic K, et al. Effect of vitamin D on proteinuria, lipid status, glycoregulation and C-reactive protein in patients with type-2 diabetes mellitus. *Vojnosanit Pregl* 2018;113.
172. Momeni A, Mirhosseini M, Kabiri M, Kheiri S. Effect of vitamin D on proteinuria in type 2 diabetic patients. *J Nephropathol* 2016;6(1):10–14.

173. Ahmadi N, Mortazavi M, Iraj B, Askari G. Whether vitamin D3 is effective in reducing proteinuria in type 2 diabetic patients? *J Res Med Sci* 2013;18(5):374-7.
174. Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008;73:163–71.
175. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15896–901.
176. Bonakdaran S, Hami M, Hatefi A. The effects of calcitriol on albuminuria in patients with type-2 diabetes mellitus. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2012;23(6):1215-20.
177. Huang Y, Yu H, Lu J, Guo K, et al. Oral supplementation with cholecalciferol 800 IU ameliorates albuminuria in Chinese type 2 diabetic patients with nephropathy. *PloS One* 2012;7(11):505-10.
178. Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, et al. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF-beta1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int* 2011;80(8):851–60.
179. McLaughlin M, Raggat PR, Fairney A, Brown DJ, et al. Seasonal variation in serum 25-hydroxycholecalciferol in healthy people. *Lancet* 1974;1(7857):536-8.
180. Mavroeydi A, O'Neill F, Lee PA, Darling AL, et al. Seasonal 25-hydroxyvitamin D changes in British postmenopausal women at 57 degrees N and 51 degrees N: a longitudinal study. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1–2):459-61.
181. Bolland MJ, Ames RW, Mason BH, Horne AM, et al. The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr* 2007;4(86):4959-64.
182. Papadikis G, Keramidas I, Kakava K, Pappa T, et al. Seasonal Variation of Serum Vitamin D Among Greek Female Patients with Osteoporosis. *In vivo* 2015;29:409-14.
183. Klenk J, Rapp K, Denking MD, Nagel G et al. Seasonality of vitamin D status in older people in Southern Germany: implications for assessment. *Age Ageing* 2013; 42(3):404-8.

184. Romero-Ortuno R, Cogan L, Browne J, Healy M, et al. Seasonality of vitamin D status in older people in Southern Germany: implications for assessment. *Age Ageing* 2013;42(3):404-8.
185. Nissen J; Vogel U, Ravn-Haren G, Andersen, EW, et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes are both determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations after UVB irradiation and after consumption of vitamin D(3)-fortified bread and milk during winter in Denmark. *Am J Clin Nutr* 2015;101:218–27.
186. Nakamura K, Tsugawa N, Saito T, Ishikawa M, et al. Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Bone* 2008;42(2):271–7.
187. Bischoff-Ferrari H.A, Giovannucci E, Willett W.C, Dietrich T, Dawson- Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84(1),18-28.
188. Moyad MA. Vitamin D: a rapid review. *Urol Nurs* 2008;28(5):343-9.
189. Ojaimi S, Skinner NA, Strauss BJ, Sundararajan V, et al. K. Vitamin D deficiency impacts on expression of toll-like receptor-2 and cytokine profile: a pilot study. *J Transl Med* 2013;11:176.
190. Jacobs E.T, Alberts D.S, Foote, J.A, Green, S.B, et al. Vitamin D insufficiency in southern Arizona. *Am J Clin Nutr* 2008;87(3):608-13.
191. Bonelli P, Buonocor R, Aloe R, Lippi L. Blood Sampling Seasonality as an important preanalytical factor for assessment of vitamin D status. *J Med Biochem* 2016;35(2):113–7.
192. Klingberg E, Oleröd G, Konar J, Petzold M, Hammarsten O. Seasonal variations in serum 25-hydroxy vitamin D levels in a Swedish cohort. *Endocrine* 2015;49(3):800-8.
193. Itoh H, Mori I, Matsumoto Y, Maki S, Ogawa Y. Vitamin D Deficiency and Seasonal and Inter-day Variation in Circulating 25-hydroxyvitamin D and Parathyroid Hormone Levels in Indoor Daytime Workers: A Longitudinal Study. *Ind. Health* 2011;49: 475–81.
194. Hine TJ, Roberts NB. Seasonal variation in serum 25-hydroxy vitamin D3 does not affect 1,25-dihydroxy vitamin D. 1994. *Ann Clin Biochem* 31(1):31–4.

195. Woitge HW, Knothe A, Witte K, Schmidt-Gayk H, et al. Circaannual rhythms and interactions of vitamin D metabolites, parathyroid hormone, and biochemical markers of skeletal homeostasis: a prospective study. *J Bone Miner Res* 2000;15:2443–50.
196. Schoenmakers I, Gousias P, Jones S.K, Prentice A. Prediction of winter vitamin D Status and requirements in the UK population based on 25(OH) vitamin D half-life and dietary intake data. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;(164):218-22.
197. Darling A.L, Hart K.H, Gibbs M.A, Gossiel F, et al. Greater seasonal cycling of 25-hydroxyvitamin D is associated with increased parathyroid hormone and bone resorption. *Osteoporos Int* 2014;25(3):933-41.
198. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, et al., editors. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/> doi: 10.17226/13050
199. Shaheen S, Chauhan H , Mishra N. Association between type 2 diabetes mellitus and hypovitaminosis D. *IJCBR* 2017;4(4):413-5.
200. Aljack HA, Abdalla MK, Idris OF, Ismail AM. Vitamin D deficiency increases risk of nephropathy and cardiovascular diseases in Type 2 diabetes mellitus patients. *J Res Med Sci* 2019;24:47.
201. Xiao X, Wang Y, Hou Y, Han F, et al. Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med Res* 2016;44(3):673–84.
202. Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol* 2010;2010:351385.
203. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 2012;523:123–33.
204. De Boer I. Vitamin D and glucose metabolism in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:566–72.
205. Zhong J, Gong Q, Mima A. Inflammatory regulation in diabetes and metabolic dysfunction. *J. Diabetes Res* 2017;2017:ID 5165268.
206. KlingbergE, OlerödG, Konar J, Petzold M, et al. Seasonal variations in serum 25-hydroxy vitamin D levels in a Swedish cohort. *Endocrine* 2015;49(3):800–8.
207. Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care* 2001;24:1496–500.

208. Zoppini G, Galletti A, Targher G, Brangani C, et al. Lower levels of 25-hydroxyvitamin D3 are associated with a higher prevalence of microvascular complications in patients with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Car* 2015;3(1):e000058.
209. Maiti S, Lochan Das K. The assessment of vitamin D status in the patient of diabetic nephropathy: a case control tertiary institutional based study. *AJST* 2015;06(9) 1794-8,
210. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–81.
211. Bayani MA, Akbari R, Banasaz B, Saeedi F. Status of Vitamin-D in diabetic patients. *Caspian J Intern Med* 2014;5(1):40–42.
212. Maggio D, Cherubini A, Lauretani F, Russo RC, et al. 25(OH)D Serum levels decline with age earlier in women than in men and less efficiently prevent compensatory hyperparathyroidism in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60(11):1414-9.
213. Aljabri SK. Vitamin D deficiency in Saudi men with type 2 diabetes mellitus. *Annals of Short Reports - Endocrinol Metab* 2019;2.Article 1037.
214. Carnevale V, Modoni S, Pileri M, Di Giorgio A, et al. Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. *Osteopors Int* 2001;12(12):1026-30.
215. Lucas JA, Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, et al. Determinants of vitamin D status in older women living in a subtropical climate. *Osteoporos Int* 2005;16:1641–8.
216. 217. Bredella MA. Sex differences in body composition. *Adv Exp Med Biol* 2017;1043:9-27.
217. Bruce A.F, Theeke L, Mallow J. A state of the science on influential factors related to sun protective behaviors to prevent skin cancer in adults. *Int J Nurs Stud* 2017;4(3):225-35.
218. Sanghera DK, Sapkota BR, Aston CE, Blackett PR. Vitamin D Status, Gender Differences, and Cardiometabolic Health Disparities. *Ann Nutr Metab* 2017;70(2):79–87.
219. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(6):2017–29.

220. Al-Shoumer KA, Al-Essa TM. Is there a relationship between vitamin D with insulin resistance and diabetes mellitus? *World J Diabetes* 2015;6(8):1057–64.
221. Xuan Y, Zhao HY, Liu JM. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus (D2) *J Diabetes* 2013;5:261–7.
222. Olt S. Relationship between vitamin D and glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(10):19180–83.
223. Al-Timimi DJ, Ali AF. Serum 25(OH) D in Diabetes Mellitus Type 2: Relation to Glycaemic Control. *J Clin Diagn Res* 2013;7:2686–8.
224. Harris SS, Pittas AG, Palermo NJ. A randomized, placebo-controlled trial of vitamin D supplementation to improve glycaemia in overweight and obese African Americans. *Diabetes Obes Metab* 2012;14:789–94.
225. Ghavam S, Ahmadi MRH, Panah AD, Kazeminezhad B. Evaluation of HbA1C and serum levels of vitamin D in diabetic patients. *J Family Med Prim Care* 2018;7(6):1314–18.
226. Buhary BM, Almohareb O, Aljohani N, Alrajhi S, et al. Association of Glycosylated Hemoglobin Levels With Vitamin D Status. *J Clin Med Res* 2017;9(12):1013–18.
227. Wang Y, Yang S, Zhou Q, Zhang H, Yi B: Effects of vitamin D supplementation on renal function, inflammation and glycaemic control in patients with diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Blood Press Res* 2019;44:72-87.
228. Mertoglu C. GunayM. Neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as useful predictive markers of prediabetes and diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr* 2017;11(1):127-31.230.
229. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;14;444(7121):860-7.
230. Zhou T, Hu Z, Yang S, Sun L, et al. Role of adaptive and innate immunity in type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Res* 2017;2018:ID 7457269.
231. Huang W, Huang J, Liu Q , Lin F, et al. Neutrophil–lymphocyte ratio is a reliable predictive marker for early-stage diabetic nephropathy. *Clin Endocrinol* 2015;82:229-33.
232. Alsayyad MM, AbdAlsamie HS. The prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in nephropathy of type 2 diabetes mellitus. *SciJ Al/AyhaeMedFac Girls* 2019;3:181-8.

233. Lalošević M, Pavlović Marković A, Stanković S, et al. Combined diagnostic efficacy of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), and mean platelet volume (MPV) as biomarkers of systemic inflammation in the diagnosis of colorectal cancer. *Dis Markers* 2019;2019:6036979.
234. Lee JS, Kim NY, Na SH, Youn YH, Shin CS. Reference values of neutrophil-lymphocyte ratio, lymphocyte-monocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio, and mean platelet volume in healthy adults in South Korea. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(26):e11138.
235. Xianchun M, Qian C, Yuying L, Ling C, et al. Determinant roles of gender and age on SII, PLR, NLR, LMR and MLR and their reference intervals defining in Henan, China: A posteriori and big-data-based. *J Clin Lab Anal* 2017;32(2):e22228.
236. Wu L, Zou S, Wang C, Tan X, Yu M. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio in Chinese Han population from Chaoshan region in South China. *BMC Cardiovasc Disord* 2019;19(1):125.
237. Freeman D.J, Norrie J, Caslake M.J. et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002;51:1596–1600.
238. Kushner I, Rzewnick Di, Samols D. What Does Minor Elevation of C-Reactive Protein Signify? *Am. J. Med. Sci* 2006;119(2),166.e17-166.e28.
239. Ponda MP, Huang X, Odeh MA, Breslow JL, Kaufman HW. Vitamin d may not improve lipid levels: a serial clinical laboratory data study. *Circulation* 2012;126:270–7.
240. Ponda MP, Dowd K, Finkelstein D, Holt RP, et al. The Short-Term Effects of Vitamin D Repletion on Cholesterol A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2510-15.
241. Kubiak J, Thorsby MP, Kamycheva E, Jorde R. Vitamin D supplementation does not improve CVD risk factors in vitamin D-insufficient subjects. *Endocr Connec* 2018;7:840–9.
242. Jorde R, Grimnes G. Exploring the association between serum 25-hydroxyvitamin D and serum lipids—more than confounding? *Eur J Clin Nutr* 2018; 72:526–33.
243. Jorde R., Grimnes G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog Lipid Res* 2011;50:303-12.
244. Talaei A, Mohamadi M, Adgi Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2013;5:8.

245. Sadiya A, Ahmed SM, Carlsson M, Tesga Y, et al. Vitamin D supplementation in obese type 2 diabetes subjects in Ajman, UAE: a randomized controlled double-blinded clinical trial. *Eur J Clin Nutr* 2015;69(6):707–11.
246. Ramiro-Lozano JM, Calvo-Romero JM. Effects on lipid profile of supplementation with vitamin D in type 2 diabetic patients with vitamin D deficiency. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2015;6(6):245–248.
247. Kane L, Moore K, Lütjohann D, Bikle D. et al. Vitamin D3 Effects on Lipids Differ in Statin and Non-Statin-Treated Humans: Superiority of Free 25-OH D Levels in Detecting Relationships. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(11) 4400–9.
248. Hashemipour S, Larijani, B, Adibi H. et al. The Status of Biochemical Parameters in Varying Degrees of Vitamin D Deficiency *J Bone Miner Metab* 2006;24(3):213-8.
249. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D Deficiency in Adults: When to Test and How to Treat. *Mayo Clin Proc* 2010;85(8):752-7.
250. Shaheen S, Shahid Noor S, Barakzai Q. Serum Alkaline Phosphatase Screening for Vitamin D Deficiency States. *J Coll Physicians Surg Pak* 2012;22(7):424-7.
251. Heaney RP, Dowell MS, Bierman J, Hale CA, Bendich A. Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation. *J Am Coll Nutr* 2001;20:239-46.
252. Leaf ED, Korets R, Taylor NE, Tang J, et al Effect of Vitamin D Repletion on Urinary Calcium Excretion among Kidney Stone Formers. *CJASN* 2012;7 (5) 829-34.
253. Penniston LK, Jones NA, Nakada YS, Karen E. Hansen EK. Vitamin D repletion does not alter urinary calcium excretion in healthy postmenopausal women. *Bju International* 2009;104:1512–6.
254. Malihi Z, Wu Z, Stewart AW, Lawes CM, Scragg R. Hypercalcemia, hypercalciuria, and kidney stones in long-term studies of vitamin D supplementation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2016;104:1039-51.
255. Maryam T, Sanaz T, Fatemeh S, Bagheri FA, et al. Effect of vitamin D supplementation on 24-hour urine calcium in patients with calcium urolithiasis and vitamin D deficiency. *Int. braz j urol.* [Internet]. 2019 Apr [cited 2020 Feb 03] ; 45(2): 340-346. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-55382019000200340&lng=en. Epub May 27,2019. <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2018.0522>

256. Letavernier E, Daudon M. Vitamin D, Hypercalciuria and Kidney Stones. *Nutrients* 2018;10(3):366.
257. Zhao J, Dong J, Wang H, Shang H, Zhang D, Liao L: Efficacy and safety of vitamin D3 in patients with diabetic nephropathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin Med J* 2014;127:2837-43.
258. Derakhshanian H, Shab-Bidar S, Speakman JR, Nadimi H, Djafarian K: Vitamin D and diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 2015;31:1189-94.
259. Xu L, Wan X, Huang Z, Zeng F, et al. Impact of vitamin D on chronic kidney diseases in non-dialysis patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS One* 2013; 8:e61387.
260. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010;1: 353–61.

OPŠTA BOLNICA SUBOTICA
ODELJENJE INTERNO II, AMBULANTE ZA DIJABETES I NEFROLOGIJU
Ul. Izvorska 3.
24 000 SUBOTICA
VOJVODINA, REPUBLIKA SRBIJA

INFORMACIONI LIST

UTICAJ HOLEKALCIFEROLA U DOZAMA PRILAGOĐENIM SEZONSKIM VARIJACIJAMA NA PROTEINURIJU KOD BOLESNIKA SA DIJABETESNOM BOLESTI TIP 2

U opštoj bolnici u Subotici u toku je ispitivanje koje se vrši na grupi bolesnika koji se kontrolišu i leče zbog dijabetesne bolesti tip 2, tj. onih bolesnika koji se leče tabletama ili dijetom.

S obzirom da je ovaj poremećaj dijagnostikovao i kod Vas, ispunjavate uslove da budete uključeni u ovo ispitivanje. Obraćamo Vam se sa molbom da pažljivo pročitate ovo obaveštenje kako biste mogli da eventualno date Vašu saglasnost da učestvujete u ispitivanju, odnosno da dozvolite korišćenje podataka iz Vaše istorije bolesti.

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi učestalost nedostatka vitamina D kako u grupi osoba obolelih od dijabetesne bolesti tako i među onim osobama koje nemaju ovu bolest. Među obolelim osobama sa dijabetesom tip 2 se planira da se izdvoje oni bolesnici kod kojih se utvrdi nedostatak vitamina D te da se ovaj vitamin u vidu kapi uvede u svakodnevnu terapiju sa ciljem dostizanja normalnih vrednosti.

Dodatni cilj ovog istraživanja je da se utvrdi da li se normalizacijom vrednosti vitamina D u organizmu može postići i poboljšanje kontrole dijabetesne bolesti i zaštita Vaših bubrega u odnosu na oštećenja koja se događaju tokom trajanja bolesti.

Zbog toga će se pored redovnih kontrola koje obuhvataju merenje krvog pritiska i standardnih laboratorijskih testova iz uzoraka izvađene krvi, dodatno meriti i koncentracija vitamina D.

Ispitivanje koje vršimo u svrhu ovog rada nije štetno po Vaše zdravlje, besplatno je i zagarantovana je potpuna tajnost Vaših podataka. Podaci iz bolesničkih kartona će se upotrebiti isključivo u naučne svrhe.

Doze vitamina D koje će se primenjivati kod osoba kod kojih se utvrdi nedostatak ovog vitamina su opšte prihvaćene i uobičajene doze koje se primenjuju kod osoba koje imaju nedostatak ovog vitamina.

Vaše učešće u ovom istraživanju je potpuno dobrovoljno. Možete da odustanete od daljeg učešća u ovom ispitivanju u bilo kom momentu, a Vaša odluka neće imati nikakvog uticaja na Vaše dalje lečenje i odnos lekara prema Vama.

Ukoliko želite da učestvujete u ovom istraživanju molimo Vas da potpišete ponuđeni obrazac.

Za sve detaljnije informacije se obratite dr Tatjani Stojšić Vuksanović koja je rukovodilac ovog ispitivanja.

Rukovodilac ispitivanja

Mr. sci dr med Tatjana Stojšić Vuksanović

TEKST INFORMISANOG PRISTANKA BOLESNIKA

Ja dole potpisani/a, upoznat sam sa ispitivanjem koje će se obaviti u Opštoj Bolnici u Subotici.

Pročitao/la sam informacije o ispitivanju i razgovarao sam sa rukovodiocem ispitivanja. Jasan mi je detaljan postupak ispitivanja.

Ovim potpisom dobrovoljno pristajem da učestvujem u ispitivanju kao i da se podaci koje sam dao/la u razgovoru sa lekarom (koji su neophodni za ispitivanje) koriste u tu svrhu.

Detaljno sam informisan/na o zagarantovanoj tajnosti bolesničkog kartona koji će biti popunjavaan u toku studije i korišćen samo u svrhu unapređenja zdravlja ljudi.

Isto tako mi je rečeno da mogu da prekinem učešće u ispitivanju u svakom trenutku bez bilo kakvih posledica po moje lečenje.

Pristajem da učestvujem u ispitivanju radi poboljšanja i unapređenja zdravlja ljudi, bez bilo kakve materijalne naknade.

Potpis ispitanika: _____

U Subotici, dana: _____

PRILOG II

OPŠTA BOLNICA SUBOTICA
ODELJENJE INTERNO II, AMBULANTE ZA DIJABETES I NEFROLOGIJU
Ul. Izvorska 3.
24 000 SUBOTICA
VOJVODINA, REPUBLIKA SRBIJA

INFORMACIONI LIST

UTICAJ HOLEKALCIFEROLA U DOZAMA PRILAGOĐENIM SEZONSKIM VARIJACIJAMA NA PROTEINURIJU KOD BOLESNIKA SA DIJABETESNOM BOLESTI TIPA 2

U opštoj bolnici u Subotici u toku je ispitivanje koje se vrši na grupi bolesnika koji se kontrolišu i leče zbog dijabetesne bolesti tip 2, kao i kontrolnoj grupi ispitanika koji ne boluju od dijabetesne bolesti.

S obzirom da Vi bolujete od dijabetesa tip 2, ispunjavate uslove da budete uključeni u ovo ispitivanje. Obraćamo Vam se sa molbom da pažljivo pročitate ovo obaveštenje kako biste mogli da eventualno date Vašu saglasnost da učestvujete u ispitivanju, odnosno da dozvolite korišćenje podataka iz Vaše istorije bolesti.

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi učestalost nedostaka vitamina D kako u grupi osoba obolelih od dijabetesne bolesti tako i među onim osobama koje nemaju ovu bolest.

Vi biste bili uključeni u tzv. kontrolnu grupu ispitanika kod kojih se predviđa merenje krvnog pritiska, telesne težine i vađenje krvi radi standardnih laboratorijskih testova.

Iz učinjenih analiza ćete dobiti informaciju o stanju Vašeg zdravlja kao i o nivou vitamina D u Vašem organizmu.

Ispitivanje koje vršimo u svrhu ovog rada nije štetno po Vaše zdravlje, besplatno je i zagarantovana je potpuna tajnost Vaših podataka. Podaci iz bolesničkih kartona će se upotrebiti isključivo u naučne svrhe.

Vaše učešće u ovom istraživanju je potpuno dobrovoljno.

Ukoliko želite da učestvujete u ovom istraživanju molimo Vas da potpišete ponuđeni obrazac.

Za sve detaljnije informacije se obratite dr Tatjani Stojšić Vuksanović koja je rukovodilac ovog ispitivanja.

Rukovodilac ispitivanja

Mr. sci dr med Tatjana Stojšić Vuksanović

TEKST INFORMISANOG PRISTANKA ISPITANIKA

Ja dole potpisani/a, upoznat sam sa ispitivanjem koje će se obaviti u Opštoj Bolnici u Subotici.

Pročitao/la sam informacije o ispitivanju i razgovarao sam sa rukovodiocem ispitivanja. Jasan mi je detaljan postupak ispitivanja.

Ovim potpisom dobrovoljno pristajem da učestvujem u ispitivanju kao i da se podaci koje sam dao/la u razgovoru sa lekarom (koji su neophodni za ispitivanje) koriste u tu svrhu.

Detaljno sam informisan/na o zagarantovanoj tajnosti bolesničkog kartona koji će biti popunjavan u toku studije i korišćen samo u svrhu unapređenja zdravlja ljudi.

Isto tako mi je rečeno da mogu da prekinem učešće u ispitivanju u svakom trenutku bez bilo kakvih posledica po moje lečenje.

Pristajem da učestvujem u ispitivanju radi poboljšanja i unapređenja zdravlja ljudi, bez bilo kakve materijalne naknade.

Potpis ispitanika: _____

U Subotici, dana: _____

PRILOG III

Curriculum Vitae

LICNI PODACI	Ime i prezime	Tatjana Stojšić Vuksanović	
	Prebivalište	24 000 Subotica	
	Zanimanje	Internista, nefrolog OB Subotica	
OBRAZOVANJE	Naziv fakulteta i mesto	Medicinski fakultet, Beograd	1978.
	Godina diplomiranja	1984.	
	Titula	doktor medicine	
	Specijalizacija, koje godine	Interna medicina, VMA Beograd	1990-1994
	Subspecijalizacija i godina	Nefrologija, Medicinski fakultet Beograd	1995-1996
	Magistratura i godina magistriranja	Magisterijum iz nefrologije, Medicinski fakultet, Beograd	1999.
	Doktorat i godina doktorata	Upisana na III godinu doktorskih studija Medicinski fakultet Novi Sad	2016/17.
	Stručno	specijalista interne medicine, subspecijalista nefrologije	
ZVANJE	Naziv ustanove – Radno mesto – Vreme (od-do)	1985.-1987. Hitna Pomoć Subotica	
	Naziv ustanove – Radno mesto – Vreme (od-do)	1988 – Opšta bolnica Subotica	
	Naziv ustanove – Radno mesto – Vreme (od-do)	Načelnik Internog II (nefrologija, endokrinologija sa dijabetologijom i reumatologija) od 2011.	
		<p>1.Stojšić Vuksanović T, Knežević V. Impact of vitamin D3 correction on new chronic inflammation markers: neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio in patient with vitamin D3 deficiency and diabetes type 2/diabetic nephropathy.Int. J. Adv. Res. 2020.8(01),938-51. M52</p>	
		<p>2.Stojšić Vuksanović T, Knežević V. Spontaneous rupture of renal cell carcinoma in anuric patient on automated peritoneal dialysis. Vojnosanit Pregl. 2019;76(1):72-5. M23</p>	
	<p>2.Tucic-Nemet K, Obradovic A, Stojšić-Vuksanovic T. Bone mineral density-only body mass matters in having strong bones? Problems of Endocrinology. 2017;1(63 Suppl 2):28. M34</p>		
	<p>3. Stojšić TS. Istorija nefrologije u Subotici. U: Đukanović Lj, urednik. Prilozi za istoriju nefrologije u Srbiji. Beograd: BIGZ; 2007. str. 220-3. M45</p>		
	<p>4. Stojšić TS. Bolesnici sa autosomno dominantnom policističnom bolešću bubrega lečeni hemodijalizama u Subotici. Novine u nefrologiji. 2001;6(1):129-31. M53</p>		

		<p>5. Stojšić TS. Stanje zdravlja i stepen rehabilitacije bolesnika lečenih hemodijalizama u Subotici. Novine u nefrologiji. 2001;6(2):181-3. M53</p> <p>6. Jurić TS, Djukanović Lj, Mostarica A, Pavović S. Immunomodulatory effect of high doses alphacalcidol in primary glomerular diseases. In: Abstracts of the Annual congress of the European Renal Association and the European Dialysis and Transplant Association; 1999 Sep 5-8; Madrid, Spain. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 120. M34</p>
	Predavanja na stručnim skupovima i konferencijama	<p>1. Mikroalbuminurija</p> <p>2. Anemija u HBI kod dijabetičkih bolesnika</p> <p>3. Transplantacija bubrega</p> <p>4. Peritonitisi kod CAPD bolesnika</p> <p>5. Rabdomioliza i akutna bubrežna insuficijencija nakon heroinsko-alkoholne zloupotrebe</p> <p>6. Bioprinteri</p> <p>7. Sekundarni hiperparatiroidizam</p> <p>8. Bubrežne bolesti i trudnoća</p> <p>9. Trudnoća u HBI</p> <p>10. Hipereozinofilni sindrom</p> <p>11. Dijabetična nefropatija</p> <p>12. Hemolitičko-uremijski sindrom</p> <p>10. Sindrom defragmentacije eritrocita sa ABI</p>
OSTALO	Članstvo u stručnim organizacijama	<p>Predsjednik DLV-SLD podružnica Subotica 2004.-2008.</p> <p>Predsednik Sekcije za nefrologiju DLV Novi Sad 2011.-2013</p> <p>član Etičkog odbora Srpskog lekarskog društva 2009-2011</p> <p>sudija Višeg suda časti Lekarske komore Srbije 2011-2015</p> <p>Udruženje nefrologa Srbije, ERA-EDTA, SLD...</p>
	Nagrade	Više nagrada SLD-a.
	Ostalo	Uvela primenu peritoneumske dijalize u OB Subotica 1997. Sertifikovani ajurvedski lekar
	Datum ispunjavanja	7.03.2020.

Mr.sc dr Tatjana S. Stojšić Vuksanović