

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**HEMIJSKI FAKULTET**



**Marija M. Seki -Ivankovi**

**STATUS I FUNKCIJA VITAMINA D I  
C-3 -EPIMERA  
25-HIDROKSIVITAMINA D<sub>3</sub>  
KOD TRUDNICA  
SA PREEKLAMPSIJOM I BEZ NJE  
I KOD NOVOROĐENADI**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY**



**Marija M. Ieki -Ivankovi**

**STATUS AND FUNCTION OF  
VITAMIN D AND C-3 EPIMER  
OF 25-HYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub>  
IN MOTHERS WITH AND WITHOUT  
PREECLAMPSIA AND THEIR INFANTS**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2016**

**Mentori:**

**dr Ljuba Mandi** ,  
redovni profesor Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

**dr Marija Glibeti** ,  
nau ni savetnik Instituta za medicinska  
istraživanja Univerziteta u Beogradu

**lanovi Komisije za odbranu:**

**dr Ljuba Mandi** ,  
redovni profesor Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

**dr Miroslav M. Vrvi** ,  
redovni profesor Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

**dr Marija Glibeti** ,  
nau ni savetnik Instituta za medicinska  
istraživanja Univerziteta u Beogradu

**Datum odbrane doktorske teze:**

*Redovnom profesoru, dr Ljubi Mandi , izražavam duboko poštovanje i veliku zahvalnost za ogromno poverenje i strpljenje, datu slobodu u izboru teme, vredne savete, nesebi nu pomo i podršku. Radost je pored nauke biohemije u iti od nje i nauku života sve ove godine.*

*Dr Mariji Glibeti najiskrenije se zahvaljujem što je prepoznala u meni istraživa ki duh i izloživši me izvanrednim profesionalnim prilikama i iskustvima uticala na moj životni put i poziv. Zahvalna sam što me je uvela u oblasti nauke o hrani i ishrani imaju i puno poverenja, strpljenja i pravih re i u mnogobrojnim izazovima. Posebno hvala za nesebi nu sveobuhvatu podršku.*

*Redovnom profesoru dr Hope Weiler sa McGill Univerziteta u Kanadi beskrajno sam zahvalna što me je primila u svoju laboratoriju kao gostuju eg studenta i prihvatila kao majka-ma eha mentorstvo i staranje o meni. Zahvalna sam što me uvela u svet nauke o vitaminu D i dala mi priliku da u im od nje i kre em se u prestižnim nau nim krugovima. Njeno aktivno u eš e u osmišljavanju i izvo enju najve eg dela eksperimentalnog rada, tuma enje i prezentovanje dobijenih rezultata i nesebi no zalaganje omogu ili su da ova teza bude završena. Prenošenjem bogatog iskustva i razvijanjem svesti o odgovornosti u nau nom radu pokazala mi je kako se samo ogromnim trudom, radom i požrtvovanjem ostvaruje i naizgled nemogu e.*

*Zahvaljujem se profesoru dr Miroslavu M. Vrvi u na vremenu i razumevanju tokom pisanja ove teze i dr Vesni Aleksic Veli kovi na uzorcima pacijenata.*

*Zahvalna sam dr Jovani Kalu erovi , mom prijatelju, u itelju i saborcu na pomo i, podršci i veri u mene. Hvala za preporuke koje su mi otvorile vrata na McGill-u.*

*Veliko hvala svim majkama i bebama i dobrovoljcima, uklju uju i i moje prijatelje, koji su u estvovali u studijama prikazanim u okviru ove disertacije.*

*Kolegama i prijateljima Marini Nikoli , dr Mirjani Gurinovi , dr Aleksandri Koni Risti , dr Mariji Rani , dr Vesni Jovanovi , dr Katarini Šavikin, dr Gordani Zdunji , Petru Popadi u, Ivanu Vasovi u, Paula Lavery i Sherry Agellon zahvaljujem se na pomo i i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije kao i svim kolegama sa Instituta za medicinska istraživanja i klinike Mary Emily Clinical Nutrition Research Unit.*

*Od srca se zahvaljujem porodici Ivankovi , ujaku Zoranu, svojim prijateljima u Montrealu i u Srbiji i mojim kumama Tijani, Teodori, Mariji i Jeleni na podršci, ljubavi i poverenju.*

*Blгодарim za radost, ljubav i sve što jesam danas mojim roditeljima, bratu Marku i Aleksandri i svim precima u potrazi za ve nom Istinom. Zahvalna sam što postoje i što su moji.*

*Beskrajno hvala za sve mojoj voljenoj porodici; Marku, oveku mom i mužu, uz iju se neizmernu ljubav, podršku, razumevanje i strpljenje ostvaruju snovi i otkrivaju novi svetovi;*

*I Mili, zenici oka mog.*

**STATUS I FUNKCIJA VITAMINA D I C-3 -EPIMERA 25-  
HIDROKSIVITAMINA D<sub>3</sub> KOD TRUDNICA SA PREEKLAMPSIJOM  
I BEZ NJE I KOD NOVOROĐENADI**

**Apstrakt**

Vitamin D je od izuzetne važnosti u trudno i pre svega za normalan rast kostiju i za celokupan razvoj bebe. Pokazano je me utim da 40-80 % trudnica ima nizak nivo (< 20 ng/ml) 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) u serumu kao i da nizak nivo vitamina D u trudno i pove a va rizik za pojavu preeklampsije (PE) i prevremenih poro aja. U Srbiji, gde hrana nije oboga ena vitaminom D, stopa preeklampsije je ve a u zimskom periodu. Odgovor na suplemenatciju vitaminom D dodatno se usložnjava prisustvom C-3 -epimera 25(OH)D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>), iji udeo u ukupnom nivou 25(OH)D u krvi može biti i do 60 % kod beba, a do 17 % kod odraslih. Prisustvo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pup ane vrpce ukazuje da postoji prenos sa majke na novoro den e. Me utim, i dalje je nepoznato koja je uloga povišenog nivoa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod novoro den adi, kako se nivo menja tokom prvih nedelja života novoro den adi kao i kakav efekat 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> ima na rast kostiju beba ro enih iz fizioloških trudno a u odnosu na trudno e sa komplikacijama kao što je preeklampsija. Stoga su ciljevi ove teze: 1) validacija upitnika o u estalosti konzumiranja namirnica (WRH-FFQ) koji bi omogu io procenu unosa vitamina D kod mladih žena u reproduktivnom dobu u Srbiji; 2) sagledavanje povezanosti niskog unosa i statusa vitamina D sa pojavom preeklampsije, kao i odre ivanje udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom sadržaju 25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na zdravstvene ishode majki i novoro den adi; 3) odre ivanje nivoa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom prvih nedelja života novoro den adi i sagledavanje njegovog efekta na rast kostiju beba ro enih iz fizioloških trudno a u odnosu na trudno e sa komplikacijama kao što je preeklampsija; i 4) ispitivanje biološkog odgovora kostiju na izloženost endogenom i egzogenom izvoru 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na animalnom modelu.

Studija validacije upitnika WRH-FFQ za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u reproduktivnom dobu u Srbiji izvedena je od novembra do aprila, kada je smanjeno UVB zra enje. Upitnik WRH-FFQ adekvatno su popunile 422 žene od kojih su nasumi no odabrane 44 žene uklju ene u dalji proces validacije, koji je obuhvatao tri vremenski odvojena popunjavanja anketa dvadeset etvoro asovne ishrane (24h-AI), antropometrijsko merenje i uzorkovanje krvi. Sadržaj ukupnog 25(OH)D u krvi

(biomarker) određeno je kod 23 žena. Usaglašenost rezultata unosa vitamina D ispitivana je pomoću Bland-Altman-ovih plotova i koeficijentna korelacije između primenjenih metoda. Koeficijent validacije izrađen metodom trijada. Unos vitamina D procenjen pomoću WRH-FFQ (srednja vrednost  $\pm$  SD) bio je  $4.0 \pm 3.3$   $\mu\text{g/d}$  za sve u esnice i  $3.14 \pm 2.3$   $\mu\text{g/d}$  za podgrupu od 44 žene. Bland-Altman-ovi plotovi pokazali su visoko slaganje za procenjen unos vitamina D. Koeficijenti korelacije između podataka WRH-FFQ i 24h-AI, WRH-FFQ i biomarkera, 24h-AI i biomarkera bili su 0.686, 0.422, i 0.404, redom. Koeficijenti validacije (95 % intervali pouzdanosti) za WRH-FFQ, 24h-AI i biomarker u plazmi bili su 0.847 (0.564-0.928), 0.810 (0.537-0.997) i 0.499 (0.190-0.840), redom. Dobijeni rezultati potvrdili su potencijal WRH-FFQ upitnika da adekvatno proceni unos vitamina D žena u Srbiji, gde nije obavezno obogaćivanje namirnica vitaminom D.

Tokom zimskih meseci u Srbiji, 60 trudnica sa preeklampsijom (PE grupa) i bez nje (kontrolna grupa) uključene su u studiju i popunile WRH-FFQ upitnik. U uzorcima krvi majki i krvi iz pupane vrpce, sakupljenih na porođaju, određene su koncentracije 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> i 24,25-dihidroksivitamina D<sub>3</sub> (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) primenom LC-MS/MS, kao i koncentracija 1,25-dihidroksivitamina D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D) u krvi majki. Razlike su testirane pomoću miksmodela ANOVA i Bonferroni post hoc testova ( $p < 0.05$ ). Porođajne žene sa PE bile su u ranijem gestacionom dobu u odnosu na kontrolnu grupu. Procenjeni unos vitamina D bio ispod preporučenog dnevnog unosa skoro kod svih trudnica. Između PE i kontrolne grupe nije nađena statistički značajna razlika u unosu vitamina, koji se kretao u rasponu od 38 do 650 IU/dan. Grupa sa PE je imala značajno nižu koncentraciju ukupnog 25-OH-D (PE grupa:  $11.2 \pm 5.1$ ; kontrolna grupa:  $16.1 \pm 5.7$  ng/mL;  $p = 0.0006$ ), 25-OH-D<sub>3</sub> (PE grupa:  $10.0 \pm 4.9$ ; kontrolna grupa:  $14.2 \pm 5.8$  ng/mL;  $p = 0.002$ ), 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> (PE grupa:  $0.5 \pm 0.2$ ; kontrolna grupa:  $0.7 \pm 0.2$  ng/mL;  $p = 0.0007$ ) i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D (PE grupa:  $56.5 \pm 26.6$ ; kontrolna grupa:  $81.0 \pm 25.7$  pg/mL;  $p = 0.018$ ) u plazmi, dok u koncentraciji 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nije bilo značajne razlike među grupama. Za razliku od majki, obe grupe novorođenadi imale su slične koncentracije ukupnog 25-OH-D, 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> i 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi, ali je kod novorođenadi koje su majke imale PE primećen povećan sadržaj 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub>, izražen kao procenjeni udeo u ukupnom sadržaju 25-OH-D<sub>3</sub> (PE grupa:  $7.9 \pm 1.1$ ; kontrolna grupa:  $7.0 \pm 1.4$ ;  $p = 0.005$ ). Vrednosti ukupnog sadržaja 25-OH-D niže od 12 ng/mL, koje ukazuju na nedostatak vitamina D, uočene su kod 47% svih ispitanih trudnica i 77%

novorođenadi. Ovi podaci isti u potrebu za suplementacijom vitaminom D u trudno i i za razmatranjem obaveznog obogaćivanja namirnica vitaminom D u Srbiji.

Preliminarna studija, sprovedena u Kanadi, uključila je majke sa preeklampsijom i bez nje i njihovu novorođenadu rođenu prevremeno (PE=7, kontrolna grupa=12). U uzorcima plazme majki (uzetih neposredno pre porođaja) i novorođenadi (uzetih na kraju prve i pete nedelje postpartalno) određene su koncentracije 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> i 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pomoću LC-MS/MS. Promene u sadržaju metabolita vitamina D tokom prvih 5 nedelja života novorođenadi poređene su sa parametrima koštane mase, određenim pomoću absorpcionometrije X zraka (DXA), u procenjenom punom terminu. Sva novorođenad uključena u studiju rođena su pre 32 nedelje gestacije (29.0 ± 1.5 nedelje gestacije) sa telesnom masom manjom od 1500 g (1144.5 ± 244.4 g). Povećan unos vitamina D tokom pet nedelja suplementacije holekalciferolom odrazio se na koncentraciju ukupnog 25-OH-D<sub>3</sub> (Nedelja 1: 18.1 ± 7.1 vs Nedelja 5: 25.3 ± 10.6 ng/ml, p=0.02), kao i 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> (Nedelja 1: 5.1 ± 4.2 vs Nedelja 5: 20.0 ± 15.9 ng/ml, p<0.0001). U posmatranom vremenskom periodu koncentracija 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi nije se značajno menjala (Nedelja 1: 0.9 ± 0.5 vs Nedelja 5: 0.7 ± 0.5 ng/ml, p=0.13) ukazujući na nezrelost CYP24A1 (enzima koji katalizuje reakciju hidroksilacije na C-24 položaju) kod prevremeno rođene novorođenadi, koja se ogleda u njenoj nepotpunoj aktivnosti. Utvrđena slaba korelacija između koncentracije 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> u plazmi novorođenadi i povećanog mineralnog sadržaja i gustine pršljenova L1-4, ukazuje na potencijalne pozitivne efekte povećane koncentracije 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> na gustinu i mineralni sastav kostiju kičmenog stuba.

U cilju razumevanja biološkog odgovora kostiju na 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> na Sprague Dawley pacovima (4 nedelje stari, n=6/grupa/pol) u 0., 4. i 8. nedelji praćena je zavisnost promena telesne mase, biohemijskih parametara i gustine lumbalnog L3 pršljena (BMD pomoću DXA), od sadržaja endogenog i egzogenog 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub>. Pacovi su podeljeni u 6 grupa i hranjeni kontrolnom AIN-93G dijetom (1 IU holekalciferola/g dijetete) ili eksperimentalnim dijetama, tokom osam nedelja: holekalciferol od 2 i 4 IU/g dijetete, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> od 0.5 i 1 IU/g dijetete ili 25(OH)D<sub>3</sub> (0.5 IU/g dijetete). Kosti L3 pršljena snimane su *in vivo* u nultoj i osmoj nedelji i *ex vivo* pomoću mikrokomputerizovane tomografije. Telesna masa i unos hrane nisu se značajno razlikovali između grupa.

Endogeno stvaranje 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod mladih pacova izloženih dijetama sa holekalciferolom bilo je dozno zavisno (24.7 ±17.1 ng/mL vs 5.3 ±1.4 ng/mL, p=0.001), sa izraženijim efektom kod ženki u odnosu na mužjake. Izloženost egzogenim izvorima 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, konzumacijom dijeta sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (0.5 i 1 IU/g dijetete) dovelo je do brzog porasta njegove koncentracije (p<0.0001), a smanjenja koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u pore enju sa pacovima hranjenim dijetom sa 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub>. U osmoj nedelji, supresivni efekat dijeta sa 0.5 i 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na PTH (364.1 ± 222.3 i 294.6 ± 135.8 vs 750.5 ± 372.2 pg/mL, p=0.019) uo en je kod mužjaka pacova. Mineralna gustina L3 vBMD bila je pove ana u osmoj nedelji kod mužjaka, koji su hranjeni dijetom sa 0.5 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, u odnosu na one hranjene sa 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub>, bez zna ajnih razlika u biomarkerima kostiju (iCa, CTX, RANKL i OPG) me u njima. Ve a koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi podržavala je normalan razvoj kostiju kroz adekvatnu mineralizaciju i gustinu kostiju.

U okviru ove doktorke disertacije kreiran je i validiran upitnik o u estalosti konzumiranja namirnica WRH-FFQ za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji, gde hrana nije dodatno oboga ena vitaminom D. Ove studije su obezbedile nove podatke o unosu i statusu vitamina D kod novoro en adi i mladih žena u Srbiji. Tako e, prošireno je znanje o fiziologiji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod preveremeno rođenih beba i njihovih majki sa i bez preeklampsije. Kona no, rezultati studije na animalnom modelu doprineli su saznanjima o biološkom poreklu i uticaju 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na rast kostiju i vredni su za dalja ispitivanja zna aja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kao biomarkera statusa vitamina D, naro ito uzimaju i u obzir da trenutno ne postoje smernice za interpretaciju sadržaja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pacijenata.

**Klju ne re i:** status vitamina D, metaboliti vitamina D, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, preeklampsija, trudno a, krv majki i pup ane vrpce, kosti, unos vitamina D, validacija upitnika o u estalosti konzumiranja namirnica, reproduktivno zdravlje žena, mladi pacovi, dozno zavisni odgovor, LC-MS/MS

**Nau na oblast:** Biohemija

**Nau na disciplina:** Medicinska biohemija i vitamini

**UDK broj:** 577.161.2



**STATUS AND FUNCTION OF VITAMIN D  
AND C-3 -EPIMER OF 25-HYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub>  
IN MOTHERS WITH AND WITHOUT PREECLAMPSIA AND THEIR  
INFANTS**

**Abstract**

Vitamin D exposure during pregnancy is important for skeletal growth and development in the offspring. However, 40-80% of expecting mothers have low (< 20 ng/ml) serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) level . A recent meta-analysis demonstrated that low vitamin D status in pregnancy increases the risk of preeclampsia (PE) and preterm birth. In Serbia where there is no mandatory vitamin D food fortification policy, rates of PE are higher in winter. Response to vitamin D supplementation is complicated by the presence of C-3 epimer of 25(OH)D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>) representing up to 60% of total 25(OH)D in infants and 17% in adults, raising questions regarding its biological derivation and function. The presence of cord 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> suggests maternal-fetal transfer. However, it is still unknown whether 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> increases in the first few weeks after birth and how it effects bone mineral accretion in infants of healthy and complicated pregnancies. Therefore, sequential objectives of this thesis are to: 1) validate a food frequency questionnaire (WRH-FFQ) for assessing vitamin D intake in young women of reproductive age in Serbia; 2) determine if low vitamin D intake and status is associated with PE in Serbia; and describe the proportion of total 25(OH)D in the 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> form in relation to maternal and neonatal outcomes; 3) establish if 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> in preterm and term infants of mothers with and without PE is predictive of bone mass at term age using a nested case *vs.* control design; and 4) test the biological response of bone to endogenous and exogenous 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> in an animal model.

The Women and Reproductive Health FFQ (WRH-FFQ) was completed by 422 women. A cross-sectional study, was conducted from November to April when UVB in Serbia is minimal. On a representative sub-sample (n=44) three 24 hour dietary recalls and anthropometric parameters were collected. Fasting blood samples for vitamin D biomarkers analyses were available for 23 women. Correlation coefficients were

calculated between each of the dietary methods and Bland-Altman plots were constructed. Validity coefficients, as a correlation between measured and estimated 'true' exposure, were calculated using the method of triads. The WRH-FFQ estimates of vitamin D intake (mean  $\pm$  SD) for all participants were  $4.0 \pm 3.3$   $\mu\text{g/d}$  and  $3.14 \pm 2.3$   $\mu\text{g/d}$  for the sub-group. Bland-Altman plots for these intakes showed high agreement. Validity coefficients (95% CI) of the WRH-FFQ, 24 hour recall and biomarkers were QI 0.847 (0.564-0.928), RI 0.810 (0.537-0.997) and BI 0.499 (0.190-0.840) while the correlation coefficients were 0.686, 0.422, and 0.404. The obtained results approved WRH-FFQ as a valid tool for assessing dietary vitamin D intake in women living in Serbia, a region without mandatory vitamin D food fortification.

During the winter months in Serbia, sixty pregnant women with (PE) and without (control) preeclampsia were recruited at delivery when maternal and cord blood were collected followed by WRH-FFQ. Blood samples were analyzed for plasma 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) by LC-MS/MS and maternal 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D). Differences between groups were tested with ANOVA and Bonferroni post hoc tests ( $p < 0.05$ ). Women with preeclampsia delivered infants at an earlier gestational age. Exogenous vitamin D intake (38-650 IU/d) was under recommended value and was not significantly different between groups. Women with PE had significantly lower total plasma 25-OH-D (PE:  $11.2 \pm 5.1$ ; control:  $16.1 \pm 5.7$  ng/mL;  $p = 0.0006$ ), 25-OH-D<sub>3</sub> (PE:  $10.0 \pm 4.9$ ; control:  $14.2 \pm 5.8$  ng/mL;  $p = 0.002$ ), 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> (PE:  $0.5 \pm 0.2$ ; control:  $0.7 \pm 0.2$  ng/mL;  $p = 0.0007$ ) and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D (PE:  $56.5 \pm 26.6$ ; control:  $81.0 \pm 25.7$  pg/mL;  $p = 0.018$ ) while 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was not different between groups. Infants were not different in total plasma 25-OH-D, 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> but the proportion of 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> was higher in the infant PE group (PE:  $7.9 \pm 1.1$ ; control:  $7.0 \pm 1.4$  % of total 25-OH-D<sub>3</sub>;  $p = 0.005$ ). A high prevalence of vitamin D deficiency, as defined by plasma 25-OH-D  $< 12$  ng/mL, was observed in 47% of all mothers and 77% of all infants. These data underscore the need for prenatal vitamin D supplementation and a food fortification policy in Serbia.

A small case-control study of mothers from Canada with and without PE and their preterm (PE=7, control=12) infants were used to measure plasma 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-

OH-D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) by LC-MS/MS. Plasma samples were obtained at the end of the first (wk1) and fifth (wk5) week after birth. Changes in vitamin D metabolites between preterm birth and estimated term age were used to predict bone mass at term age as measured using dual-energy x-ray absorptiometry while accounting for dietary and anthropometric characteristics. Differences over time were tested using ANOVA and Bonferroni post hoc test, p<0.05. For nineteen infants, born before 32 weeks of gestation and <1500 g, were included in the study. Mean gestational age at birth was 29.0 ± 1.5 weeks and birth weight 1144.5 ± 244.4 g. Total vitamin D intake increased (after supplementation with cholecalciferol) over time and increases were observed in vitamin D status based on plasma 25-OH-D<sub>3</sub> concentration over the first 5 weeks (wk1: 18.1 ± 7.1 vs wk5: 25.3 ± 10.6 ng/ml, p=0.02) as well as in 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> (wk1: 5.1 ± 4.2 vs wk5: 20.0 ± 15.9 ng/ml, p<0.0001). Over the same time-period 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (wk1: 0.9 ± 0.5 vs wk5: 0.7 ± 0.5 ng/ml, p=0.13) was not significantly changed. This work showed that 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> increased over the first 5 weeks in parallel with increases of 25-OH-D<sub>3</sub> while 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was relatively stable suggesting the CYP24A1 activity does not readily mature during 5 weeks postnatally in prematurely born infants. In addition increase of 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> was positively correlated with increase of bone mineral density and bone mineral content of L1-4 at estimated term age of preterm infants.

To test if increasing cholecalciferol results in a dose-response in plasma 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> content, weanling rats (4 wk, n=6/group/sex) were fed a control AIN-93G diet (1 IU cholecalciferol /g diet) or an experimental diet for 8 wk: cholecalciferol at 2 or 4 IU/g diet, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> at 0.5 or 1 IU/g diet or 25(OH)D<sub>3</sub> (0.5 IU/g diet). Measurements at wk 0, 4 and 8 included growth, vitamin D metabolites, bone biomarkers and bone mineral density (BMD, using dual-energy x-ray absorptiometry). *In vivo* (wk 0 and 8) and *ex vivo* micro computed tomography (wk 8) scans provided volumetric BMD (vBMD). Differences among groups were identified using ANOVA and Bonferroni tests with p<0.05. Weight and food intake were not different among groups. Elevated 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> was observed in females in the 4 IU cholecalciferol diet group (24.7 ± 17.1 ng/mL), compared to the control (5.3 ± 1.4 ng/mL, p=0.001). Rats in the 0.5 and 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> groups had increased 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> concentrations compared to the

25(OH)D<sub>3</sub> group (p<0.0001). In males at wk 8, parathyroid hormone (PTH) was significantly lower in both 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> groups compared to the 25(OH)D<sub>3</sub> group (364.1 ± 222.3 and 294.6 ± 135.8 vs 750.5 ± 372.2 pg/mL, p=0.019). Lumbar vertebra 3 cortical and total vBMD were higher with 0.5 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> vs 25(OH)D<sub>3</sub> group at wk 8. Endogenous 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> is generated dose-dependently in females, whereas pharmacological 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> relative to 25(OH)D<sub>3</sub> modestly reduces PTH in males. Overall endogenous and exogenous 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> support normal bone mineral accretion.

These studies generated novel data regarding vitamin D intake and status of young Serbian women and infants with important ramifications for public health policy. This work also expanded knowledge on the physiology of 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> in preterm and term infants and their mothers with and without PE. Lastly the biological origin and function of the 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> on bone mineral accretion in a young animal model will help authorities to decide whether the 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> should be considered when assessing vitamin D status.

**Key words:** preeclampsia, pregnancy, vitamin D status, maternal and cord blood, vitamin D metabolites, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, bone, vitamin D intake, food frequency questionnaire, validation, women reproductive health, weanling rats, dose-response trial, LC-MS/MS

**Scientific field:** Biochemistry

**Scientific discipline:** Medical Biochemistry and Vitamins

**UDC number:** 577.161.2

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	4
2.1. VITAMIN D .....	4
2.1.1. Endogena sinteza vitamina D .....	5
2.1.2. Egzogeni izvori vitamina D .....	6
2.1.3. Masno tkivo kao izvor D vitamina .....	9
2.2. Metabolizam vitamina D i njegova regulacija .....	10
2.3. C-3 $\alpha$ -epimer 25-hidroksivitamina D <sub>3</sub> .....	17
2.3.1. Metabolizam 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> .....	20
2.4. Status vitamina D .....	25
2.4.1. Metode za određivanje koncentracija 25(OH)D u krvi.....	26
2.5. Unos vitamina D- procena pomocu anketa ishrane .....	28
2.5.1. Anketa o dvadesetčetvorocasočnoj ishrani .....	29
2.5.2. Dnevnik ishrane .....	30
2.5.3. Upitnik o vrsti namirnica .....	30
2.5.4. Upitnik o istoriji ishrane .....	30
2.5.5. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica .....	30
2.5.6. Upitnik dnevnika ishrane sa merenjem namirnica.....	31
2.5.7. Validacija upitnika .....	32
2.6. Preporuke za vitamin D.....	34
2.6.1. Preporuke za unos vitamina D.....	34
2.6.2. Preporuke za status vitamina D .....	37
2.7. Nedostatak vitamina D .....	38
2.8. Vitamin D u trudnoći .....	41
2.8.1. Nedostatak vitamin D u trudnoći .....	42
2.9. VITAMIN D I PREEKLAMPSIJA .....	44
2.9.1. Preeklampsija: patofiziološki mehanizmi .....	44
2.9.2. Faktori rizika, prevencija i predviđanje preeklampsije .....	48
2.9.3. Terapija u preeklampsiji .....	50
2.9.4. Profilaksa preeklampsije .....	50
2.9.5. Potencijalni mehanizmi uticaja vitamina D na smanjenje rizika od preeklampsije .....	51
2.10. Uticaj vitamina D na mineralizaciju kostiju i na koštanu masu.....	54
2.11. Procena strukture kostiju i koštane mase .....	58
3. MATERIJAL I METODE.....	60
3.1. Hemikalije .....	60
3.2. Aparati .....	61
3.3. Upitnici za procenu unosa vitamina D .....	61
3.3.1. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica žena u reproduktivnom dobu .....	62
3.3.2. Dvadesetčetvorocasočna anketa ishrane .....	63
3.3.3. Procena unosa vitamina D na osnovu podataka iz upitnika .....	63
3.4. Antropometrijska merenja .....	64
3.5. <i>In vivo</i> ispitivanja na animalnom modelu .....	64
3.6. Dijete za studiju sa animalnim modelom .....	65
3.7. Uzorci krvi u humanim studijama .....	65

3.7.1. Uzorci krvi za procenu unosa vitamina D kod žena u reproduktivnom periodu u Srbiji - studija validacije upitnika WRH-FFQ .....	65
3.7.2. Uzorci krvi trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorodencadi – studija ispitivanja statusa vitamina D .....	66
3.7.3. Uzorci krvi trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorodencadi rođenih prevremeno - preliminarno ispitivanje statusa vitamina D .....	67
3.8. Uzorci krvi i kostiju u animalnoj studiji .....	67
3.8.1. Uzorci krvi životinja .....	68
3.8.2. Uzorci kostiju životinja .....	68
3.9. Metode za određivanje koncentracije metabolita vitamina D .....	68
3.9.1. Određivanje koncentracije ukupnog 25(OH)D u plazmi hemiluminiscentnom metodom.....	69
3.9.2. Određivanje koncentracije metabolita D vitamina LC-MS/MS metodom .....	70
3.9.3. Određivanje koncentracije 1,25–dihidroksivitamina D u plazmi .....	72
3.10. Standardne biohemijske analize .....	73
3.10.1. Pracenje standardnih biohemijskih parametara u humanim uzorcima .....	73
3.11. Određivanje koncentracije jona metala u humanim uzorcima plazme .....	74
3.12. Procena strukture, sastava i jacine kostiju kod mladih pacova .....	74
3.12.1. Snimanja kostiju <i>in vivo</i> pomocu DXA aparata .....	75
3.12.2. Snimanja kostiju <i>in vivo</i> pomocu $\mu$ CT aparata.....	76
3.12.3. Snimanja kostiju <i>ex vivo</i> pomocu $\mu$ CT aparata .....	77
3.12.4. Test fleksibilnosti kostiju u tri tacke.....	78
3.13. Obrada rezultata .....	79
3.14. Eticka odobrenja za izvođenje istraživanja .....	81
4. REZULTATI.....	82
4.1. Validacija upitnika o ucestalosti konzumiranja namirnica za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji (WRH-FFQ) .....	82
4.1.1. Karakteristike ucesnica u studiji .....	84
4.1.2. Rezultati procene unosa vitamina D preko konzumiranih namirnica.....	85
4.1.3. Korelacije podataka o unosu i statusu vitamina D, dobijenih primenom tri metode.....	88
4.1.5. Validacija WRH-FFQ upitnika metodom trijada .....	91
4.2. Ispitivanje unosa i statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i kod novorodencadi .....	93
4.2.1. Karakteristike trudnica i novorodencadi .....	94
4.2.2. Procena dijetarnog unosa trudnica .....	94
4.2.3. Status vitamina D kod trudnica i novorodencadi .....	98
4.3 Preliminarno ispitivanje statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorodencadi rođenih prevremeno .....	104
4.3.1. Karakteristike majki .....	104
4.3.2. Status vitamina D kod majki .....	105
4.3.3. Karakteristike novorodencadi .....	105
4.3.4. Status vitamina D kod novorodencadi .....	105
4.3.5. Rezultati pracenja unosa vitamin D, sadržaja njegovih metabolita .....	108
i parametara kostiju kod novorodencadi rođenih prevremeno, tokom prvih pet nedelja života .....	108
4.4 Ispitivanje uticaja C-3-aepimera 25-hidroksivitamina D <sub>3</sub> iz endogenih i	

egzogenih izvora na rast kostiju kod animalnog modela .....	112
4.4.1. Dijetetski unos i antropometrijski parametri .....	115
4.4.2. Metaboliti vitamina D .....	117
4.4.3. Biomarkeri metabolizma kostiju .....	121
4.4.4. Gustina i masa kostiju.....	121
4.4.5. Struktura i gustina kostiju .....	122
5. DISKUSIJA .....	132
5.1. Diskusija rezultata validacije upitnika o ucestalosti konzumiranja namirnica za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji (WRH-FFQ) .....	132
5.2. Unos i status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i kod novorodencadi .....	137
5.3 Preliminarno ispitivanje statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorodencadi rodenih prevremeno .....	144
5.3.1. Vitamin D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje .....	144
5.3.2. Status vitamina D kod novorodencadi rodenih prevremeno .....	147
5.4 Uticaj C-3a-epimera 25-hidroksivitamina D <sub>3</sub> iz endogenih i egzogenih izvora na rast kostiju kod mladih Sprague Dawley pacova .....	151
6. ZAKLJUČAK .....	157
7. LITERATURA .....	160

## **LISTA SKRA ENICA**

**ALT-** alanin transaminaza

**AST-** aspartat transaminaza

**AI-** Adekvatan unos (Adequate Intake)

**BMI-** Indeks telesne mase (Body Mass Index)

**BMD-** Mineralna gustina kosti (Bone Mineral Density)

**BMC-** Mineralni sadržaj kosti (Bone Mineral Content)

**CTX-** C-terminalni peptid kolagena tipa X

**CRP-** C reaktivni protein

**CI-** Interval pouzdanosti

**CV-** Koeficijent varijacije

**CYP27A1, CYP27B1, CYP24A1-** Izoenzimi citohrom P450

**DBP-** Vitamin D vezuju i protein (Vitamin D binding protein)

**DRI-** Referentni dnevni unos (Dietary Reference Intake)

**DEQAS-** Program eksterne procene kvaliteta odre ivanja vitamina D (Vitamin D External Quality Assessment Scheme)

**DXA-** Dvostruko energetska apsorpciometrija X zraka ( Dual Energy X-ray Absorptiometry)

**EAR-** Procenjene prose ne potrebe (Estimated Average Requirements)

**IOM-** Ameri ki Medicinski Institut (Institute of Medicine)

**IU-** Internacionalne jedinice (International Unit)

**FFQ-** Upitnik o u ustalosti konzumiranja namirnica (Food Frequency Questionnaire)

**FGF-23-** Faktor rasta fibroblasta 23

**GAMA GT-** Gama glutamil transferaza

**HELLP sindrom-** Hemoliza udružena sa pove anjem enzima jetre i smanjem broja trombocita (Hemolysis Elevated Liver Enzymes Low Platelets Sindrom)

**HSDs-** Hidroksisteroid dehidrogenaza

**LC/MS/MS-** Tehnika hromatografija u tandemu sa masenom spektrometrijom

**NIST-** Ameri ki nacionalni institut za standarde i tehnologiju (National Institute of Standards and Technology)

**OC-** Osteokalcin

**OPG-** Osteoprotegerin



**PE**- Preeklampsija

**PTH**- Paratiroidni hormon

**pQCT**- Periferna kvantitativna kompjuterizovana tomografija

**RXR<sub>s</sub>**- Retinoid X receptor

**RANKL**- receptor aktivatora nuklearnog faktora kapa B liganda (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)

**UL**- Dozvoljena gornja granica unosa (Upper limit)

**UVB**- Ultraljubiasto beta zračenje

**VDP**- Vitamin D vezujući protein

**VEGF**- Vaskularno endotelni faktor rasta

**VDR**- Vitamin D receptor

**VDREs**- Elementi odgovoravitamin D (Vitamin D response elements)

**VTD<sub>2</sub>**- Vitamin D<sub>2</sub> ergokalciferol

**VTD<sub>3</sub>**- Vitamin D<sub>3</sub> holekalciferol

**WB BMC**- Mineralni sadržaj kosti celog tela (Whole Body Bone Mineral Content)

**WHO**- Svetska Zdravstvena Organizacija (World Health Organisation)

**WRH-FFQ**- Upitnik o uestalosti konzumiranja namirnica za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji (Women Reproductive Health Food Frequency Questionnaire)

**μCT**- Mikrokompjuterizovana tomografija

**QI**- Koeficijent validacije upitnika o uestalosti konzumiranja namirnica

**rQB**- Koeficijent korelacije upitnika o uestalosti konzumiranja namirnica i biomarkera

**rQR**- Koeficijent korelacije upitnika o uestalosti konzumiranja namirnica i ankete ishrane

**rBR**- Koeficijent korelacije biomarkera i ankete ishrane

**24h-AI**- anketa dvadesetčetvoročasovne ishrane (24h recall)

**25(OH)D**- 25 hidroksivitamin D

**25(OH)D<sub>3</sub>**- 25 hidroksivitamin D<sub>3</sub>

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**- 1,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub>

**1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>**- Kalcitriolna kiselina

**C-3 epi 25(OH)D<sub>3</sub>**- C-3 alfa epimer 25 hidroksivitamina D<sub>3</sub>

**24, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**- 24,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub>

## **1. UVOD**

Preeklampsija (PE) je komplikacija koja se javlja u trudno i i koju karakteriše nastanak hipertenzije. Ina 2–8 % svih komplikacija u trudno i i uzrok je smrti majki u 16 % slučajeva. Prema studiji sprovedenoj od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) u 24 zemlje u razvoju utvrđena je učestalost preeklampsije i eklampsije u iznosu od 4 %. Preeklampsija, kao poremećaj povezan sa placentom, može dovesti do zastoja u intrauterinom razvoju i do prevremenog porođaja, što može ugroziti zdravlje novorođenadi. I pored svih ovih činjenica, etiologija preeklampsije je i dalje nepoznata, dok patofiziologija uključuje razvoj hipertenzije. U patogenezi preeklampsije uključeni su brojni fiziološki procesi na koje može uticati status vitamina D i dostupnost prekursora, 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>), za sintezu aktivnog metabolita 1,25-dihidroksivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Zaključak dva revijska rada sistematskog pregleda literature, koja uključuju 25 studija, je da neadekvatan status vitamina D (definisano kao sadržaj 25(OH)D < 20 ng/mL) tokom trudnoće povećava rizik za nastanak preeklampsije. Nedavna meta-analiza je takođe potvrdila da žene, kojima je nivo 25(OH)D<sub>3</sub> u serumu manji od 20 ng/mL (50 nmol/L), u trudnoći imaju povećan rizik za razvoj preeklampsije, za prevremeni porođaj i novorođenad malu za gestacionu starost. Međutim, kako su skoro sve studije uključene u meta-analizu, bile sprovedene u zemljama koje obogaćuju namirnice vitaminom D, pitanje je da li ovi zaključci važe za trudnice u zemljama u kojima se hrana ne obogaćuje ovim vitaminom.

U Srbiji, gde hrana nije obogaćena vitaminom D, stopa preeklampsije je veća u zimskom periodu, kada je endogena sinteza vitamina D usled smanjenog intenziteta ultravioletnog zračenja (UVB) minimalna. Pored toga, namirnice bogate vitaminom D su u Srbiji slabo prisutne u prodaji, a i upotreba suplemenata vitamina D je retka među odraslim osobama. Odgovor na suplementaciju vitaminom D dodatno se usložnjava prisustvom C-3 - epimera 25(OH)D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>), koji udeo u ukupnom sadržaju 25(OH)D može biti i do 60 % kod beba, a kod odraslih do 17 %. Iako je prošlo nekoliko godina od otkrića 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, njegova funkcija do danas nije poznata. Prisustvo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pupčane vrpce sugeriše da postoji prenos sa majke na novorođenad. Međutim, još uvek nema odgovora na pitanja: zašto je koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> povećana kod novorođenadi, da li nivo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> raste tokom prvih nedelja života

novorođenadi i kakav je efekat 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na rast kostiju beba rođenih iz fizioloških trudnoća u odnosu na trudnoće sa komplikacijama kao što je preeklampsija.

Predmet rada ove teze je istraživanje unosa i statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i kod njihovih novorođenadi, kao i određivanje udela epimera u ukupnom 25(OH)D<sub>3</sub>, u odnosu na zdravstvene ishode majki i novorođenadi. Pored toga, predmet istraživanja teze je određivanje nivoa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom prvih nedelja života novorođenadi i sagledavanje njegovog efekta na rast kostiju beba rođenih iz fizioloških trudnoća u odnosu na trudnoće sa komplikacijama kao što je preeklampsija. Takođe i na animalnom modelu biti ispitan biološki odgovor kostiju na izloženost endogenom i egzogenom izvoru 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>.

Procena unosa vitamina D kod žena u reproduktivnom periodu, posebno u zimskom periodu kada je endogena sinteza vitamina D minimalna, je važan parametar u zaštiti zdravlja. Budući da na prostoru centralne i istočne Evrope ne postoji validirani upitnik o ustalosti konzumiranja namirnica koje sadrže vitamin D, prvi cilj ove teze je validacija upitnika o ustalosti konzumiranja namirnica (FFQ) koji bi omogućio procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji. Primenom ovog upitnika dobijaju se podaci o unosu i statusu vitamina D kod mladih žena u Srbiji u reproduktivnom dobu i novorođenadi, koji mogu biti osnova za razmatranje neophodnosti dodatne suplementacije i obogaćivanja namirnica vitaminom D. Time rezultati ove teze mogu imati uticaj na preporuke Ministarstva javnog zdravlja u Srbiji.

Pretpostavka je da žene sa preeklampsijom i njihova novorođenad imaju niži status vitamina D (ukupni 25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub> i C-3-epimer 25(OH)D<sub>3</sub>), u poređenju sa zdravim trudnicama i bebama rođenim iz fizioloških trudnoća bez komplikacija. Stoga je cilj teze sagledavanje povezanosti niskog unosa i statusa vitamina D sa pojavom preeklampsije, kao i određivanje udela C-3-epimera u ukupnom sadržaju 25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na zdravstvene ishode majki i novorođenadi. Time se utvrditi da li je uzrok povećanja stope preeklampsije u Srbiji u zimskom periodu, u odnosu na druga godišnja doba, posledica ishrane i na inačice života trudnica, pored smanjenog intenziteta UVB zračenja.

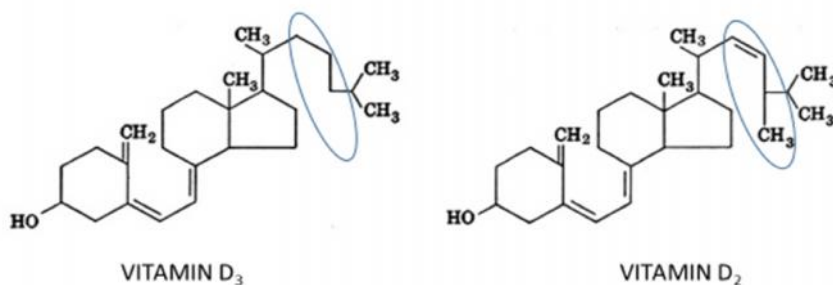
Dodatno, analiza sadržaja ukupnog 25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub> i udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod prevremeno rođenih beba ima za cilj sagledavanje uloge 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, odnosno da se utvrdi da li se razlike u njegovom sadržaju mogu primenjivati za predviđanje rasta koštane mase u vremenu punog termina trudnoće. Određivanjem udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom sadržaju 25(OH)D proširuje se znanje o funkciji ovog, nedavno otkrivenog epimera kod prevremeno rođenih beba i njihovih majki sa preeklampsijom i bez nje, i sagledava promena koncentracije epimera kod novorođenadi tokom prvih nekoliko nedelja života.

U cilju razumevanja biološkog odgovora kostiju na 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na animalnom modelu (Sprague Dawley pacovi) proučena je zavisnost težine, mineralne gustine kostiju i biohemijskih parametara od sadržaja endogenog i egzogenog 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod izloženih životinja. Rezultati tretiranja mladih pacova različitim koncentracijama vitamina D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i njihov uticaj na rast kostiju, mogu biti od pomoći pri traženju odgovora na pitanje da li sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> treba razmatrati prilikom procenjivanja statusa vitamina D jer trenutno ne postoje odrednice od strane zvaničnih institucija kako interpretirati dobijene rezultate za sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pacijenata.

## **2. PREGLED LITERATURE**

## 2.1. VITAMIN D

Vitamin D pripada grupi liposolubilnih vitamina. Javlja se u dva oblika: ergokalciferol ili vitamina D<sub>2</sub> (VTD<sub>2</sub>) i holekalciferol ili vitamina D<sub>3</sub> (VTD<sub>3</sub>). Molekul VTD<sub>2</sub> sadrži 28 atoma ugljenika, derivat je ergosterola. U prirodi se stvara u pe urkama i kvascu koji su izloženi Sun evoj svetlosti. VTD<sub>2</sub> naj eš e ulazi u sastav suplemenata i koristi se za oboga ivanje namirnica vitaminom D (mleka, mle nih proizvoda, napitaka itd). VTD<sub>3</sub> sadrži 27 atoma ugljenika, derivat je 7-dehidroholesterola. Nalazi se u namirnicama životinjskog porekla. VTD<sub>2</sub> i VTD<sub>3</sub> se razlikuju u bo nom lancu (Slika 1) <sup>(1)</sup>. VTD<sub>2</sub> i VTD<sub>3</sub> u se u organizam mogu uneti iz suplemenata i namirnica. Mali broj namirnica prirodno je bogat vitaminom D pa se esto u razvijenim zemljama pribegava oboga ivanju namirnica vitaminom D.



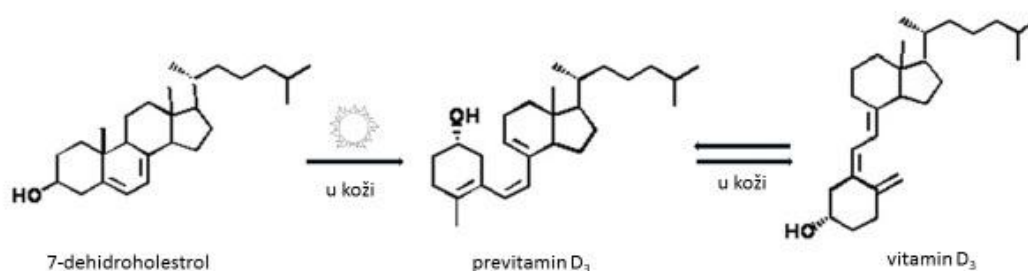
**Slika 1.** Formule vitamina D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>

Glavni prirodni izvor vitamina D je njegova sinteza u koži (posebno VTD<sub>3</sub>) nakon izlaganja Sun evoj svetlosti (UVB Zra enju). Vitamin D nastao endogenom sintezom ili unet u organizam iz egzogenih izvora nije biološki aktivan i njegova aktivacija zahteva niz reakcija hidrosilacije koje se odvijaju u jetri i bubrezima. Zbog endogene sinteze i prevodjenja u aktivni oblik u razli itim tkivima u organizmu, vitamin D se može smatrati i hormonom a ne samo striktno vitaminom <sup>(2)</sup>. Otkri e vitamina D na po etku dvadesetog veka povezano je sa njegovom ulogom u prevenciji rahitisa kod dece <sup>(3)</sup>. Pored uloge u zdravlju kostiju, prevenciji rahitisa (kod dece) i osteomalacije (kod odraslih), najzna ajnija uloga vitamina D je u apsorpciji kalcijuma iz tankog creva i u održavanju homeostaze kalcijuma u organizmu <sup>(4)</sup>. Takodje je utvr eno da održavanje adekvatnog

statusa vitamina D utiče na normalan rast i razvoj tokom fetalnog i neonatalnog perioda <sup>(4)</sup> i da se povezuje sa prevencijom loših ishoda u trudno i kao što su preeklampsija, gestacioni dijabetes i prevremeni porođaj <sup>(5, 6)</sup>. Nedostatak vitamina D tokom ranog razvoja i rasta može uticati na nastanak bolesti i smanjenu mineralizaciju kostiju, što dalje može dovesti do povećane sklonosti ka lomljenju kostiju i razvoja osteoporoze tokom daljeg života <sup>(7)</sup>. U novije vreme vitamin D se povezuje i sa mnogim drugim fiziološkim procesima <sup>(8)</sup> i ista je potencijalna preventivna uloga u bolestima kao što su astma <sup>(9)</sup>, respiratorne infekcije <sup>(10)</sup>, autizam <sup>(11, 12)</sup>, diabetes tipa 1 <sup>(13)</sup>, hipertenzija i druge kardiovaskularne bolesti. Tijekom razvoja može doprineti hronični ili povremeni neadekvatan status vitamina D <sup>(14)</sup>.

### 2.1.1. Endogena sinteza vitamina D

Vitamin D u humanom organizmu može se sintetisati endogeno u koži (subkutano) od 7-dehidroholestrola, nakon izlaganja Sunčevoj svetlosti (Slika 2). Izlaganje ultraljubičastoj svetlosti (UVB), čija je talasna dužina od ~285 do 320 nm, dovodi do apsorpcije u dermisu i epidermisu, što uzrokuje otvaranje B prstena 7-dehidroholestrola i stvaranje preholecalfiferola (previtamin D<sub>3</sub>, Slika 2) <sup>(15)</sup>. Nakon dva do tri dana, nestabilna dvogubna veza u molekulu preholecalfiferola biva premeštena (putem termalne izomerizacije), i stvara se holecalfiferol (vitamin D<sub>3</sub>). Holecalfiferol, nastao u koži, biva transportovan vitamin D-vezujućim proteinom (vitamin D binding protein - DBP) do jetre, kao i do masnog tkiva i mišića. Usled izlaganja UVB-zračenju nastaju i tahisterol i lumisterol, međutim ova dva proizvoda nemaju afinitet za DBP, tako da njihov transport iz kože u krv nije moguć <sup>(16)</sup>.



**Slika 2.** Endogena sinteza vitamina D<sub>3</sub>



Istraživanja su pokazala da izlaganje deteta u pelenama UVB-zracenju, od samo 30 minuta nedeljno ili izlaganje obu enog deteta (ali bez kape) u trajanju od dva sata, je dovoljno za endogenu sintezu koja održava nivo vitamina D u potrebnim preporu enim okvirima <sup>(17, 18)</sup>. Važno je napomenuti da izlaganje energiji Sun evih zraka nije preporu lljivo za decu mla u od šest meseci starosti <sup>(19)</sup>. Srbija je geografski locirana severno od 42. (°N) paralele i usled toga UVB zra enje nije dovoljno snažno tokom cele godine da omogu i endogenu sintezu vitamina D <sup>(16)</sup>. Stoga, u zimskom periodu, od novembra do aprila, endogena sinteza vitamina D je minimalna ili gotovo da je i nema. U oblastima na severu duži su periodi bez subkutane sinteze vitamina D <sup>(20)</sup> i to je jedan od razloga zašto se kod novoro en adi i odoj adi ne oslanjamo na endogenu sintezu, ve im u toku prve dve nedelje života uvodimo suplementaciju vitaminom D u vidu kapi (400 IU na dan). Endogena sinteza vitamina D kod trudnica i dojilja ima direktan uticaj na nivo vitamina D fetusa, odnosno odoj eta, jer je status vitamina D novoro en eta (odre en iz krvi pup anika) u pozitivnoj korelaciji sa statusom vitamina kod majke <sup>(21, 22)</sup>. Na smanjenje endogene sinteze vitamina D uti u mnogobrojni faktori kao što su pigment kože melanin, zaga enje vazduha, upotreba krema za sun anje sa zaštitnim faktorom 8 ili ode a koja pokriva ve i deo tela. Ukoliko dijetetski unos vitamina D nije izuzetno visok ili izlaganje UVB zra enju esto, ljudima tamnije puti ili ženama koje su povezane (imaju veo) pove an je rizik za nastanak deficijencije vitamina D <sup>(23, 24)</sup>. Ukoliko je deficijencija prisutna kod majke tokom dužeg perioda, nedovoljna koli ina vitamina D prolazi placentalnu barijeru i ulazi u krvotok fetusa <sup>(5)</sup>, prouzrokuju i smanjenje depoa vitamina D fetusa. ak i kada je status vitamina D majke adekvatan, depoi vitamina D kod novoro en adi kao i koli ine dobijene maj inim mlekom nisu dovoljni nakon par prvih nedelja života pa je suplementacija vitaminom D obavezna.

### **2.1.2. Egzogeni izvori vitamina D**

Najbogatiji prirodni egzogeni izvori VTD<sub>3</sub> su masne ribe (npr. losos, skuša, sardina, pastrmka). Na tržište Srbije uvoze se sve masne ribe osim pastrmke. Me utim, žene u trudno i izbegavaju da jedu ribu zbog njene potencijalne kontaminacije teškim metalima. Osim u masnim ribama, VTD<sub>3</sub> se nalazi u džigerici (pile a, guš ija, tele a), jajima (žumance), svinjskoj i guš ijoj masti, slanini i varcima (Tabela 1). Koli ina vitamina D u ovim namirnicama je vrlo mala i naj eš e nije dovoljna da zadovolji dnevne potrebe

organizma za vitaminom D, pa su namirnice oboga ene vitaminom D i suplementi u obliku multivitamina i pojedina nih vitamina VTD<sub>2</sub> i VTD<sub>3</sub> njegovi dodatni egzogeni izvori. Namirnice koje su najbogatije vitaminom D, kao i izvori vitamina D u vidu suplemenata i dodataka ishrani, prisutni u Srbiji, date su u tabeli 1.

U zemljama u kojima je zakonom regulisano oboga ivanje namirnica vitaminom D, naj eš e se oboga uju mleka (115-124 IU/250 mL), margarin (530 IU/100 gr) i odre eni sirevi, jogurti i vo ni sokovi <sup>(25, 26)</sup>. U pojedinim zemljama Evrope i u Severnoj Americi oboga ivanje namirnica vitaminom D uvedeno je da bi se zaštitilo stanovništvo od nutritivne deficijencije vitamina D. Eliminisanjem nutritivne deficijencije vitamina D omogu ava se sinteza zdravih kostiju, a time smanjuje ili eliminiše pojava rahitisa (kod dece) i rizik od hroni nih bolesti kostiju (kod odraslih) kao što je osteoporoza. U Srbiji nije zakonom propisano oboga ivanje namirnica vitaminom D, pa su oboga eni proizvodi na našem tržištu retki i naj eš e se uvoze. Od doma ih proizvo a a postoji nekoliko namirnica ije je oboga ivanje vitaminom D volonterske prirode (Tabela 1), dok je cena odre enih oboga enih proizvoda, kao što je mleko, znatno ve a u odnosu na neoboga eni isti proizvod.

Namirnice bogate vitaminom D nisu deo ishrane novoro en adi, posebno onih mla ih od 6 meseci starosti, kada su potrebe organizma koji intenzivno raste velike. Izvor vitamina D kod novoro en adi je maj ino mleko ili adaptirane infant formule koje su zamena za maj ino mleko (Bebelac®, Humana®, Impamil ®, Milupa-Aptamil® itd.). Uprkos injenici da je maj ino mleko najbolja mogua hrana za bebu ono naj eš e ne sadži dovoljne koli ine vitamina D potrebne novoro en etu (400 IU) <sup>(28)</sup>, ve u proseku 33 IU aktivnog vitamina D po litru maj inog mleka <sup>(29)</sup>. Koli ina vitamina D u humanom mleku zavisi od njegove koli ine u krvi majke i zato je važno da dojilje uzimaju adekvatnu koli inu vitamina D. Tako e je od velikog zna aja da novoro en ad, koja se hrane isklju ivo maj inim mlekom, konzumiraju suplemente vitamina D (400 IU/dan).

Tabela 1. Izvori vitamina D\*

Izvor vitamin D	IU po porciji **
<b>Prirodni izvori</b>	
Izlaganje direktnoj Sunjevoj svetlosti, UVB zračenju, gole kože ruku i nogu u proseku 5 do 10 minuta tokom dana (endogena sinteza zavisi od doba dana, godišnjeg doba, geografskog položaja kao i osetljivosti i tipa kože)	3000
Pastrmka (divlja), pečena ili kuvana, 100 g	636 (15.9 µg)
Skuša, atlantska, pečena ili kuvana, 100 g	518 (12.9 µg)
Losos, divlji, crveni, bez kostiju, pečeni ili kuvani, 100 g	796 (19.9 µg)
Losos, bez kostiju, pečeni ili kuvani, 100 g	313 (7.8 µg)
Sardina u konzervi, 100 g	144 (3.6 µg)
Buter, 100 g	152 (3.8 µg)
Kajmak, 100 g	25 (0.6 µg)
Tilapia, pečena ili kuvana, 100 g	161 (4.0 µg)
Mast (svinjska), 100 g	100 (2.5 µg)
Tunjevina, bela, u konzervi bez ulja, 100 g	45 (1.12 µg)
Jaja, kuvana ili pečena (vitamin D je u žumancetu), 100 g	68 (1.7 µg)
Džigerica, pileća, pečena, 100 g	36 (0.9 µg)
Peurke (šitake), kuvane, 250 ml	40 (1.0 µg)
<b>Suplementi</b>	
Riblje ulje, 15 mL (VTD <sub>2</sub> ili VTD <sub>3</sub> )	1200
Vitamin D suplementi (VTD <sub>3</sub> ): <i>Jarrows, Anafarm, Galenika, Alkaloid, Solgar, Primax, Natural Wealth, Merck</i>	200, 250, 400, 800, 1000
Vitamin D u okviru multivitaminskih suplemenata (VTD <sub>3</sub> ): <i>Preg Vit, Jamieson, Life, Kirkland</i>	250, 400, 800, 1000
<i>Centrum Materna</i>	400
<b>Namirnice obogaćene vitaminom D</b>	
Mleko IMLEK AD (sterilizovano mleko, 3.2% M.M.), 250 mL	60 (1.5 µg)
Plazma keks za decu, Bambi, 100 g	120 (3 µg)
Obogaćeni uvozni voćni sokovi sa dodatim kalcijumom i vitaminom D, 250 mL	100 (2.5 µg)
Margarin, <i>DIJAMANT, SUNCE, VITAL (Dobro jutro, Fit)</i> , 15 ml	60 (1.5 µg)

\*Reference: Srpska baza podataka o sastavu namirnica <sup>(27)</sup>; \*\*1 µg = 40 IU

U svetu je zakonom propisano da se infant formule obogaćuju sa 40 IU vitamina D na 100 mL formule (Food and Drug Regulations, Section B.25.062) <sup>(30)</sup>. Da bi novorođenče unelo dovoljnu količinu vitamina D od 400 IU potrebno je da u toku 24 h popije 1L mlečne formule, međutim većina dece do 4 meseca starosti pije manje od toga (760 mL/dan) <sup>(31, 32)</sup>. Stoga je i kod dece hranjene mlečnom formulom preporučljiva suplementacija ribljim uljem ili tečnim suplementima vitamina D, dok je kod dece hranjene isključivo majčinim mlekom ta suplementacija obavezna. Suplementi za novorođenčad dostupni su u dva oblika: VTD<sub>2</sub> i VTD<sub>3</sub>. Većina kompanija proizvođača suplementata ne daje informacije o poreklu vitamina D, koji ulazi u njihov sastav, ali VTD<sub>2</sub> se najčešće dobija iz kvasca, a VTD<sub>3</sub> iz lanolina ovce. Tradicionalno se na našem podneblju novorođenčadima daju kapi vitamina D u vidu uljanih ili vodenih rastvora (400 IU/kap; 1 kap= ~0.03 ml), mada postoje i preparati koji sadrže i do 600 IU u pojedinačnoj dozi.

Preporuka je da se novorođenčad do 6 meseci starosti hrane isključivo mlekom <sup>(33, 34)</sup>, tako da je u tom periodu suplementacija vitaminom D neophodna. Od 6 do 9 meseci starosti uvode se u ishranu namirnice i to najpre žitarice, voće i povrće pa tek kasnije i u vrlo malim količinama meso, riba i jaja koji su glavni izvori vitamina D, ali ta količina nije dovoljna da obezbedi 400 IU vitamina D svakoga dana osim u slučaju da su neke od gotovih kašičica najčešće uvoznih obogaćene vitaminom D. Kako su generalno dijetetski izvori vitamina D ograničeni u ishrani novorođenčadi preporučuje se upotreba oralnih suplementata tokom prve godine života <sup>(35)</sup>.

### **2.1.3. Masno tkivo kao izvor D vitamina**

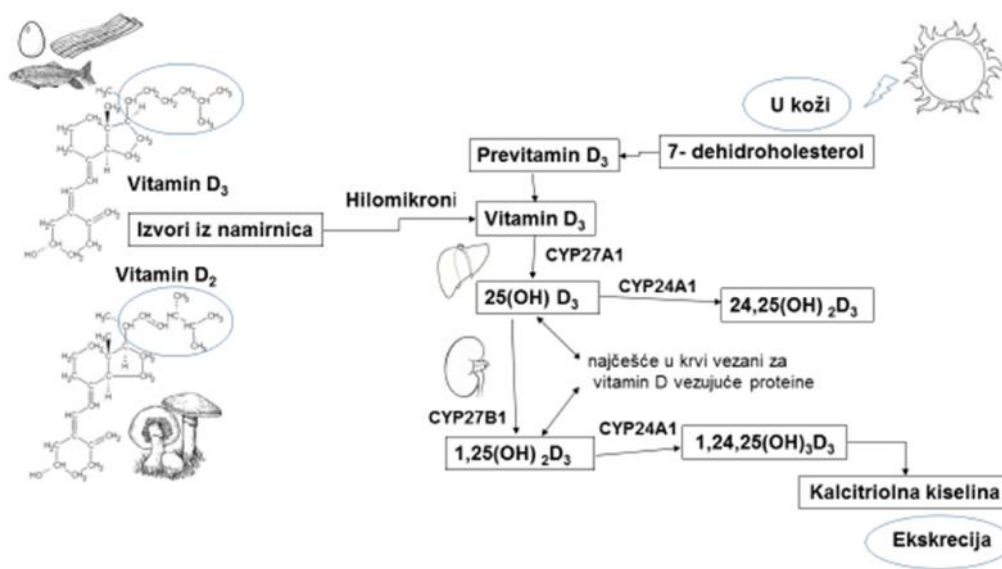
Dodatni izvor D vitamina kod novorođenčadi, kao i kod odraslih osoba, je mobilizacija vitamina D iz masnog tkiva. Kritičan period za razvoj zdravih kostiju je upravo rano detinjstvo, koje se ujedno karakteriše visokom akumulacijom telesne masnoće. U periodu nakon rođenja do 6 meseci starosti procenat masnog tkiva, izraženog kao procenat od ukupne telesne težine, povećava se u proseku 2,5 puta odnosno okvirno sa 13 % na 31 %. Tokom daljeg razvoja do dve godine starosti procenat masnog tkiva postepeno da opada do približno 25 % <sup>(36, 37)</sup>. Još uvek nije poznato da li povećanje procenta masnog tkiva kod novorođenčadi utiče na status D vitamina i na odgovor na suplementaciju istim. Bilo bi važno tome posvetiti pažnju jer bi u teoriji moglo uticati na razvoj kostiju u ovom

periodu intenzivnog rasta. Tako je, primećeno je da kod gojazne starije dece i odraslih osoba status vitamina D niži nego kod kontrolnih grupa dece <sup>(38)</sup> i odraslih koji nisu gojazni <sup>(39)</sup>. Dodatno je pronađena veza između povećane količine visceralne masnoće i rizika od nastanka deficijencije vitamina D kod odraslih Kineza <sup>(40)</sup>. Iako još uvek za to nema dokaza, postoje pretpostavke da kod gojaznih osoba vitamin D biva preuzet od strane masnog tkiva u organizmu, tako da se smanjuje njegovo oslobađanje u krvotok, a time i sama bioraspoloživost <sup>(41)</sup>. Mala randomizirana kontrolisana studija ukazala je da je kod gojazne dece primećena potreba za većom dozom vitamina D ili produženim periodom suplementacije u odnosu na decu normalne težine <sup>(42)</sup>. Ovom pretpostavkom ukazuje se na važnost određenih faktora, kao što je gojaznost, koje bi trebalo i uzeti u obzir pri određivanju terapije i tretmana deficijencije vitamina D, i da ista doza ne mora i ne može uvek biti primenjena za sve slučajeve.

## **2.2. Metabolizam vitamina D i njegova regulacija**

Vitamin D iz namirnica i suplemenata biva apsorbovan pasivnom difuzijom u intestinalne ćelije duodenuma i jejunuma pomoću micela, masnih kapljica <sup>(43)</sup>. Približno polovina od unete količine vitamina D biva apsorbovana <sup>(44)</sup>. U intestinalnim ćelijama apsorbovani vitamin D biva ugrađen u hilomikrone i pomoću njih transportovan najpre u limfu, a zatim u krvotok <sup>(45)</sup>. U krvi oko 40 % vitamina D se transportuje pomoću hilomikrona, dok deo mogu prenositi vitamin-D-vezujućih proteini (eng.DBP), lipoproteini ili albumin do ekstrahepatičnog tkiva, kao i do depoa u masnom tkivu. Veći deo vitamina D u krvi (oko 60 %) je endogenog porekla, sintetisan subkutano usled UVB zračenja. On se takođe transportuje pomoću DBP, najviše delom do jetre, ali ga mogu preuzeti mišići ili masno tkivo <sup>(43)</sup>. Jetra znatno brže preuzima vitamin D iz hilomikrona u odnosu na vitamin D vezan za DBP <sup>(46)</sup>.

Bez obzira na poreklo, endogeno ili egzogeno, u mitohondrijama hepatocita dolazi do prve reakcije hidroksilacije holekalciferola, odnosno ergokalciferola (Slika 3) <sup>(42)</sup>. Reakciju katalizuje 25-hidroksilaza (CYP27A1; izoenzim citohroma P450), nastaje kalcidiol ili 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) (Slika 3).



**Slika 3.** Metabolizam D vitamina

Kod starije dece i kod odraslih najviše je zastupljen oblik C3 $\beta$ -epimer 25(OH)D. Međutim, nedavno je otkriveno prisustvo C3 $\alpha$ -epimera 25-hidroksivitamina D (3-epi-25(OH)D) najpre u ćelijskim kulturama<sup>(47, 48)</sup>, a zatim i u velikom procentu u krvi kod novorođenadi mlađih od godinu dana starosti<sup>(49, 50)</sup>. Funkcija i uloga 3-epi-25(OH)D do danas nije poznata, ali detalji o ovom epimeru kao i dosadašnja istraživanja biće posebno obrađeni u poglavlju 2.3. Ukratko, pretpostavlja se da prisustvo 3-epi-25(OH)D u većem procentu kod novorođenadi, u odnosu na stariju životnu dob, može biti usled nedovoljno zrelih i razvijenih fizioloških funkcija jetre ili usled delovanja određenih enzima<sup>(47, 51)</sup>.

Iz jetre 25(OH)D, vezan za DBP, aktivnim transportom prelazi u cirkulaciju, a zatim ga preuzima tkivo i to u najvećem procentu proksimalnih tubula bubrega gde biva transportovan posredstvom transmembranskog proteina megalina<sup>(52)</sup>. U tubulama, u prisustvu CYP27B1 dolazi do druge reakcije hidroksilacije na položaju C-1 pri čemu nastaje calcitriol - 1,25(OH)<sub>2</sub>D, biološki aktivan oblik vitamina D (Slika 3). Produkcija 1,25(OH)<sub>2</sub>D je tesno regulisana pomoću paratiroidnog hormona (PTH) i niske koncentracije kalcijuma, kada se stimuliše aktivnost i sinteza calcitriola, kao i u slučaju niske koncentracije fosfata i samog 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Sintaza 1,25(OH)<sub>2</sub>D iz 25(OH)D moguće je ne samo u bubrezima već i u drugim tkivima kao što su pluća, srce, koža,

limfni vorovi, placenta, testisi, kolon <sup>(53, 54)</sup>. Kada je u organizmu prisutna dovoljna količina 1,25(OH)<sub>2</sub>D, uključuje se mehanizam kojim se u bubrezima povećava količina enzima 24-hidroksilaze (CYP24A1), pomoću koje se 1,25(OH)<sub>2</sub>D metaboliše do kalcitriolne kiseline (1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>) koja je hidrosolubilna i izlučuje se urinom (Slika 3) <sup>(55)</sup>.

Transport 1,25(OH)<sub>2</sub>D se može odvijati na dva načina. 1,25(OH)<sub>2</sub>D može biti vezan za DBP koji ima veći afinitet vezivanja za 25(OH)D ( $K_a=5 \times 10^{-8}$ ) u odnosu na 1,25(OH)<sub>2</sub>D ( $K_a=4 \times 10^{-7}$ ), mada transportuje oba oblika do ciljnih tkiva kao što su kosti, creva i bubrezi <sup>(56)</sup>. Najveći dio aktivnog metabolita vezuje se za vitamin D receptor (VDR), koji je ujedno i posrednik delovanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D unutar ćelije i ligand-indukovani transkripcijski faktor. VDR je heterodimer i kao nuklearni receptor sličan je receptorima za steroidne i tiroidne hormone u ovoj porodici receptora i pripada. Unutar ćelije 1,25(OH)<sub>2</sub>D se stereospecifično vezuje za VDR, koji sa druge strane funkcioniše kao dimer sa retinoid X receptorima (eng. RXRs). Ovaj heterodimerski kompleks 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR-RXR se translocira u nukleus gde stupa u interakciju sa elementima odgovora vitamina D (eng. vitamin D response elements - VDREs), čime se aktivira ili suzbija transkripcija ciljnih gena. Na ovaj način reguliše se ekspresija mnogih gena koji su važni za funkcije kostiju i homeostazu minerala, kao što su geni koji kodiraju kalcijum-vezujući protein, osteokalcin, PTH, PTHrP i CYP24A1 <sup>(57, 58)</sup>. Takođe, u poslednjih nekoliko godina istraživanja pokazuju da povoljan uticaj vitamina D prevazilazi granice do sada opšte poznatog uticaja na zdravlje i razvoj kostiju. Ekspresija VDR zabeležena je po prvi put u određenim tkivima, što je omogućilo uvid u regulaciju transkripcije gena i nove funkcije vitamina D u tim tkivima <sup>(59, 60)</sup>. Posmatrana je i uloga vitamina D kao regulatora urođenog ili adaptivnog imuniteta, u funkciji keratocita u epidermisu zajedno sa folikulima dlake, kao i funkciji mišićno-skeletnog sistema <sup>(61)</sup>. Pretpostavlja se da različite sekvence VDRE indukuju konformacione promene u kompleksu VDR-RXR kako bi omogućile asocijacije sa različitim ko-modulatorima čija je svrha da omogućе delovanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u tim ciljnim tkivima <sup>(62, 63)</sup>.

Produkcija 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u bubrezima kontrolisana je mehanizmom povratne sprege i direktnom regulacijom pomoću PTH i faktora rasta fibroblasta 23 (eng. fibroblast growth factor 23 - FGF23) <sup>(64, 65)</sup>. Unutar ćelije, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reguliše sopstveno dejstvo

vezivanjem za VDR ime se smanjuje ekspresija gena enzima 1 $\alpha$ -hidroksilaze što dovodi do smanjene produkcije 1,25(OH) $_2$ D $_3$  <sup>(63)</sup>. PTH kao glavni regulator sinteze 1,25(OH) $_2$ D $_3$  u bubrezima najve im delom to ini kontrolom transkripcije CYP27B1 gena. U endokrinološkom smislu postoji mehanizam povratne sprege između PTH i 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , odnosno 1,25(OH) $_2$ D $_3$  smanjuje transkripciju gena za PTH dok PTH stimuliše CYP27B1, a time i sintezu 1,25(OH) $_2$ D $_3$  <sup>(66)</sup>. U prisustvu PTH, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  deluje na distalni deo nefrona i na tanko crevo da pove a reapsorpciju kalcijuma, a u isto vreme deluje i na kosti tako što pove ava resorpciju koštanog tkiva kako bi se obezbedila dovoljna koli ina minerala potrebnih za homeostazu kalcijuma <sup>(67)</sup>. Witschi i kolege <sup>(68)</sup> su ukazali na postojanje negativne korelacije između PTH i 25(OH)D nivoa kao i da koncentracija PTH postiže plato od 3.8 pmol/L kada koncentracija 25(OH)D u serumu dostigne prag od 78 nmol/L. Ovaj plato u koncentraciji PTH prime en je i u drugim studijama pa je sakupljenjem podataka o koncentracijama 25(OH)D iz razli itih eksperimenata na standardizovan na in utvr en raspon od 75 do 80 nmol/L 25(OH)D u serumu kada se postiže plato u koncentraciji PTH <sup>(69)</sup>.

Suprotno od PTH, FGF23 inhibira produkciju 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , dok sa druge strane 1,25(OH) $_2$ D $_3$  stimuliše FGF23 produkciju. Najve a ekspresija FGF23 je u osteocitima i aktivnim osteoblastima gde se vezuje za receptore faktora rasta fibroblasta (eng. FGFR) u prisustvu kloto kofaktora ime se pove ava ekspresija CYP24A1, a time inhibira nastanak 1,25(OH) $_2$ D $_3$  <sup>(65, 70)</sup>. Pored direktnog uticaja na nivo metabolita vitamina D PTH i FGF23 su važni regulatori minerala kalcijuma i fosfata. Kalcijum i fosfat imaju bitnu ulogu u metabolizmu vitamina D jer regulišu na indirektan na in nivo CYP27B1. Kao što je prethodno pomenuto, nizak nivo kalcijuma uti e na pove anje nivoa PTH što zauzvrat podsti e sintezu CYP27B1 i produkciju 1,25(OH) $_2$ D $_3$ . Mehanizam povratne sprege prisutan je između koncentracije PTH sa jedne strane i koncentracija kalcijuma i fosfata u serumu sa druge strane. Kada je nivo kalcijuma u serumu normalan, kalcijum se vezuje za svoje receptore prisutne u paratiroidnoj žlezdi i time smanjuje sintezu PTH. Sa druge strane, fosfat reguliše CYP27B1 pomo u FGF23. Pokazano je da je koncentracija FGF23 pove ana u stanju hipofosfatemije i da ima uticaj na regulisanje smanjenja nivoa 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , na osnovu ega se FGF23 smatra medijatorom u ispoljavanju efekta nivoa fosfata na metabolizam vitamina D <sup>(66, 71, 72)</sup>. Na prisustvo 1,25(OH) $_2$ D $_3$  u krvi odgovaraju intestinalne elije kao i elije kostiju i bubrega kako bi se održala homeostaza kalcijuma



i fosfata u organizmu <sup>(71)</sup>. Kada  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stigne do enterocita dvanestopala nog creva i jejunuma, transportni protein kao što je kalcijumov kanal 6 na apikalnoj membrani (eng. TRPV6 - transient receptor potential cation channel subfamily V member 6) i kalcijum-vezuju i protein kalbindin- $\text{D}_{9\text{k}}$  stimulišu aktivan transport jona kalcijuma iz lumena creva u krvotok <sup>(73)</sup>. Pored aktivnog prisutan je i pasivni, paracelularni mehanizam kojim  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  poveća intestinalnu apsorpciju kalcijuma procesom koncentraciono zavisne difuzije. Još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno na koji način na  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  poveća intestinalnu apsorpciju fosfata, ali se misli da potencijalni mehanizam uključuje saturacioni proces ili regulaciju intestinalnog tip IIb natrijum-fosfatnog ko-transportera <sup>(71)</sup>.

Tkivo bubrega je još jedan ciljni organ za  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i jedna od funkcija održavanje normalne koncentracije kalcijuma u organizmu. Specifično tkivo u bubregu je distalni deo tubula nefrona gde se ispoljava uticaj PTH i metabolita vitamina D <sup>(74)</sup>. Ulazak kalcijuma u renalne ćelije bubrega olakšavaju kalcijumov kanal 5 na apikalnoj membrani (eng. TRPV5) i kalbindin, koji prenose jone kalcijuma sa apikale na bazolateralnu stranu epitelne ćelije. U bubregu pomoću  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indukuje se premeštanje kalcijumovih kanala TRPV5 i kalcijum-vezujućih proteina kalbindina- $\text{D}_{28\text{k}}$  i kalbindina- $\text{D}_{9\text{k}}$  do plazma membrane. Efekat  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u bubrezima se ne ogleda samo u povećanju tubularne reapsorpcije jona kalcijuma već i u smanjenju sopstvene produkcije putem regulacije hidroksilaza CYP24A1 i CYP27B1 <sup>(73, 75)</sup>.

Enzimi CYP24A1 i CYP27B1 su dva od tri ključna enzima u metabolizmu vitamina D koji pripadaju citohrom P450 superfamiliji enzima <sup>(76)</sup> i prisutni su u tkivu bubrega. Međutim, njihova ekspresija nije ograničena samo na tkivo bubrega. Pokazano je da limfni čvorovi, epitelne ćelije, koža, kolon, langerhansova ostrvca u pankreasu, osteoblasti kao i ćelije placente sadrže CYP27B1 <sup>(77)</sup>. Takođe je pokazano da je aktivnost 1 $\alpha$ -hidroksilaza, u koje se ubraja CYP27B1, u obrnutoj korelaciji sa nivoom kalcijuma u serumu što se odvija posredstvom PTH <sup>(78, 79)</sup>. Dodatno je na genu CYP27B1 otkriven region u okviru promotera koji je osetljiv na stimulacije paratiroidnim hormonom (PTH) <sup>(80, 81)</sup>. Sa druge strane, CYP24A1 je veoma značajan za regulisanje aktivnosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u ciljnim ćelijama. Slično kao kod CYP27B1, u bubrezima je ekspresija povećana u proksimalnom delu tubula nefrona, međutim većina ćelija ispoljava aktivnost

24-hidroksilaze *in vivo* <sup>(82)</sup>. Nivo iRNK može varirati od malih vrednosti do povećanja od nekoliko stotina puta kako bi se 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> katabolisao do 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, kada za tim postoji potreba <sup>(83)</sup>. U promoteru gena CYP24A1 nalazi se dvostruko pozitivan VDRE koji u zavisnosti od potrebe dovodi do povećanja CYP24A1, i to od 10 do 100 puta u ćelijama osetljivim na vitamin D <sup>(63)</sup>.

Udruženim delovanjem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH i serumskog fosfata reguliše se ekspresija enzima CYP24A1 kako bi zaštitio organizam od hiperkalcemije i hiperfosfatemije. Kada je koncentracija kalcijuma niska, PTH inhibira CYP24A1 kako bi smanjio produkciju 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D kao i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, a sa druge strane povećao produkciju 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(84)</sup>. Kolika je uloga CYP24A1 u katabolizmu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dodatno je potvrđeno studijama koje su pokazale da je iRNK enzima CYP24A1 rasprostranjena i detektovana u većini ciljnih tkiva za vitamin D <sup>(85)</sup>. Zanimljivo je da se iRNK enzima CYP24A1 detektuje samo u ciljnim ćelijama koje su izložene 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i to sat vremena nakon izlaganja kalcitriolu, dok se u ćelijama koje nisu izložene on ne detektuje. Ovi eksperimenti pokazali su da 24-hidroksilacija nije samo važna za eliminaciju 25(OH)D već je jedan od ključnih mehanizama u regulaciji eliminacije 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u ciljnim tkivima i ćelijama <sup>(86)</sup>. Takođe je nedavno na animalnom modelu miševa koji su CYP24A1-deficijentni pokazan otežan i produženi oporavak od preloma <sup>(87)</sup>. Svakako je CYP24A1 glavni i enzim u katabolizmu vitamina D, dok je njegova uloga povezana sa potencijalnom biološkom aktivnošću 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> još uvek nepoznata.

Samo 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nastaje, kao što je prethodno pomenuto, u bubrezima kada se 25(OH)D<sub>3</sub> metaboliše do 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ili 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Interesovanje za ulogu 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> je naglo poraslo nakon otkrića da je njegov nivo u plazmi čak 30 puta viši od nivoa 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ali i da postoji sinergistička veza između 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(88, 89)</sup>. U novije vreme predmet istraživanja je uloga 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u kostima koje rastu naročito nakon otkrića da je koncentracija 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> povećana 4,6 puta u koštanim ćelijama gde zarastaju prelomi kostiju <sup>(90)</sup>. Da li je 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> neophodan za zarastanje preloma kao i za normalan razvoj kostiju testirano je kod pilića *in vivo*. U prilog tome pokazano je da se u bubrezima aktivnost enzima 24-hidroksilaze povećala 3 puta nakon preloma kosti <sup>(91-94)</sup>. Međutim, analizom radova humanih istraživanja ustanovljeno je da je adekvatna suplementacija vitaminom D potrebna pri zarastanju

preloma kostiju. Istaknuto je da su raspoloživi podaci iz studija nekonzistentni da bi se zaključilo na koji način 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kao i ostali metaboliti vitamina D u estvuju u zarastanju preloma <sup>(95)</sup> i da je 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> uglavnom proizvod inaktivacije 25(OH)D <sup>(86)</sup>. U prilog ovome, govore činjenice da nije utvrđeno postojanje receptora za 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, kao što je recimo VDR za 25(OH)D, kao i da nema regulacije 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kod životinja u hipervitaminozi kada koncentracija 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u serumu može biti ekstremno visoka (viša od 250 nmol/L (100 ng/mL)) <sup>(96, 97)</sup>.

Mogućnost uticaja inter-individualnih razlika i varijacija u biološkom odgovoru na identičnu suplementaciju vitaminom D ispitana je nedavno u randomiziranoj kontrolisanoj studiji na 80 odraslih muškaraca i žena <sup>(84)</sup>. U zimskom periodu tokom osam nedelja, ispitanici su uzimali 28 000 IU 25(OH)D<sub>3</sub> na nedeljnom nivou u vidu suplemenata i obogaćeni namirnicama, nakon čega im je određena koncentracija 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 25(OH)D u serumu pomoću LC-MS/MS. Rezultati ove studije su ukazali na postojanje jake korelacije između koncentracija 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 25(OH)D u serumu. Interesantno je da je u drugoj nedelji odnos između ova dva metabolita bio manji u grupi koja je uzimala suplemente vitamina D u odnosu na placebo grupu. Pretpostavlja se da uzrok toga može biti potencijalni zastoj (lag) enzima CYP24A1. Određivanje odnosa 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:25(OH)D<sub>3</sub> u ranoj fazi suplementacije kod pacijenata može pomoći u proceni da li postoji potreba za većom dozom suplemenata vitamina D usled inter-individualnih razlika u katabolizmu. Dodatno bi ovakva određivanja doprinela dolasku do odgovora na pitanje da li se postavljene ciljane koncentracije 25(OH)D u serumu i plazmi mogu postići i kod svih ljudi.

### **2.3. C-3 -epimer 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub>**

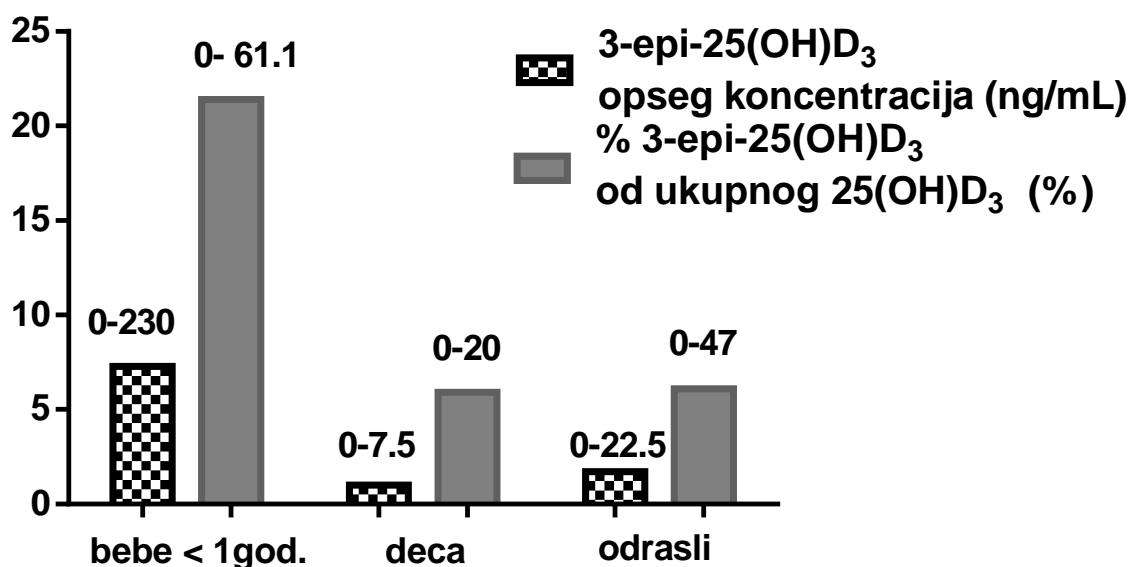
Poreklo C-3 -epimera 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>) u organizmu ovekada do sada nije razjašnjeno. Da li je 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> endogenog porekla u organizmu ili potiče iz obogaćeni namirnica i dijetetskih suplemenata, samo su neka od pitanja u fokusu novih istraživanja <sup>(98)</sup>. Jedna od prvih pretpostavki o potencijalnim izvorima ovog epimera razmatrala je intestinalne bakterije, zagrevanje i određene postupke u preradi namirnica <sup>(50)</sup> kao i bifidobakterije iz humanog mleka <sup>(99)</sup>. Razlog zbog koga je kao izvor epimera razmatrano humano mleko je otkriveno da je povećana koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>

prisutna kod novorođenadi u odnosu na decu i odrasle<sup>(49, 100, 101)</sup>. Prvi put su Singh i saradnici 2006. godine otkrili u humanim uzorcima povećanu koncentraciju 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod novorođenadi u odnosu na starije ispitanike i predložili da koncentracija epimera opada sa starošću ispitanika<sup>(99)</sup>. Dalja istraživanja na odraslim osobama potvrdila su prisustvo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u malom procentu<sup>(102, 103)</sup>. U saglasnosti sa ovim rezultatima, nekoliko godina kasnije utvrđeno je pad u koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod ispitanika od rođenja do 12 meseci starosti, sa daljim opadanjem u toku detinjstva<sup>(104)</sup>. Kontinuiranim praćenjem novorođenadi u toku prve godine života utvrđeno je da postoje promene u nivou 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, kao i da koncentracija epimera raste sa suplementacijom vitaminom D uz prisutan dozno-zavisni odgovor<sup>(105, 106)</sup>.

Ukoliko 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nastaje endogeno, nedovoljna zrelost tkiva i organa odgovornih za metabolizam vitamina D kod novorođenadi, i to najpre jetre i bubrega, može biti potencijalno objašnjenje za povećanje koncentracije ovog epimera. Na odraslim osobama, Singh i saradnici testirali su da li se manja količina 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> stvara kod pacijenata koji imaju oboljenje jetre u odnosu na zdravu kontrolu i nisu primetili značajnu razliku između te dve grupe<sup>(99)</sup>. Sa druge strane, u testnim suplementima vitamina D testiran je nivo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Na osnovu ovog istraživanja odbačena je pretpostavka da suplementi mogu biti značajan potencijalni izvor 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, jer je koncentracija epimera bila manja od 2 % u odnosu na ukupni holekalciferol u suplementima, pa se time ne bi moglo objasniti povećanje epimera kod novorođenadi<sup>(104)</sup>. U novoj epidemiološkoj studiji ukazuje se da je unos namirnica bogatim vitaminom D u odnosu na suplemente vitamina D reflektovan nižom koncentracijom epimera u krvi ispitanika, usled čega se smanjuje verovatnoća da je poreklo epimera egzogenog karaktera, ali treba uzeti u obzir da ispitanici nisu putem namirnica unosili preporučenu količinu vitamina D<sup>(107)</sup>.

Aktuelno pitanje, oko koga se danas vode diskusije, je da li epimer treba posmatrati pri proceni statusa vitamina D kod individua. Da li je potrebno izdvojeno određivati i posmatrati epimer pri određivanju statusa vitamina D, ili kao do sada samo ukupnu koncentraciju 25(OH)D<sub>3</sub>? Jedno od pitanja je i da li određivanje ukupne koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub>, metodama koje se primenjuju u redovnoj kliničkoj praksi, uključuje i određivanje sadržaja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> ili ne. Utvrđeno je da se razmatranjem ukupne koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub>, u kojoj je uračunata i koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, može

preceniti status vitamina D<sub>3</sub> u organizmu, što dalje može dovesti do greške u klasifikaciji i terapiji. Ovo je posebno važno kod novorođenadi kod kojih udeo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnoj koncentraciji 25(OH)D<sub>3</sub> može biti čak i do 60 %. Na ovaj potencijalni problem najpre je ukazano 2010. godine u otvorenoj diskusiji u Američkom nacionalnom institutu za ispitivanje zdravlja i hrane (eng. NHANES) <sup>(98)</sup>. Zatim je dve godine kasnije, u studiji sprovedenoj u Americi na širokoj populaciji osoba (starosti od 3 dana do preko 90 godina), pokazano da je u kategoriju adekvatnog statusa vitamina D (nije potrebna dodatna suplementacija), pogrešno klasifikovano 9 % novorođenadi i 15 % dece i odraslih. Naknadnom analizom, koja je odvojeno posmatrala 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, zaključeno da su ove individue u riziku od deficijencije vitamina D<sub>3</sub> i da im je neophodna terapija suplementima <sup>(108)</sup>. U preglednom radu, koji je sabrao rezultate svih istraživanja u vezi sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> sprovedenih do 2013. godine, objavljeno je da udeo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnoj koncentraciji 25(OH)D<sub>3</sub> kod novorođenadi u proseku 21.4 % (0-61.1 %), u pedijatrijskoj populaciji 5,9 % (0-20 %) dok je kod odraslih taj procenat oko 6.1 %, sa širokim rasponom od 0 % do čak 47 % <sup>(101)</sup> (Slika 4). U ovom radu dat je i osvrt na različitu osetljivost metoda za detekciju 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, kao i da je sa povećanjem osetljivosti metoda omogućena preciznija analiza i detekcija niskih koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>.



**Slika 4.** Prikaz opsega koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (ng/mL) i udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnoj koncentraciji 25(OH)D<sub>3</sub> (%) kod novorođenadi, dece i odraslih. Slika je pripremljena na osnovu podataka iz studije Bailey i saradnika 2013 <sup>(101)</sup>

Kao što je prethodno pomenuto, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> je najpre određeno u studiji sa više od 180 učesnika do godinu dana starosti, gde je raspon ukupnog 25(OH)D bio veliki <sup>(99)</sup>. U istoj studiji, u velikom broju uzoraka odraslih ispitanika, nije detektovan 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, ali su Singh i saradnici primetili da je koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> opadala sa starošću u ispitanika <sup>(50)</sup>. Njihovu teoriju doveli su u pitanje nekoliko godina kasnije Strathman i saradnici tvrdeći, da koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nije u korelaciji sa starošću <sup>(108)</sup>. Primenom osetljivije metode UPLC/MS/MS (ultra-performance LC/tandem MS) nađen je različit udio epimera u ukupnoj koncentraciji 25(OH)D kod novorođenadi (15-43%) i odraslih (2.5-17%) <sup>(100)</sup>, dok je primenom HPLC-MS/MS metode 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> detektovan u 99 % ispitivanih uzoraka novorođenadi i/ili odraslih do osamedeset godina starosti <sup>(102, 107, 109-111)</sup>. Primenom HPLC-MS/MS metode u Lensmeyer-ovoj i prethodno pomenutim studijama najniži nivo detekcije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> bio je 0.1 ng/mL (0.25 nmol/L) <sup>(102, 107, 109-111)</sup>. U prvoj studiji Singh-a i saradnika, utraenoj sa novorođenadima, najniži nivo detekcije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, bio je čak 50 puta veći i sudeći prema

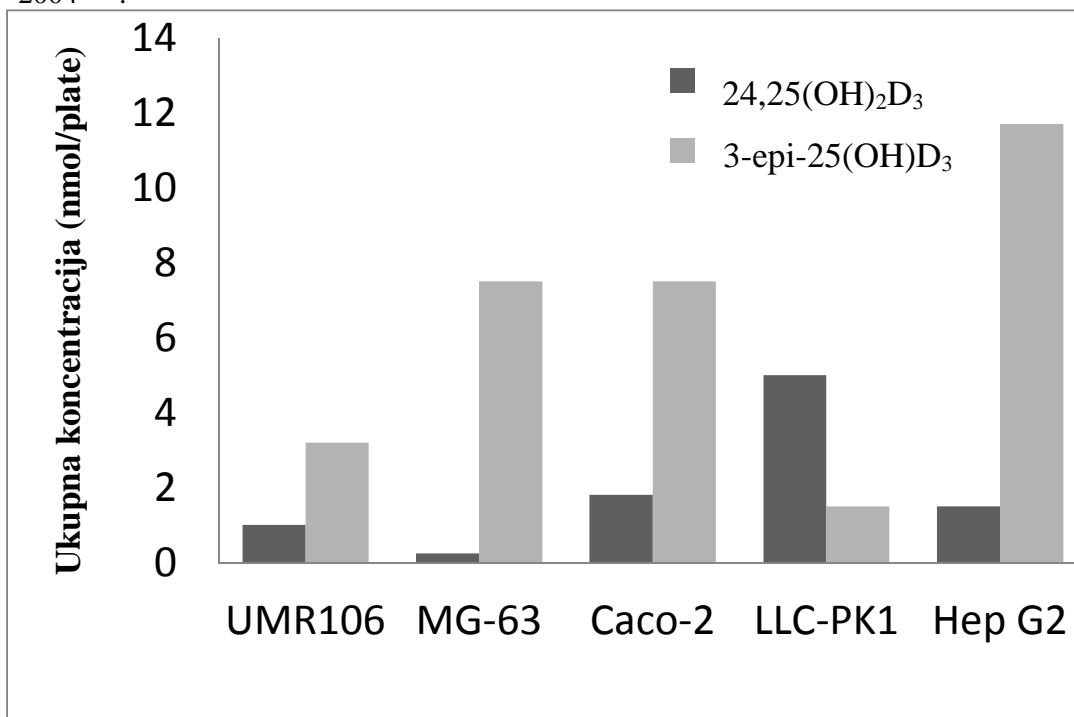
prezentovanim rezultatima iznosio je 5 ng/ mL (10 nmol/L)<sup>(50)</sup>. Primenom LC/MS/MS, kao visoko osetljive metoda za detekciju 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, ve 2013. godine potvr ena je hipoteza o obrnuto proporcijalnoj zavisnosti starosti i % epimera u ukupnoj koncentraciji 25(OH)D, na velikom broju ispitanika pedijatrijske populacije starosti od 1 dana do 20 godina <sup>(112)</sup>. U ovoj studiji utvr ena je opadaju a koncentracija epimera od prvih dana života do godinu dana starosti ispitanika. Gallo sa saradnicima je, kontinuiranim pra enjem sadržaja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod novoro en adi od prvog do dvanaestog meseca života, pokazala da koncentracija najpre raste tokom prvih nekoliko meseci a zatim kontinuirano opada <sup>(106)</sup>. U istoj randomiziranoj kontrolisanoj studiji ukazano je na postojanje dozno-zavisnog odgovora na suplementaciju vitaminom D, odnosno da kod novoro en adi koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> raste sa primenom suplementacije. Tako e je nedavno, u serumima tek rođenih beba, detektovana niža koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod prevremeno ro enih beba u odnosu na bebe ro ene u punom terminu <sup>(109)</sup>. U epidemiološkoj studiji Engelmana i saradnika navodi se da na pove an nivo epimera u krvi, pored životnog doba, može uticati izlaganje Sun evoj svetlosti i unos suplemenata vitamina D, kao i pove an unos alkohola i manji obim struka <sup>(113)</sup>. Zajedni ki zaklju ak svih prethodno navedenih studija je da su neophodna nova istraživanja kojima bi se nastojalo utvrditi poreklo epimera i njegova biološka aktivnost, kao i posledice njegove pove ane koncentracije u krvi.

### **2.3.1. Metabolizam 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>**

Nakon otkri a 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> sprovedeni su eksperimenti na razli itim elijskim kulturama kako bi se utvrdilo da li su odre eni tipovi elija odgovorni za nastanak 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom metabolizma 25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(47)</sup>. Kamao i saradnici koristili su humanu osteosarkom elijsku liniju (MG-63), osteosarkom elijsku liniju pacova (UMR 106), humane elije adenokarcinoma kolona (Caco-2), elijsku liniju bubrega svinje (LLC-PK1), kao i humane elije hepatoblastoma (Hep G2). U gotovo svim elijskim linijama 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> je detektovan u ve oj koncentraciji u odnosu na 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, osim u

elijama bubrega pacova (Slika 5).

**Slika 5.** Prikaz ukupnih sadržaja (nmol/plate) 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u različitim elijskim kulturama. UMR106: elijska linija osteosarkoma pacova; MG-63: humana osteosarkom elijska linija; Caco-2: humane elije adenokarcinoma kolona; LLC-PK1: elijska linija bubrega svinje (LLC-PK1); Hep G2: humane elije hepatoblastoma. Slika je pripremljena na osnovu podataka iz studije Kamao i saradnika 2004<sup>(47)</sup>.

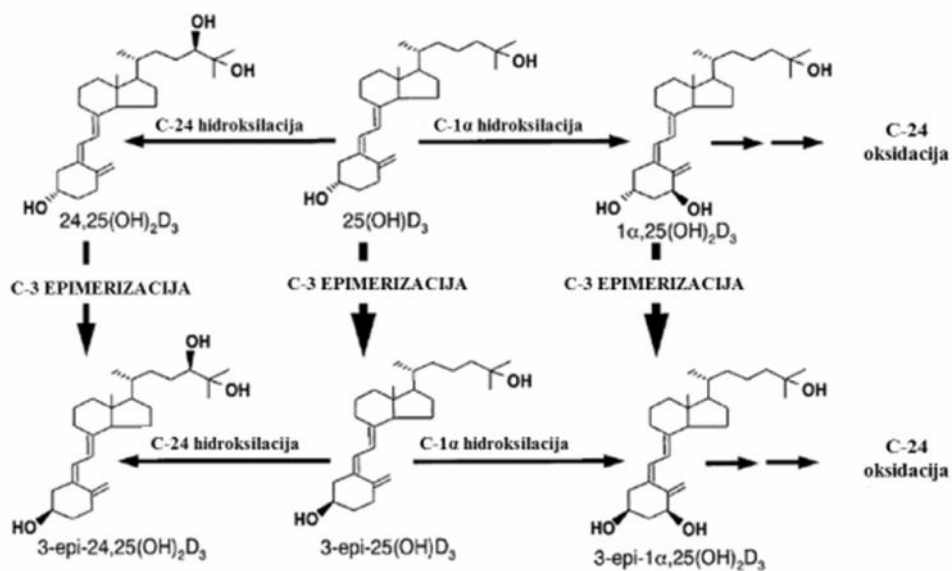


U LLC-PK<sub>1</sub> elijskoj liniji dominantno je nastajao 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u poređenju sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (Slika 5), pokazuju i da se proces C-3 epimerizacije najverovatnije ne odigrava u elijama bubrega pacova, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima<sup>(47, 114)</sup> Kamao i kolege su takođe pokazali da Hep G2 elije generišu najviše 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u poređenju sa ostalim ispitivanim elijskim linijama, upravo i na jetru kao potencijalni izvor 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Sam proces C-3 epimerizacije u ispitivanim elijskim linijama pokazao se tkivno-specifičnim, kao i supstrat-specifičnim za 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> epimerizaciju. Rezultati navedenih studija ukazuju da najverovatnije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nastaje kao proizvod endogenog metabolizma, na šta ukazuju i nedavno sprovedene studije na animalnim modelima. Nekoliko sati nakon jednokratnog



ubrizgavanja visoke doze 25(OH)D<sub>3</sub> pacovima, detektovan je u serumu 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(115)</sup>. U randomiziranoj kontrolisanoj studiji na odraslim pacovima, sa povećanjem doze holekalciferola takođe je primećen dozno-zavisni odgovor u koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u serumu pacova <sup>(116)</sup>. Ovi rezultati su u saglasnosti sa studijom sprovedenom na novorođenadima kod kojih je koncentracija epimera rasla sa povećanjem doze suplemenata vitamina D<sub>3</sub> (400, 800, 1200, 1600 IU) dajući dozno-zavisni odgovor <sup>(106)</sup>.

Glavni metaboliti vitamina D<sub>3</sub> mogu podleći i reakciji epimerizacije (Slika 6), koje su dokazane u prethodno opisanim eksperimentima na bakterijskim kulturama. Primećeno je da je reakcija epimerizacije iz C-3 u C-3 položaj u biološkim sistemima najverovatnije ireversibilna <sup>(47)</sup>. U *in vitro* eksperimentima nije utvrđena obrnuta reakcija pretvaranja 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(51, 114)</sup>. Nedavno je i u studiji na pacovima pokazano da se, nakon kontinuirane višenedeljne direktne administracije samog 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, u plazmi starih pacova gotovo ne registruje 25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(117)</sup>. Međutim, sama reakcija epimerizacije u metabolizmu vitamina D i dalje je nepoznanica. Zna se da je ova reakcija poznata i u metabolizmu određenih steroidnih hormona <sup>(118)</sup>. Polazeći od toga da u metabolizmu životinjskih kiselina reakciju epimerizacije katalizuju hidrosisteroid-dehidrogenaze (HSDs), Reddy i saradnici su pretpostavili da HSDs učestvuju u reakciji pretvaranja 25(OH)D<sub>3</sub> u 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(51)</sup>. Pokazano je da specifične 3 i 3 HSDs mogu prevesti određene steroidne hormone u manje aktivne forme <sup>(119)</sup>, kao i da su 3 i 3 HSDs deo procesa epimerizacije jer imaju visoku specifičnost za 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kao supstrat <sup>(120)</sup>. Kamao i saradnici su ispitivali proces epimerizacije u metabolizmu vitamina D na bakterijskoj kulturi *E. coli* i pokazali da se 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> metaboliše pomoću CYP27B1 na poziciji C1 i CYP24A1 na poziciji C24 <sup>(47)</sup>. Ista istraživačka grupa je, nekoliko godina kasnije, pokazala da za katalizu reakcije epimerizacije u *in vitro* uslovima nisu odgovorni klasični enzimi uključeni u metabolizam vitamina D, citohrom P450, ali ni hidrosisteroid-dehidrogenaze (HSDs) <sup>(121)</sup>. Zanimljivo je da je proces epimerizacije u najvećem stepenu registrovan u mikrozomalnoj frakciji <sup>(121)</sup>. U preglednom radu, koji je obuhvatio sva istraživanja vezana za 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, zaključeno je da sam proces epimerizacije najverovatnije uključuje ekstra-renalno tkivo i enzime koji nisu deo klasičnog metabolizma vitamina D <sup>(101)</sup>.



**Slika 6.** Epimerizacija metabolita vitamina D<sub>3</sub>. Preuzeto iz rada Kamao i saradnici, 2004<sup>(47)</sup> i prera eno.

Kamao sa saradnicima je, takodje, bio pionir u istraživanju biološke aktivnosti C-3 - metabolita vitamina D ukazavši na njihov niži afinitet vezivanja za VDR u pore enju sa 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(47)</sup>. Afinitet vezivanja 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> za VDR je svega 2.1 % u odnosu na afinitet 3 -oblika, dok je afinitet vezivanja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> okvirno 36-46 % u odnosu na 25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(47, 101)</sup>. Dalja istraživanja potvrdila su smanjen afinitet 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> za VDR, ali i u odnosu na smanjen transport jona kalcijuma u humanoj Caco-2 elijskoj liniji, smanjenu diferencijaciju, antiproliferativni efekat i indukciju CYP24 gena kao i smanjenu transkripciju gena za osteokalcin <sup>(47, 84, 122)</sup>. Nakon odre ivanja kristalne strukture kompleksa 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sa VDR-ligand vezuju im domenom (VDR-LBD) otkriveno je da 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ne stupa u interakciju sa bo nim ostatkom Ser278, važnim za prepoznavanje liganda VDR <sup>(123)</sup>. Ova saznanja vode razmatranju 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kao parcijalnog agoniste VDR, me utim skorašnja istraživanja pokazuju da se najve i broj vodoni nih veza 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sa VDR ipak uspostavlja alternativnim na inima <sup>(124)</sup>.

Kamao i saradnici su našli da je metabolizam C3 epimera usporeniji, ime bi najverovatnije bio kompenzovan smanjen afinitet vezivanja za VDR, doprinose i na taj

na in metaboli koj stabilnosti C3 epimera i biološkoj aktivnosti <sup>(47)</sup>. U istoj studiji pokazano je da 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pokazuje odre en nivo transkripcione aktivnosti prema ciljnim genima sa ispoljenom anti-proliferativno/diferencijalnom indukcijom na humanoj elijskoj liniji mijeloidne leukemije (HL-60), pri emu je indukcija CYP24 gena bila smanjena u odnosu na osnovni oblik 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(47)</sup>. Sa druge strane, isti autori su na MG-63 elijama pokazali transkripcionu aktivnost 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na humanom IC promoteru gena koji sadrži VDRE, ali samo u vrednosti od 12 % u odnosu na osnovni oblik 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. U isto vreme 3-epi-24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> su ispoljili zanemarljiv efekat ak i pri jako visokim koncentracijama. Na elijskoj liniji osteoblasta, istražuju i gen kojim je kodiran osteokalcin *BGLAP*, pokazano je da 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pove ava stabilnost iRNK osteokalcina, ali mu je sposobnost da indukuje transkripciju *BGLAP* gena i sintezu proteina bila smanjena ak za 1000 puta u odnosu na 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(122)</sup>.

Uzimaju i u obzir da se je C-3 epimerizacija tkivno-specifi na i da 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ispoljava tkivno-specifi ne funkcije jedna od pretpostavki je da postoji mogućnost da ima sli nu biološku aktivnost kao i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. U prilog ovoj pretpostavci idu rezultati studije na elijama plu a alveolarnog tipa II kod kojih je 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulisao sintezu surfaktanta podjednako dobro kao i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(125)</sup>. Zatim, na paratiroidnim elijama gove eta pokazano je da 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ispoljavaju jednaku aktivnost na supresiju sinteze paratiroidnog hormona i to pri visokoj koncentraciji od 10<sup>-10</sup> M <sup>(115)</sup>. Tako e je, u preliminarnim *in vivo* studijama na pacovima, pri jednokratnoj administraciji 3-epi-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pokazana redukcija sadržaja PTH u cirkulaciji za 65 ± 7 %, ali sa minimalnim uticajem na nivo kalcijuma <sup>(126)</sup>, dok je produžena administracija 3-epi-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kod odraslih zdravih pacova i pacova sa odstranjenim bubrezima tako e pokazala supresivni efekat 3-epi-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na PTH <sup>(116, 126)</sup>. Pretpostavlja se da je ovaj supresivni efekat na PTH povezan sa velikom metaboli kom stabilnoš u samog 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, kao i da e se možda upravo pomo u 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> objasniti razli ito supresivno delovanje na PTH u studijama koje su posmatrale PTH/25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> odnos.

Pošto je visoka metaboli ka stabilnost 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> jedno od ponu enih objašnjenja za njegovu biološku aktivnost usledila su dalja istraživanja njegove stabilnosti. Najpre je na izolovanim elijama bubrega i sa pre iš enim CYP24A1 pacova

identifikovana 3-epi-kalcitriolna kiselina, kao neaktivan metabolit 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(127)</sup>. Interesantno je da je njena produkcija bila tri puta niža u odnosu na kalcitriolnu kiselinu nastalu od 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Stoga su autori, na osnovu dokinga, zaključili da se povećana stabilnost 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> najverovatnije postiže vezivanjem za CYP24A1 na alternativne načine, što dovodi do usporavanja oksidacije bojnog lanca, odnosno inaktivacije epimera <sup>(127)</sup>.

Na osnovu prethodnih studija može se uočiti da je najviše i broj istraživanja fiziološke funkcije i uloge 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bio urađeno na kliničkim modelima i u okviru retkih *in vivo* animalnih studija. U preglednom radu koji je sabrao sva istraživanja do 2013. godine, Bailey i saradnici ukazuju na potrebe za novim studijama o 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, njegovoj fiziološkoj ulozi kao i rizicima koje povećana koncentracija ovog metabolita, detektovana kod novorođenadi, može imati <sup>(101)</sup>. Prisustvo 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kod novorođenadi, dece i odraslih otvorilo je mnoga pitanja i diskusije: da li je posebna analiza 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> neophodna u kliničkoj praksi radi optimalne procene statusa vitamina D, da li zaista postoji različit biološka aktivnost između 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i ako postoji kako te razlike mogu uticati na zdravlje ljudi.

## 2.4. Status vitamina D

Status vitamina D u organizmu se procenjuje određivanjem koncentracije ukupnog 25(OH)D koji reflektuje deponovanu količinu vitamina D u organizmu. Postoji nekoliko razloga zašto se kao biomarker statusa ne određuje aktivni oblik 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> već 25(OH)D, prekursor aktivnog oblika. Koncentracija 25(OH)D u krvi odražava endogenu i egzogenu količinu vitamina D u organizmu, odnosno vitamin D unet hranom i suplementima, kao i onaj nastao u koži. Sa druge strane, 25(OH)D ima relativno dug poluživot koji se kreće od približno 10 dana do 3 nedelje, čime je kao relativno stabilan biomarker pogodan za procenu depoa vitamina D <sup>(128)</sup>. Takođe, koncentracija 25(OH)D nije strogo kontrolisana od strane endokrinog sistema za razliku od 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Ustanovljeno je da su 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u korelaciji u stanjima teške deficijencije vitamina D, ali da se pri normalnim fiziološkim uslovima aktivni oblik 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u krvi nalazi u 1000 puta manjoj koncentraciji nego 25(OH)D. Takođe poluživot 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oblika je 50-100 puta kraći i iznosi samo približno od 4 do 20 h, što ga čini

neodgovarajućim markerom za procenu statusa vitamina D. Prilikom određivanja statusa vitamina D pomoću biomarkera 25(OH)D, neophodno je da se uzmu u obzir određeni faktori kao što su gojaznost, funkcije bubrega i jetre i proces starenja individue kako bi procena statusa bila adekvatna.

#### **2.4.1. Metode za određivanje koncentracija 25(OH)D u krvi**

Metode za određivanje koncentracije 25(OH)D u serumu i plazmi mogu se podeliti na imunoeseje i hromatografske metode, koje uključuju tekuću hromatografiju visokih performansi (HPLC). U novije vreme primenjuje se metoda tekuće hromatografije (LC) u tandemu sa masenom spektrometrijom (MS/MS) <sup>(129, 130)</sup>. Hromatografske metode se smatraju najtačnijim i najpreciznijim jer se rezultat ukupne koncentracije 25(OH)D dobija specifičnim određivanjem 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Pored ovih tehnika, ranije su korišćeni testovi bazirani na kompetitivnom vezivanju proteina (eng. competitive protein binding assays) za koje se pokazalo da imaju tendenciju precenjivanja koncentracije 25(OH)D <sup>(131, 132)</sup>. U komercijanim uslovima za određivanje ukupnog 25(OH)D najviše se koriste imunoeseje, koji se međusobno razlikuju po antigen-antitelo sistemima, i tu se ubrajaju: radioimunološki eseji (RIA), hemiluminiscentni eseji, kao i enzimске imunološke metode (ELISA). Njihova prednost je jednostavnost izvođenja, kao i mala zapremina uzorka potrebna za određivanje, što je ključno pri određivanju koncentracije 25(OH)D kod novorođenadi. Međutim, najveći nedostatak ovih metoda je unakrsna reakcija antitela imunoeseja sa drugim metabolitima vitamina D, koji su prisutni u serumu, što može uticati na tačnost dobijenih rezultata.

Tačna procena statusa vitamina D kod ljudi svih uzrasta, a posebno kod novorođenadi, predstavlja veliki izazov zbog različitih metoda za određivanje koncentracije ukupnog 25(OH)D. U studiji koja je poredila 6 najzastupljenijih metoda pokazano je da se srednje vrednosti koncentracija 25(OH)D, dobijene različitim metodama, mogu značajno razlikovati i biti i dvostruko veće <sup>(133)</sup>. Usledile su brojne diskusije i izvođeni novi dokazi kojima je ukazano na velike varijacije u rezultatima u zavisnosti od korišćene metode <sup>(134, 135)</sup>. Nakon tog saznanja bilo je nemoguće porediti rezultate 25(OH)D dobijene u različitim studijama usled čega nije postignut cenzus za definisanje novih granicnih vrednosti za procenu statusa vitamina D. Dodatnu komplikaciju predstavlja prisustvo C-3-epimera 25(OH)D (C3-epi-25(OH)D) detektovano pomoću LC-MS metode u većoj

koli ini kod novorođenadi<sup>(105, 136)</sup>, koji otvara pitanje da li je moguća njegova detekcija sa imunoesejima ili ne, kao i pitanje potencijalnog precenjivanja statusa vitamina D. Postignut je dogovor za pokretanje sertifikacionih programa kao što je Program Eksterne Procene Kvaliteta Određivanja Vitamina D (eng. Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS))<sup>(137)</sup> kako bi se najpre utvrdila, a zatim i smanjila velika odstupanja u merenjima me u različitim laboratorijama. Američki nacionalni institut za standarde i tehnologiju (eng. National Institute of Standards and Technology – NIST) razvio je 4 različita nova standardna referentna materijala za određivanje koncentracije 25(OH)D u krvi, zasnovana na humanom serumu (SRM 972)<sup>(138)</sup> sa sertifikovanim referentnim vrednostima za 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> i C3-epi-25(OH)D. Na ovaj način omogućena je bolja kontrola kao i smanjenje odstupanja vrednosti izmeru u laboratoriji pri određivanju koncentracije 25(OH)D u krvi, što je i pokazano prema najnovijem DEQAS izveštaju<sup>(139)</sup>. U ovom izveštaju, takođe, se napominje da prema novim saznanjima nijedan od glavnih imunoeseja nije u stanju da detektuje C3-epi-25(OH)D, ali da postoji nekoliko analitičkih metoda kojima je moguća njegova detekcija, kao što su HPLC, LC-MS/MS i Roche-ov test kompetitivno vezuju ih proteina<sup>(139)</sup>. Dodatno je naglašeno da postoji mogućnost pozitivnog odstupanja rezultata dobijenih ovim metodama usled detekcije C3-epi-25(OH)D metabolita u okviru ukupne koncentraciji 25(OH)D. Precenjivanje ukupne koncentraciji 25(OH)D može poticati i od nedovoljne specifičnosti mnogih LC-MS/MS testova da detektuju strukturno-različita izomerna jedinjenja<sup>(101)</sup>, pa se pribegava razvoju novih metoda odgovarajuće hromatografske selektivnosti za razdvajanje C3-epi-25(OH)D metabolita<sup>(112)</sup>, uključujući i matrikse za razdvajanje i kolone za razdvajanje optičkih izomera<sup>(140)</sup>. U narednom periodu značajno je pažljivo odabrati metod za odvajanje i kvantifikaciju C3-epi-25(OH)D metabolita, kao i odgovarajuće supstance za kalibraciju, koji će omogućiti dobijanje pouzdanih rezultata. Za sada, LC-MS/MS metod se smatra najpouzdanijim za određivanje C3-epi-25(OH)D metabolita<sup>(129)</sup>. Najnovije LC-MS/MS procedure, pored odvajanja i kvantifikacije C3-epi-25(OH)D i 25(OH)D, omogućavaju takođe i određivanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> iz jako male količine uzorka (25µl)<sup>(141)</sup>.

## 2.5. Unos vitamina D- procena pomo u anketa ishrane

Procena unosa vitamina D je složen proces koji se bazira na proceni unosa namirnica (hrane i pića) i suplemenata. Za procenu unosa svih nutrijenata, pa i vitamina D, koriste se ankete ishrane koje se mogu primeniti na nacionalnom ili individualnom nivou <sup>(142)</sup>. Cilj anketa ishrane, na nacionalnom nivou, može biti procena bezbednosti i adekvatnosti konzumirane hrane kako bi se procenile potrebe i opšte zdravlje populacije i/ili sproveo program određene nutritivne intervencije. Na individualnom nivou, ankete ishrane se koriste u kliničkim uslovima kao pomoć kod dijagnoze, prevencije i lečenja određenih zdravstvenih stanja koja su u direktnoj vezi sa namirninom ishrane (dijabetes, alergije, kardiovaskularni poremećaji itd.). U istraživanjima se ankete ishrane koriste za utvrđivanje povezanosti između neke fiziološke funkcije (ili bolesti) i unosa ishrane <sup>(143)</sup>. Pored unosa hrane (dijetarni unos) za procenu individualnog nutritivnog statusa neophodno je sprovesti nekoliko različitih merenja <sup>(144, 145)</sup>, a ceo proces poznat je pod nazivom ABCD:

- A. Antropometrijsko merenje
- B. Biohemijski parametri
- C. Klinička procena
- D. Dijetarni unos

U naučnim istraživanjima se podaci o unosu vitamina D i drugih nutrijenata najčešće prikupljaju direktno od pojedinaca (individualna procena), dok se za nacionalne potrebe unos može procenjivati indirektno, procenom parametara kao što su dostupnost namirnica, kupovna moć ili procenom potrošene hrane koja je zastupljena u Srbiji <sup>(146)</sup>.

Sam proces procene unosa vitamina D i drugih nutrijenata se sastoji iz nekoliko koraka i uključuje najpre prikupljanje podataka od pojedinaca o svim konzumiranim namirnicama, jelima, pićima i suplementima putem anketa ishrane. U sledećem koraku se identifikuju namirnice, procenjuje količina konzumiranih namirnica u okviru porcija, kao i učestalost konzumacije u vremenskom periodu koji se posmatra. Za završni korak pri izračunavanju unosa vitamina D ili drugih nutrijenata neophodno je korišćenje tabele o sastavu namirnica

koje su specifične za svaku zemlju. Prve tabele o sastavu namirnica u svetu datiraju s kraja XIX veka <sup>(147)</sup>, a na našim prostorima od 1965. godine sa nekoliko izdanja do danas <sup>(148)</sup>. Na prostoru Srbije prva elektronska baza podataka o sastavu namirnica je formirana pre nekoliko godina <sup>(149)</sup>. Da bi se dobio podatak o unosu vitamina D podaci o njegovom sadržaju u svakoj namirnici se preuzimaju iz baze podataka o sastavu namirnica i zajedno sa količinom konzumirane namirnice u okviru porcije (g) i frekvencijom konzumiranja uvrštavaju u jednačinu:

*Unos nutrijenta (vitamin D) = količina konzumirane namirnice u okviru porcije (g) x frekvencija konzumiranja x sadržaj nutrijenta (vitamin D) po g namirnice*

Zatim se izrađuje zbirni unos vitamina D iz svih konzumiranih namirnica zabeleženih anketom ishrane u toku perioda ispitivanja za svakog ispitanika pojedinačno <sup>(143)</sup>.

Same ankete ishrane prema periodu koji posmatraju mogu se podeliti na procenu ishrane u tačno određenim danima (anketa dvadeset etvoro osnovne ishrane i upitnici sa merenjem namirnica ili listom namirnica) ili posmatraju duži period u prošlosti (upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica i istoriji ishrane) <sup>(143)</sup>. Pregled anketa prikazan je u nastavku.

### **2.5.1. Anketa o dvadeset etvoro osnovnoj ishrani**

Anketa o dvadeset etvoro osnovnoj ishrani (24h-AI) predstavlja zapis konzumiranih količina i namirnica u predhodnih 24 sata, gde se ispitanik samostalno ili u razgovoru sa stručnim licem priseća svega što je pojeo i popio u tom vremenskom periodu. Ovo je najrasprostranjeniji upitnik za individualnu procenu unosa hranljivih supstanci, a detalji o prednostima i nedostacima su dati u tabeli 2. Smatra se da ispitanik može pouzdano dati informacije o namirnicima i njihovoj količini koje je uneo predhodnog dana prateći hronološki red od buđenja do poinka. Da bi se utvrdio prosečan unos vitamina D ili nekog drugog nutrijenta 24h-AI je potrebno ponoviti nekoliko puta (nedeljno, mesečno ili godišnje) i/ili tokom različitih godišnjih doba što je posebno bitno za procenu unosa vitamina D.



### **2.5.2. Dnevnik ishrane**

U sprovođenju dnevnika ishrane (eng. food record) ispitanik beleži sve namirnice, jela i pića koje je uzimao u dogovorenom vremenskom periodu (1 dan, 1 nedelju) beleže i njihove količine. Prednost ove ankete ishrane je što se ne oslanja na pamćenje ispitanika, a detalji o prednostima i nedostacima date su u tabeli 2.

### **2.5.3. Upitnik o vrsti namirnica**

Upitnik o vrsti namirnica (eng. manu record) je najjednostavniji upitnik za primenu jer se od ispitanika traži da se sete samo vrsta namirnica koje su konzumirali za unapred dogovorene dane, ali ne i količina namirnica. Ovaj upitnik se primenjuje kod ispitanika koji imaju ustaljen i ne mnogo raznovrstan način ishrane, kao i kada osobe imaju problema da odrede količinu konzumiranih namirnica.

### **2.5.4. Upitnik o istoriji ishrane**

Upitnik o istoriji ishrane (eng. Diet record) se koristi za individualne procene navika u ishrani ispitanika i sprovodi ga stručno lice (nutricionista, lekar, medicinska sestra) u direktnom razgovoru sa ispitanikom koristeći standardnu listu najčešće konzumiranih namirnica.

### **2.5.5. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica**

Upitnikom o učestalosti konzumiranja namirnica (eng. Food Frequency Questionnaires - FFQ) procenjuje se frekvencija i količina konzumiranja raznih vrsta namirnica (najčešće od 100 do 200 različitih namirnica) u tačno definisanom vremenskom periodu (najčešće poslednji mesec ili poslednja tri meseca)<sup>(150)</sup>. Pitanja u FFQ se sastoje od liste namirnica i ponuđenih opcija za količinu i učestalost konzumiranja istih od kojih ispitanik bira jedan od ponuđenih odgovora. Ponuđene namirnice u okviru FFQ zavise od svrhe i obima istraživanja. Ako je cilj istraživanja procena unosa vitamina D, lista namirnica u FFQ će sadržati specifične namirnice koje predstavljaju prirodne izvore ovog vitamina, kao i obogaćene namirnice vitaminom D prisutne na tržištu. Takođe je moguća detaljnija analiza i preračun hranljivih supstanci kroz dodatna pitanja u FFQ o pripremi hrane i načinima snabdevanja. Radi veće preciznosti u proceni količine unetih namirnica, u okviru pitanja u FFQ mogu biti prikazane fotografije različitih porcija. FFQ se najčešće

primenjuje u istraživanjima koja ispituju povezanost na ina ishrane i nekih bolesti ili rizika za razvoj bolesti. Zbog malih troškova, FFQ je pogodan metod za procenu navika u ishrani u velikim epidemiološkim nutritivnim studijama <sup>(150)</sup>.

### 2.5.6. Upitnik dnevnika ishrane sa merenjem namirnica

U sprovo enju upitnika dnevnika ishrane sa merenjem namirnica (eng. Weighted records) ispitanik meri sve namirnice pre nego što ih pojede ili popije. Koli ine sa detaljnim opisom konzumiranih namirnica beleži u specijalanu knjižicu namenjenu za to. Ovo je najzahtevnija anketa koja traži izuzetnu posve enost ispitanika jer se sve namirnice mere a podaci zapisuju pre same konzumacije. Naj eš e se ovaj tip ankete primenjuje u metaboli kim studijama za pra enje specifi nih hranljivih supstanci.

**Tabela 2.** Prednosti i nedostaci anketa ishrane, naj eš e koriš enih u istraživanjima, pripremljene prema podacima iz publikacija <sup>(143)</sup>

<b>Upitnik o u estalosti konzumiranja namirnica (FFQ) <sup>(150)</sup></b>	
<b>Prednosti</b>	<b>Nedostaci</b>
Upitnik je standardizovan	Zahteva prise anje ispitanika o konzumiranim namirnicama
Prema nekim autorima najbolja je metodom za istraživanja o povezanosti na ina ishrane i bolesti	Zavisi od sposobnosti ispitanika da opiše svoju ishranu
Nije neophodan direktan razgovor sa stru nim licem	Mogu e su greške u proceni unosa kad se nekoliko namirnica svrsta pod jedan naziv
Umereno zahtevan za ispitanika i ne uti e na navike u ishrani	Nije prikladan za odre ivanje apsolutnog unosa nutrijenata u velikim istraživanjima
Nije skup ni za primenu na velikom broju ispitanika i može se opti ki skenirati	Potencijalno nereprezentativan ako nije validiran za specifi no podru je s obzirom na uobi ajene namirnice i veli inu porcije
Može biti reprezentativniji za uobi ajen unos nego dnevnik ishrane ili 24h-AI	

<b>Dnevnik ishrane</b>	
<b>Prednosti</b>	<b>Nedostaci</b>
Ne oslanja se na pamćenje	Zahteva saradnju ispitanika
Daje detaljne informacije	Pri primeni u velikim istraživanjima može biti neispunjen adekvatno
Koristi se za validaciju drugih metoda	Ispitanik mora biti pismen
Daje podatke o prehrambenim navikama	Potreban je duži vremenski period za prikupljanje podataka
Dnevnik koji obuhvata nekoliko dana je reprezentativan za uobičajeni unos	Može uticati na promene u ishrani ispitanika
Za period do 5 dana daje pouzdane rezultate	Analiza podataka je skupa i zahteva puno rada
<b>Anketa o dvadeset etvoro asovnoj ishrani (24h-AI)</b>	
<b>Prednosti</b>	<b>Nedostaci</b>
Daje detaljne informacije o vrsti konzumiranih namirnica	Samo jedno prisecenje nije reprezentativno za uobičajeni unos
Jednostavna primena	Podcenjen/precenjen unos
Nije skupa	Oslanja se na pamćenje
Objektivna metoda	Tendencija precenjivanja hrane koja se konzumira u malim količinama (npr. voćna) i obrnuto (brza hrana)
Nekoliko 24h-AI se može iskoristiti za individualnu procenu unosa nutrijenata	Zahteva puno vremena za obradu
	Moguće je da malo optereti ispitanika

### **2.5.7. Validacija upitnika**

Svaka od prethodno pomenutih anketa ishrane ima svoju specifičnu namenu, stoga je pre njihove primene važno definisati jasan cilj sa kojim se sakupljaju informacije pomoću anketa ishrane. Naravno nijedna od anketa ishrane nije toliko savršena da se njom određuje unos bez greške i svaka ima određene prednosti i mane. Upravo je to jedan od glavnih razloga za postojanje evaluacionih studija, odnosno studija validacije kojima se proverava da li je primenjenim upitnikom moguće adekvatno proceniti unos hranljivih

supstanci. Najčešće se adekvatnost FFQ upitnika procenjuje u studijama validacije za specifičan nutrijent (npr. vitamin D) ili grupu nutrijenata (npr. masne kiseline). U studijama validacije FFQ se upoređuje sa druge dve referentne metode kao što su 24h-AI, dnevnik ishrane, dnevnik ishrane sa merenjem namirnica ili specifični biomarkeri <sup>(150-152)</sup>. U studijama validacije FFQ specifičnog za određeni nutrijent savetuje se da se kao druge dve referentne metode koriste biomarker (npr. 25(OH) za vitamin D) i 24h-AI ili dnevnik ishrane sa merenjem namirnica <sup>(153)</sup>. Biomarkeri kao metoda imaju prednost jer su slučajne greške pri njihovom određivanju nezavisne od slučajnih grešaka mogu ih primenom bilo kog od upitnika <sup>(154)</sup>. Kada se kao referentna metoda u studiji validacije izaberu biomarkeri, očekuje se da stepeni korelacije između metoda budu manji, ali u isto vreme da nema preklapanja grešaka zbog upotrebljenih metoda <sup>(154)</sup>. Kao biomarker u studiji validacije upitnika za vitamin D koristi se ukupni 25(OH)D koji reflektuje vitamin D endogeno sintetisan kao i onaj unet namirnicama i suplementima <sup>(128)</sup>. Pošto je teško kontrolisati i odrediti količinu vitamina D koja je endogeno sintetisana nakon izlaganja Sunčevim zracima, studije validacije za vitamin D se sprovode u zimskom periodu kada je minimalna endogena sinteza usled smanjenog UVB zračenja za oblasti severno od 42 paralele <sup>(16)</sup>. Pored tradicionalnog pristupa u kome se međusobno upoređuju rezultati svake od tri primenjene metode u studiji validacije, u novije vreme se primenjuje metoda trijada <sup>(153)</sup>. Metodu trijada detaljno su opisali Ocke i Kaaks <sup>(155)</sup>. Kod nutrijenata, kao što je vitamin D, gde koncentracija biomarkera odgovara unosu nutrijenta, korelacija između unosa procenjenog upitnicima i koncentracije biomarkera u krvi se može interpretirati kao donja granica stvarne validnosti upitnika (eng. lower bound of the true questionnaire validity) <sup>(152)</sup>. Stoga, za određivanje koeficijenta validacije procene unosa specifičnog nutrijenta pomoću FFQ, Kaaks i saradnici <sup>(153)</sup> predlažu istraživačima da koriste dve dodatne metode (npr. za vitamin D: određeni ukupan sadržaj 25(OH)D u krvi i 24h-AI). U metodi trijada, koja predstavlja trostruki pristup validaciji, korelacije između podataka dobijenih svakom od tri primenjene metode se koriste za određivanje koeficijenta validacije FFQ (QI). Koeficijent validacije predstavlja korelaciju između unosa nutrijenta procenjenog pomoću FFQ i nepoznatog 'stvarnog' unosa nutrijenta ispitanika <sup>(153)</sup>.

Za računavanje koeficijenta validacije FFQ ( QI) koristi se sledeća jednačina:

$$...QI = \sqrt{r_{QB} \cdot \frac{r_{QR}}{r_{BR}}}$$

U jednoj QI predstavlja koeficijent validacije FFQ, r<sub>QB</sub>-koeficijent korelacije između podataka FFQ i vrednosti biomarkera, r<sub>BR</sub>-koeficijent korelacije između biomarkera i podataka 24h-AI, dok je r<sub>QR</sub> koeficijent korelacije između podataka dobijenih pomoću FFQ i 24h-AI. Tako se izražavaju gornja i donja granica pouzdanosti, odnosno interval pouzdanosti za srednju vrednost koeficijenta validacije za 95% populacije. Interval pouzdanosti predstavlja raspon u kome možemo da očekujemo (sa određenom verovatnošću) da se nalazi srednja vrednost koeficijenta validacije za ispitanu populaciju, i što je manja širina intervala pouzdanosti veća je vrednost zaključaka. Interval pouzdanosti se kod metode trijada izražava koristeći „bootstrap sampling“ gde 1000 uzoraka biva zamenjeno brojem ispitanika u studiji validacije <sup>(155, 156)</sup>.

## 2.6. Preporuke za vitamin D

### 2.6.1. Preporuke za unos vitamina D

Prve preporuke za unos vitamina D kao esencijalnog nutrijenta datiraju još sa početka dvadesetog veka kada je preporuka za referentni dnevni unos za vitamin D iznosila 200 IU (5µg) holekalciferola <sup>(157)</sup>. Pola veka kasnije, zvanične preporuke objavila je Evropska komisija u kojima su preporuke za unos vitamina D svrstane u kategorije prema uzrastu i polu <sup>(158)</sup>. U saglasnosti sa preporukama Evropske komisije objavljene su preporuke Američkog Medicinskog Instituta (Institute of Medicine IOM) <sup>(159)</sup>, WHO <sup>(160)</sup>, Australije i Novog Zelanda <sup>(161)</sup> i Nordiskih zemalja <sup>(162)</sup>. Tokom 2011. godine Američki Medicinski Institut u saradnji sa naučnicima severne Amerike i celog sveta doneo je nove preporuke o količini vitamina D potrebnoj za život, zdravlje i normalan razvoj ljudi koje su date u tabeli 3. Preporuke su svrstane u četiri kategorije i referentni dnevni unos (eng. Dietary Reference Intake, DRI) <sup>(163)</sup>. Prethodno su precizno definisani okviri preporuka pa razlikujemo: procenjenju prosečnu potrebu (eng. Estimated Average Requirement, EAR), preporučeni dnevni unos (eng. Recommended Dietary Allowance, RDA), adekvatni unos (eng. Adequate Intake, AI) i dozvoljenu gornju granicu unosa (eng. Upper limit, UL). Procenjena prosečna potreba definisana je kao srednji nivo unosa

hranljive supstance (nutrijenta) koja je dovoljna da zadovolji potrebe 50 % ljudi. Preporučeni dnevni unos predstavlja nivo unosa koji zadovoljava zahteve 97,5 % pojedinaca u grupi i predstavlja vrednost procenjene prosečne potrebe uvećane za dvostruku vrednost standardne devijacije ( $RDA = EAR + 2 SD$ ). Adekvatni unos je procenjeni nivo unosa za koji se očekuje da zadovolji nutritivne potrebe neke specifične populacije kao što su na primer novorođenčad ili odojčad. Adekvatni unos se koristi onda kada se ne mogu odrediti EAR ili RDA. Dozvoljena gornja granica se definiše kao najviši nivo unosa koji ne predstavlja rizik po zdravlje pojedinaca u grupi.

Glavna diskusija u vezi je oko postavljanja RDA vrednosti vitamina D kod novorođenčadi i ustanovljena je kategorija adekvatnog unosa od 400 IU (Tabela 3). Ovakoli ina smatra se zadovoljavajućom za održavanje koncentracije 25(OH)D oko 50 nmol/L (20 ng/mL) u krvi, što je potrebno za normalan razvoj kostiju.

**Tabela 3.** Preporuke za referentni dnevni unos vitamina D

<b>Životno doba</b>	<b>Procenjene prosečne potrebe*</b>	<b>Preporučeni unos*</b>	<b>Dozvoljena gornja granica unosa*</b>
	IU/dan	IU/dan	IU/dan
Novorođenčad 0-6 meseci	**	**	1000
Odojčad 6-12 meseci	**	**	1500
Deca 1-3 godine	400	600	2500
Deca 4-8 godina	400	600	3000
Deca 8-13 godina	400	600	4000
Adolescenti 13-18 godina	400	600	4000
Odrasli 19-70 godina	400	600	4000
Ljudi stariji od 70 godina	400	800	4000
Trudnice	400	600	4000
Dojilje	400	600	4000

\*Prema preporukama Američkog Medicinskog Instituta<sup>(163)</sup>

\*\*Za novorođenčad i odojčad adekvatni unos je 400 IU/dan

2000 IU/dan je dozvoljena gornja granica unosa za novorođenčad prema preporukama Evropske Komisije<sup>(164)</sup>

Kako je navedeno u izveštaju komisije, nije bilo dovoljno raspoloživih podataka i studija na populaciji novorođenadi koje se ne odnose samo na zdravlje kostiju, na osnovu kojih bi se povećala RDA vrednost vitamina D<sup>(163)</sup>. White smatra da su važne preporuke konzervativne i da su zanemarile dokaze o značaju vitamina D za imuni sistem<sup>(165)</sup>. Ove preporuke su uglavnom u saglasnosti sa Evropskim preporukama<sup>(164)</sup>. Smatraju i novorođenadi i decu osetljivom populacijom za deficijenciju vitaminom D u Evropskoj Uniji uvedena je kategorija Referentni Unos Populacije (eng. Population Reference Intake) prema kojoj količina vitamina D od 400-1000 IU/dan zadovoljava potrebe praktično svih novorođenadi<sup>(164)</sup> uzimajući u obzir neizlaganje dejstvu Sunčevih zraka ove populacije i da obogaćivanje hrane vitaminom D nije prisutno u svim zemljama. Ovako visoka preporuka za unos vitamina D do 1000 IU je već pola veka prisutna u pojedinim zemljama Evrope kao što su Francuska<sup>(166)</sup> i Finska<sup>(167)</sup>, dok je na našim prostorima postojala praksa od 50-ih godina da se deci svih uzrasta daje riblje ulje posebno u zimskom periodu. Međutim, poslednjih godina u svetu se pokazuju pozitivni efekti lečenja dece jednokratnom velikom dozom vitamina D (eng. stross) u stanjima rahitisa, cistične fibroze ili inflamatornih bolesti creva<sup>(168-170)</sup>. Dodatno, Evropska komisija je za unos vitamina D kod novorođenadi definisala dozvoljenu gornju granicu od 2000 IU/dan, za razliku od IOM koji je za novorođenad do 6 meseci postavio granicu od 1000 IU/dan, a za novorođenad od 6 do 12 meseci 1500 IU/dan (Tabela 3). Zanimljivo je da su ove vrednosti postavljene uzimajući u obzir podatke iz 1938. godine<sup>(171)</sup>, gde je primenjen smanjeni linearni rast kod novorođenadi koja su bila na tretmanu vitaminom D od 1800-4500 IU/dan. Do danas nema novih podataka koji bi razjasnili kakve negativne efekte može da ima prekoračenje dozvoljene gornje granice. Zabrinutost od moguće pojave hipervitaminoze vitaminom D teško da bi mogla biti opravdana jer u većini slučajeva kod novorođenadi prekoračenje preporuka za suplementaciju je u okvirima od nekoliko dana do nekoliko meseci. U Srbiji suplementi za novorođenad su u pakovanjima koja onemogućavaju prolongirano prekoračenje doze. Sa druge strane, definicija hipervitaminoze vitaminom D nije uniformna i IOM je definiše kao koncentraciju 25(OH)D u krvi od 400-1250 nmol/L<sup>(163)</sup>, dok Pedijatrijsko društvo Kanade tu granicu postavlja iznad 500 nmol/L<sup>(172)</sup>. Ipak, neophodan je oprez jer su čak i pri nižim koncentracijama 25(OH)D od 400 nmol/L registrovani slučajevi pojave intoksikacije kod dece pri prolongiranom izlaganju visokim dozama vitamina D<sup>(173-176)</sup>.

Adekvatna suplementacija predstavlja najsigurniji i najjednostavniji način za zadovoljavanje potreba novorođenadi, jer se ne izlažu Sunčevom zračenju prvih 6 meseci života. Istraživanja su pokazala da je i suplementacija majki u toku perioda dojenja neophodna. Atkinson, i Wagner i saradnici smatraju da unos vitamina D prema trenutnim preporukama za dojilje nije dovoljan da zadovolji potrebe i majke i novorođeneta i da su neophodne veće doze vitamina D (oko 6000 IU/dan) <sup>(177, 178)</sup>. Dugoročni rizici ovakve predložene suplementacije za majke još uvek su predmet istraživanja. Za donošenje novih adekvatnijih preporuka za unos i status vitamina D neophodni su vrsti dokazi u vidu rezultata randomiziranih dozno-zavisnih studija, posebno kod dece, trudnica i dojilja, koji bi pokazali efekat različitih doza vitamina D na zdravlje kao i odgovor celokupnog organizma <sup>(179)</sup>. Za sada stoje preporuke da je suplementacija vitaminom D neophodna kod svih novorođenadi odmah nakon rođenja i da je preporučeni dnevni unos od 200-400 IU vitamina D po danu <sup>(157, 164, 180)</sup>.

### **2.6.2. Preporuke za status vitamina D**

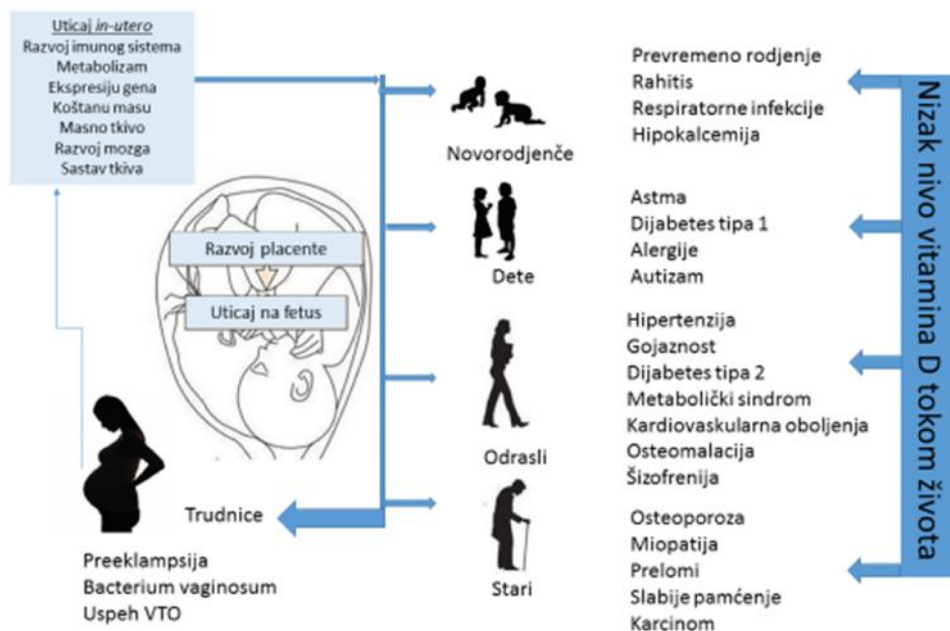
Da li je status vitamina D u organizmu adekvatan procenjuje se na osnovu koncentracije 25(OH)D u krvi prema propisanim granicama vrednostima od strane Američkog Medicinskog Instituta <sup>(163, 181)</sup>. Granica vrednost 25(OH)D, ispod koje su osobe u riziku za nastanak deficijencije vitamina D, je koncentracija u krvi niža od 30 nmol/L (12 ng/mL). Vrednosti niže od 25 nmol/L (10 ng/mL) povezuju sa ozbiljnom (teškom) deficijencijom <sup>(182)</sup>. Procenjeno je da je koncentracija 25(OH)D od 50 nmol/L (20 ng/mL) minimalna za postizanje adekvatnog zdravlja kostiju kod 97 % stanovništva <sup>(182)</sup>. Američki Medicinski Institut je 2011. godine razmatrao postojeće činjenice i doneo nove preporuke za referentni dietetski unos (eng. Dietary Reference Intake – DRI) za kalcijum i vitamin D. Glavna diskusija se vodila oko uspostavljanje veće vrednosti za koncentraciju 25(OH)D od 75 nmol/L (30 ng/mL) kao optimane granice za postizanje adekvatnog zdravlja, koje se ne odnosi samo na zdravlje kostiju već i na imuni sistem i opšte zdravlje. Tako je procenjeno da vrednosti iznad 125 nmol/L (50 ng/mL) potencijano mogu biti povezane sa toksičnim efektima. Važno je uzeti u obzir da pojedini naučnici smatraju da su zvanične preporuke konzervativne i da su donete zanemarujući dokaze i rezultate studija o koristima vitamina D vezanim za imuni sistem <sup>(165)</sup>. Ova tema je i dalje predmet debate, ali je jedan od glavnih argumenata za donošenje novih adekvatnih preporuka



upravo nedostatak studija, posebno kod dece, koje bi pokazale efekat različitih doza vitamina D na zdravlje kao i na odgovor celokupnog organizma <sup>(179)</sup>.

## 2.7. Nedostatak vitamina D

Nedostatak ili deficijencija vitamina D kod ljudi povezani su sa brojnim negativnim uticajima na opšte zdravlje ukoliko je stanje deficijencije prolongirano. Veruje se da više od polovine ukupnog stanovništva naše planete nema adekvatnog izlaganja Sun evoj svetlosti da bi održalo potreban nivo vitamina D u krvi <sup>(183, 184)</sup> i da je pored neadekvatnog unosa vitamina D to jedan od glavnih uzroka nastanka deficijencije. Hronična ili povremena deficijencija vitamina D povezuje se sa brojnim komplikacijama tokom celog životnog doba uključujući i razvoj *in-utero* (Slika 7).



**Slika 7.** Uticaj i potencijalne posledice niskog nivoa vitamina D *in-utero* i tokom života. Preuzeto iz rada Hossein–neshad i Holick, 2013 <sup>(185)</sup> i prerađeno.

Najčešće komplikacije vezane su za proces starenja i smanjenje mineralizacije kostiju, što dalje može dovesti do povećane sklonosti ka lomljenju kostiju i razvoju osteoporoze <sup>(7)</sup>. Prolongirana deficijencija vitamina D tokom života dovodi se i u vezu sa dijabetesom i kardiovaskularnim poremećajima <sup>(186-189)</sup>, neurološkim poremećajima <sup>(190, 191)</sup>,

aterosklerozom, autoimunim bolestima, slaboš u miši a i karcinomima<sup>(192-199)</sup>. Brojna istraživanja novih funkcija vitamina D povezuju adekvatan status ovog vitamina u ranom detinjstvu <sup>(2)</sup> sa potencijalno preventivnom ulogom u bolestima kao što su astma <sup>(9)</sup>, respiratorne infekcije <sup>(10)</sup>, autizam <sup>(11, 12)</sup>, dijabetes tipa 1<sup>(13)</sup> itd. Posebna pažnja posve uje se preventivi nedostatka vitamina D primenom adekvatne suplementacije u ranom detinjstvu i trudno i kada se postavlja dobra osnova skeleta a zatim i celog tela za budu i život.

Suplementacija vitaminom D kod novoro en adi i dece ima važnu ulogu tokom rasta i razvoja u o uvanju zdravlja kostiju. Nedostatak vitamina D u ranom detinjstvu može dovesti do resorpcije kostiju i razvoja rahitisa, najpoznatije bolesti kostiju kod dece. Rahitis predstavlja poreme aj mineralizacije kostiju u razvoju usled taloženja nemineralizovanih osteoidea što dovodi do deformacija kostiju <sup>(200)</sup>. Na nivou metafiza kostiju koje rastu (eng. growth plate) dolazi do deformiteta na zglobovima ekstremiteta, kolenima ili kostima glave. Rahitis se naj eš e prepoznaje po krivim nogama (X ili O oblika), što može da ugrozi normalan motorni razvoj jer je uglavnom prisutna i smanjenja miši na funkcija <sup>(201, 202)</sup>. U najve em broju slu ajeva uzrok rahitisa je nutritivne prirode u vidu nedostatka vitamina D ili kalcijuma, mada uzrok može biti i genetske prirode ili posledica bolesti bubrega ili jetre <sup>(203)</sup>. Terapija rahitisa otkrivena je pre više od 70 godina i uklju ivala je konzumiranje kravljeg mleka kao izvora kalcijuma i izlaganja obolelih suncu zbog endogene sinteze vitamina D, dok se u današnje vreme obolelima daju suplementi kalcijuma i vitamina D. Iako je prevencija rahitisa jednostavna i dalje je prisutna incidenca rahitisa u rangu od 2.9 do 95 slu ajeva na 100 000 dece u svetu <sup>(200)</sup>, ali i na našim prostorima <sup>(204)</sup>. Faktori rizika za pojavu rahitisa usled nedostatka vitamina D mogu biti svrstani u kategorije geografske prirode (minimalna engodena sinteza vitamina D usled geografskog položaja), zatim uticaj kulture (na in odevanja gde se koža ne izlaže suncu), kao i na ini ishrane koji ne uklju uje dovoljne koli ine namirnica bogatim vitaminom D i kalcijumom <sup>(205)</sup>. Tako e jedan od faktora je tamnija boja kože i nedovoljna suplementacija vitaminom D posebno u zemljama u kojima nema programa oboga ivaja namirnica vitaminom D <sup>(24, 206, 207)</sup>.

Na simpozijumu održanom u organizaciji WHO 2015. godine <sup>(208)</sup>, prikazani su rezultati prospektivnih i observacionih studija prema kojima novoro en ad majki sa nedostatkom

vitamina D u trudno i naj eš e imaju smanjene depoe i nizak status vitamina D. Objedinjeni rezultati ukazuju na povezanost nedostatka vitamina D tokom trudno e i u ranom detinjstvu sa pojavom hipokalcemije, rahitisa i uzrocima nastanka preloma prouzrokovanih osteoporozom <sup>(208-210)</sup>. U randomiziranoj kontrolisanoj studiji deficijencija majki u ranoj trudno i, pra ena od 19 do 34 nedelje, bila je u direktnoj vezi sa predvi anjem rahitisa kod novoro en eta preko pove anja odnosa dužine kostiju femura i preseka femoralnih metafiza, mereno ultrazvukom visoke rezolucije <sup>(211)</sup>. Pored rizika za razvoj rahitisa, negativan uticaj nedostatka vitamina D na postizanje maksimuma stvaranja koštane mase (eng. Peak bone mass) prime en je u nekoliko randomiziranih kontrolisanih studija koje su pratile rast i gustinu kostiju <sup>(212-214)</sup>. Interventna studija sa vitaminom D pokazala je da su novoro en ad rodjena u terminu, ija je koncentracija 25(OH)D bila manja od 11 ng/mL (27.5 nmol/L), imala manji mineralni sadržaj kostiju celog tela (Whole Body Bone Mineral Content, WB BMC) ( $19.5 \pm 3.1$  g/kg) u pore enju sa onima ija je koncentracija 25(OH)D bila iznad 11 ng/mL ( $21.3 \pm 2.0$  g/kg;  $p=0.017$ ) <sup>(215)</sup>. Dodatno je usled uticaja statusa vitamina D na homeostazu kalcijuma i fosfora, otkrivena veza izme u niske koncentracije ukupnog 25(OH)D majke u trudno i i razvoja karijesa kod dece <sup>(216)</sup>, kao i smanjenog kvaliteta zuba i kostiju merene mineralnim sadržajem kostiju celog tela (eng. WB BMC). Na mogu e postojanje ovakve zavisnosti ukazano je nekoliko decenija ranije kada su prime ene promene na gle i zuba dece prose ne starosti oko 2.5 godine, ije majke nisu bile od 12 nedelje trudno e na suplementima vitamina D, u odnosu na kontrolnu grupu koja je uzimala 400 IU vitamina D <sup>(217)</sup>. Nedostatak vitamina D u trudno i, o kome e više biti re eno u poglavlju 2.7., povezuje se sa pove anim rizikom od neželjenih komplikacija u trudno i kao što je preeklampsija, prevremeni porodjaj (Slika 7), kao i stanja povezanih sa pove anjem perinatalnih bolesti i smrtnosti <sup>(218, 219)</sup>. Me utim, evidentan je nedostatak ve ih interventnih studija u trudno i i ranom detinjstvu kojima bi se pokazalo koliko je suplementacija vitaminom D zaista efikasna jer dugoro ne posledice suplementacije vitaminom D na kosti još uvek nisu u potpunosti razjašnjene.

## 2.8. Vitamin D u trudno i

Tokom trudno e potrebe za vitaminom D se postepeno pove avaju sa rastom i razvojem fetusa. Koncentracija aktivnog oblika  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se duplo pove ava u poslednjem trimestru trudno e u pore enju sa stanjem pre ili odmah nakon trudno e <sup>(220, 221)</sup>. Tako e u trudno i je registrovan porast vitamin D vezuju ih proteina (eng.DBP) <sup>(222)</sup> i pove ana ekspresije enzima CYP27A1 u bubrezima trudnica, kao i u placenti i endometrijum-decidui <sup>(223)</sup> za šta se prepostavlja da uzroci mogu biti hormoni (estradiol, prolaktin, humani placentalni laktogen itd.) <sup>(220, 224)</sup>. Pove anjem ekspresije CYP27A1 placenti, endometrijumu i bubrezima pove ava se sinteza  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Poznato je da se  $25(\text{OH})\text{D}$  transportuje kroz placentu pasivnim ili olakšanim transportom, kao i da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i PTH ne prelaze placentnu barijeru <sup>(225, 226)</sup>. Sama placenta može sintetisati  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  <sup>(227)</sup>. Koncentracija  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u serumu fetusa je niža u odnosu na maj inu <sup>(220, 228, 229)</sup>. Studije sugerišu da nivou  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u serumu fetusa, pored placent, verovatno doprinosi i sinteza u bubrezima fetusa u kojima je zabeležena ekspresija CYP27A1 <sup>(220, 230, 231)</sup>. Pored pove anja koncentracije  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , smanjuje se PTH majke, a pove ava aktivni transport kalcijuma kroz placentu kako bi se zadovoljile rastu e potrebe fetusa tokom procesa mineralizacije kostiju <sup>(223, 232)</sup>. Zanimljivo je da se na ro enju skelet sastoji od oko 30 grama kalcijuma od kojih se najve i procenat (oko 75%) akumulira u tre em trimestru trudno e <sup>(227)</sup>. U toku trudno e i laktacije organizam se prilago ava pove anim potrebama za kalcijumom naj eš e samim pove anjem intestinalne apsorpcije <sup>(233)</sup>, mada je i dalje nejasno da li ove adaptacije zavise od statusa vitamina D majke <sup>(181)</sup>. Dodatno  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ima važnu ulogu u regulaciji imuniteta u toku trudno e jer se u prisustvu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibira oslobadjanje proinflamatornih Th1 citokina, a stimuliše oslobadjanje Th2 citokina. Za Th2 citokine, pored njihove uloge u imunom sistemu, smatra se da uti u na implementaciju embriona i pomažu u smanjenju odbacivanja ploda usled ekspresije gena HOXA10 <sup>(223, 234-236)</sup>. Rezultati studija ukazuju da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  pomaže u implemetaciji i održavanju fiziološke trudno e, podržava rast i razvoj fetusa preko transporta kalcijuma, suzbija lu enje proinflamatornih citokina i kontroliše lu enje nekoliko hormona u placenti <sup>(223, 236, 237)</sup>. Takodje se misli da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ima ulogu u regulaciji cikli nog adenzin monofosfata (cAMP) u trofoblastu, ime bi se omogu io novi mehanizam za aktivaciju imunog odgovora u placenti <sup>(238)</sup>

Status vitamina D fetusa direktno zavisi od statusa vitamina D majke. Koncentracija 25(OH)D u pup anoj vrpci okvirno iznosi 75 % od nivoa registrovanog u serumu majke<sup>(239)</sup>. Dakle, glavni izvor vitamina D za rast i razvoj fetusa je upravo 25(OH)D koji se nalazi u krvotoku majke-trudnice, usled čega je od velikog značaja da trudnice imaju adekvatan status vitamina D tokom celog perioda trudnoće. Nakon porođaja, glavni izvor vitamina D za novorođenčete je egzogenog porekla. Unosi se kroz majčino mleko, adaptirano mleko – formulu ili suplemenat vitamina D u vidu kapi<sup>(240)</sup>. Važno je pomenuti da čak i novorođenčad hranjena samo adaptiranim formulama, koje su obogaćene vitaminom D, mogu da obole od rahitisa. Pokazano je da u toku 24 h, u prvim mesecima života, novorođenčad ne popije dovoljno formule (1L) da bi unela 400 IU vitamina D, već približno polovinu te količine (200 IU)<sup>(241)</sup>. To nije dovoljno da obezbedi potrebne količine vitamina D, posebno u uslovima kada su i majke u trudnoći bile u deficijenciji, pa je stoga neophodna suplementacija ovim vitaminom svih novorođenih beba.

### **2.8.1. Nedostatak vitamin D u trudnoći**

U celom svetu široko je rasprostranjena pojava nedostatka vitamina D kod trudnica<sup>(208)</sup> sa većom incidencijom u oblastima severnije od 42° paralele<sup>(23, 242)</sup>. Pored geografskog položaja i godišnjeg doba u studijama se ističu faktori koji mogu doprineti razvoju deficijencije vitamina D kao što su tamnija boja kože, smanjena izloženost Sunčevoj svetlosti i nizak unos vitamina D<sup>(183, 219, 243, 244)</sup>. Nedavno je objavljeno da je rasprostranjenost nedostatka vitamina D među trudnicama Mediteranskog regiona 22.7 do 90.3%<sup>(218)</sup> što je vrlo slično objedinjenim podacima za Ameriku, Australiju, Južnu Aziju i Bliski Istok (26–98%)<sup>(237)</sup>. U prethodno pomenutim i brojnim drugim studijama podvlači se nekoliko faktora koji mogu uticati na status vitamina D. Faktori rizika mogu se podeliti u kategorije u zavisnosti da li utiču na endogenu sintezu vitamina D, na njegov egzogeni unos ili na zadržavanje u telu.

Kao što je prethodno pomenuto vitamin D u humanom organizmu može se sintetisati endogeno u koži nakon izlaganja Sunčevoj svetlosti (UVB), čija je talasna dužina od ~285 do 320 nm<sup>(15)</sup>. Endogena sinteza zavisi od vremena izlaganja kože, godišnjeg doba, doba

dana, zaga enja vazduha, geografskog položaja kao i starosti osobe, upotrebe krema za sun anje sa zaštitnim faktorom 8 i na ina odevanja <sup>(245)</sup>. Dodatno se isti e da na smanjenje endogene sinteze uti e pigment kože melanin i da je kod osoba tamnije putu prodiranje UVB zra enja kroz kožu smanjeno, a time i endogena sinteza vitamina D. Stoga ukoliko dijetetski unos vitamina D nije izuzetno visok, kod trudnica tamnije puti i/ili koje su povezane (imaju veo) pove an je rizik za nastanak deficijencije vitamina D <sup>(23, 24)</sup>.

Tako e jedan od faktora je neadekvatan unos vitamina D iz namirnica i suplemenata <sup>(246-248)</sup> posebno u zemljama u kojima nema programa oboga ivanja namirnica vitaminom D. Kontrolisane randomizirane klini ke studije sa vitaminom D potvr uju da suplementacija pove ava koncentraciju 25(OH)D u krvi tokom trudno e <sup>(249)</sup> i na poro aju <sup>(250)</sup>, kao i da je suplementacija vitaminom D u trudno i neophodna jer je vrlo teško uneti potrebne koli ine vitamina D samo iz namirnica <sup>(24)</sup>. Pored ishrane, na status vitamina D u trudno i mogu uticati godine, visina i obrazovanje majke, pušenje kao i višeploidne trudno e <sup>(246, 250-253)</sup>

Poslednjih godina gojaznost se isti e kao jedan od faktora rizika za nastanak deficijencije vitamina D u trudno i <sup>(254-256)</sup>. Kod gojaznih osoba vitamin D sintetisan u koži ili iz egzogenih izvora biva preuzet od strane masnog tkiva u organizmu, tako da se smanjuje njegovo osloba anje u krvotok, a time i sama bioraspoloživost <sup>(41)</sup>. Stoga su u obrnutoj korelaciji koli ina masnog tkiva u organizmu i koncentracija 25(OH)D u krvi <sup>(254)</sup>. Interesantno je da gojaznost ne uti e na kapacitet endogene sinteze vitamina D u koži, ali se ve e koli ine sintetisanog vitamina D zadržavaju u potkožnom masnom tkivu pa je smanjeno njegovo osloba anje u cirkulaciju <sup>(255)</sup>. Mnogobrojne studije na gojaznim osobama svih uzrasta (BMI > 30) ukazuju na povezanost gojaznosti i niskog statusa vitamina D <sup>(255-257)</sup>. U nekoliko studija pra ene su samo trudnice i njihova novoro en ad gde je gojaznost pre trudno e i u trudno i izdvojena kao faktor rizika za nastanak deficijencije vitamina D nakon ura unavanja ostalih faktora kao što su godine, boja kože, godišnje doba, unos suplemenata i gestaciona starost <sup>(258, 259)</sup>. Bodnar i saradnici su pokazali da je sa porastom BMI od 22 na 34 dvostruko pove an rizik (95% CI, 1.2-3.6) za nastanak deficijencije vitamina D u drugom trimestru trudno e <sup>(258)</sup>. Pra enjem gojaznih trudnica u odnosu na kontrolu koje su imale približno iste nivoe 25(OH)D u krvi

primena je povećana koncentraciji 25(OH)D kod novorođenadi majki normalne telesne težine, time se dodatno skreće pažnja na gojaznost kao potencijalni faktor rizika za nedostatak vitamina D ne samo kod majki već i kod novorođenadi <sup>(260)</sup>.

Pored prethodno pomenutih (poglavlje 2.4.2) brojnih negativnih uticaja nedostatka vitamina D kod odraslih ljudi (osteomalacija, osteoporoza, sklonost ka prelomima kostiju, disbalans kalcijuma itd <sup>(261, 262)</sup>), primene su posledice prolongirane deficijencije i u trudnoći. Rezultati studija ukazuju na povezanost neadekvatnih koncentracija 25(OH)D u krvi trudnica (definisan kao sadržaj 25-OH-D < 20 ng/mL) i neželjenih ishoda u trudnoći kako za majku-trudnicu tako i za fetus-novorođenca <sup>(263, 264)</sup>. Nedavno je objavljeno u dva rada sistematskog pregleda literature, sa uključenih 25 studija, da neadekvatan status vitamina D (25-OH-D < 20 ng/mL) tokom trudnoće povećava rizik za nastanak preeklampsije <sup>(265, 266)</sup>. Meta-analiza je takođe potvrdila da žene, čiji je nivo 25-OH-D<sub>3</sub> u serumu manji od 20 ng/mL (50 nmol/L), u trudnoći imaju povećan rizik za razvoj preeklampsije, za prevremeni porođaj i novorođenad malu za gestacionu starost <sup>(5, 267)</sup>. Takođe se nedostatak vitamina D u trudnoći povezuje sa povećanim rizikom od porođajne carskim rezom i infekcijom *bacterial vaginosis* mada su neophodne dodatne kontrolisane randomizirane studije sa većim brojem uesnika kako bi se dodatno ispitale ove tvrdnje <sup>(221)</sup>.

## **2.9. VITAMIN D I PREEKLAMPSIJA**

### **2.9.1. Preeklampsija: patofiziološki mehanizmi**

Preeklampsija je komplikacija isključivo povezana sa trudnoćom koju karakteriše nastanak hipertenzije, a čija etiologija do danas nije u potpunosti razjašnjena. Patofiziološki mehanizmi u etiologiji preeklampsije su složeni i uključuju kombinaciju vaskularnih, imunoloških i genetskih faktora kao i faktora životne sredine <sup>(268, 269)</sup>. Preeklampsija predstavlja veliki rizik po zdravlje i život majke i fetusa čineći 2–8 % svih komplikacija u trudnoći dok se navodi kao uzrok smrti majki u 16 % slučajeva <sup>(270)</sup>. Prema studiji sprovedenoj od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) u 24 zemlje u razvoju utvrđena je učestalost preeklampsije i eklampsije u iznosu od 4 % <sup>(271)</sup>. Sama bolest se najčešće pojavljuje bez upozorenja, uglavnom nakon 20 nedelje gestacije. Iako se simptomi bolesti javljaju u drugoj polovini trudnoće smatra se da se inicijalni patogeni

mehanizmi razvijaju mnogo ranije kada u placenti (citrifoblastu) ne dolazi do adekvatnog modelovanja spiralnih arterija, što dalje vodi smanjenju protoka krvi i ishemiji placente. Mogu e posledice uklju uju zastoj u razvoju fetusa, dok ishemija na placenta oslobadja faktore koju mogu uzrokovati opštu endotelnu disfunkciju u organizmu majke odgovornu za simptome i komplikacije preeklampsije. Klini ku sliku preeklampsije karakteriše prisustvo hipertenzije, edema i proteinurije, a dramati na pogoršanja bolesti ugrožavaju funkciju bubrega, jetre i mozga i pra ena su hematološkim poreme ajima <sup>(272)</sup>. Usled mnogobrojnih faktora uklju enih u patogenezu i razli itih fenotipa preeklampsije, bolest se ne može predvideti, spre iti niti izle iti ali je simptome mogu e kontrolisati adekvatnom terapijom i usporiti dalje komplikacije sa ciljem smanjenja smrtnosti. Simptomi naj eš e nestaju pri blagovremenom poro aju i izbacivanju placente posebno kod preeklampsija nastalih u ranoj trudno i, mada su poznate pojave preeklampsije i u toku poro aja i post-partalno <sup>(269)</sup>. Na pogoršanje toka bolesti kao i krajnji neželjen ishod mogu uticati neefikasna preventiva, kasno postavljanje dijagnoze i/ili nekriti na politerapija. Pokazano je da preeklampsija pove ava rizik za nastanak kardiovaskularnih i metaboli kih poreme aja u daljem životu pa se posebno isti e potreba za adekvatnim intervencijama i obrazovanjem obolelih trudnica <sup>(269)</sup>.

Tradicionalna definicija klini ke slike preeklampsije podrazumeva razvoj *de-novo* hipertenzije (krvni pritisak 140/90 mm Hg), pojavu edema i proteinurije ( 300 mg/24 h), u toku i nakon 20 nedelje gestacije kod predhodno normotenzivnih žena <sup>(273)</sup>. Prema težini simptoma aktuelna je podela na blag i težak oblik preeklampsije. Detaljni kriterijumi za dijagnozu preeklampsije, kao i karakteristike blagog i teškog oblika dati su u Tabeli 4. Širom sveta postoje definicije za postavljanje same dijagnoze kao i klasifikacije blagog i teškog oblika preeklampsije <sup>(274-277)</sup> koje su me usobno sli ne. Neke od razlika u ovim klasifikacionim sistemima su, izme u ostalog, razli ite klini ke i istraživa ke definicije preeklampsije u Australiji <sup>(274)</sup>, definisanje teškog oblika hipertenzije i rane preeklampsije (Kanada <34 nedelje gestacije<sup>(275)</sup>; SAD <35 nedelje gestacije <sup>(276)</sup>), kao i kriterijumi da li proteinurija treba da bude uklju ena pri dijagnozi bolesti ili ne <sup>(278)</sup>.



**Tabela 4.** Kriterijumi za dijagnozu i klasifikaciju preeklampsije <sup>(279)</sup>

	<b>Kriterijumi</b>	<b>Teški oblik</b>	<b>Blaži oblik</b>
Krvni pritisak	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sistolni pritisak 140 mm Hg systolic, ili</li> <li>➤ Dijastolni pritisak 90 mm Hg</li> </ul> Mereno 2 puta u razmaku od 4h kod trudnica nakon 20 nedelje gestacije, iji je krvni pritisak prethodno bio normalan		✓
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sistolni pritisak 160 mm Hg systolic ili</li> <li>➤ Dijastolni pritisak 110 mm Hg</li> </ul> Može biti potvrđena u kra em vremenskom intervalu (nekoliko minuta) kako bi olakšao blagovremeni antihipertenzivni tretman	✓	
<b>I</b>			
Proteinurija	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 300 mg/24 h urinu.</li> </ul> ili <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Protein/kreatinin odnos 0.3 (mereno u mg/dL).</li> <li>➤ test traka 1 + (ako drugi metod nije dostupan)</li> </ul>	✓	✓
U odsustvu proteinurije, novonastala hipertenzija udružena sa bilo kojim od slede ih faktora:			
Trombocitopenija	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Broj trombocita &lt; 100 000/μL</li> </ul>	✓	
Renalna isuficijencija	Kreatinin u serumu > 1.1 mg/dL, ili u odsustvu drugih renalnih bolesti dvostruko uve ana koncentracija kreatinina u serumu	✓	
Poreme ena funkcija jetre	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pove ana koncentracija transaminaza jetre u krvi (dvostruko i više uve ane koncentracije u krvi)</li> </ul>	✓	
Edem plu a		✓	
Poreme aji vida	Mogu uklju ivati: spazam i trombozu retinalnih krvnih sudova, retinalnu ishemiju, odvajanje retine i centralnu retinopatiju	✓	
Cerebralni poreme aji	Mogu uklju ivati: hipertenzivnu encefalopatiju, epilepsiju i cerebrovaskularne ispade	✓	

Od nedavno, imaju i u vidu prirodu preeklampsije kao sindroma, proteinurija se ne smatra obaveznim prisutnim kriterijumom za dijagnozu <sup>(279, 280)</sup>. Shodno tome, u odsustvu proteinurije, preeklampsija se može dijagnostikovati kao novonastala hipertenzija u trudno i udružena sa bilo kojim od slede ih stanja: trombocitopenijom, pove anim

transaminazama jetre, poremećenom funkcijom bubrega, edemom pluća.

Pojava komplikacija uključuje poremećaj faktora koagulacije i/ili razvoj eklampsije, akutne bubrežne insuficijencije i hemolize udružene sa povećanjem enzima jetre i smanjenim brojem trombocita poznatijim kao Haemolysis-Elevated Liver Enzymes-Low Platelets (HELLP) sindrom. Dodatno, razvoj daljih komplikacija može uključivati neurološke i mentalne poremećaje koji su neki od simptoma vrtoglavica, poremećaj vida udruženi sa povraćanjem, mučninom i bolom u gornjem delu abdomena kao i depresija centralnog nervnog sistema <sup>(262)</sup>. Prema periodu nastanka i pojavi prvih simptoma preeklampsija se može podeliti na ranu i kasnu <sup>(265)</sup>. Kod rane preeklampsije simptomi se javljaju pre 34 nedelje gestacije i smatra se da je njen razvoj povezan sa neadekvatnom placentacijom, dok se kasna preeklampsija povezuje sa povećanim kardiovaskularnim ili metaboličkim rizikom za razvoj endotelne disfunkcije nakon 34 nedelje gestacije.

Za razliku od normotenzivne fiziološke trudnoće, pretpostavlja se da u razvoju preeklampsije inicijalni, ali ne i primarni, patogeni mehanizam uključuje poremećaj funkcije placente u ranoj trudnoći usled neadekvatnog remodelovanja spiralnih arterija u citotrofoblastu između 8 i 16 nedelje gestacije <sup>(281)</sup>. Smatra se da prva faza procesa remodelovanja spiralnih arterija počinje oko perioda implementacije embriona <sup>(282)</sup> i da poremećaji u ovoj fazi mogu uticati na povećanje rizika od nastanka preeklampsije. Nakon poremećaja u prvoj fazi remodelovanja spiralnih arterija, smanjena je transformacija malih visoko otpornih mišićnih arterija u krvne sudove velikog kapaciteta, dovodeći do nedovoljnog protoka krvi kroz placentu (ishemije) koji progresivno ne zadovoljava potrebe fetusa. Ishemija placente prouzrokuje oksidativnim stresom, apoptozom, zapaljenim i strukturnim oštećenjima <sup>(282)</sup>. Kao posledica ishemije placente oslobadjaju se sekundarni medijatori koji dovode do neuravnotežene angiogeneze. U normotenzivnoj trudnoći, angiogenezu promoviraju faktor rasta placente (eng. PlGF) i vaskularno-endotelni faktor rasta (eng. VEGF) koji pojačavaju vazodilatacijski efekat prostaglandina i azot-monoksida (NO). Sa druge strane u preeklampsiji luči se sFlt-1 tirozin-kinaza, slična receptoru za vaskularno-endotelni faktor rasta (VEGFR-1) koji je antagonist VEGF. Dodatno se u preeklampsiji luči endoglin (eng. sENG) koji je antagonist -faktora transformacije rasta (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ) i blokira NO. Ovaj poremećaj u ravnoteži faktora koji promoviraju i suzbijaju angiogenezu dovodi

do opšte endotelne disfunkcije i vazospazma. To dalje vodi razvoju različitih poremećaja prisutnih u preeklampsiji koji se manifestuju i postaju vidljivi klinički simptomi nakon 20 nedelje gestacije<sup>(278, 281)</sup>. Zanimljivo je da je su objašnjenja ponudena za mehanizam nastanka hipertenzije u preeklampsiji donekle kontradiktorna, jer su zabeležene drastične razlike kliničke slike pacijenata u pogledu izmerenog minutnog volumena srca i perifernog otpora proticanju krvi. Smatra se da su različite hemodinamičke situacije među pacijentima prisutne usled različitih oblika preeklampsije, u smislu njihove težine (blaga ili teška) kao i vremena nastanka (rana i kasna), i da je vrlo važno uzeti u obzir sve ove faktore pri izboru adekvatne terapije<sup>(283)</sup>.

### **2.9.2. Faktori rizika, prevencija i predviđanje preeklampsije**

Do sada je izdvojeno nekoliko faktora koji su povezani sa povećanjem rizika za nastanak preeklampsije (Tabela 5). Rizik je povećan kada su prethodno prisutni neki od sledećih faktora: preeklampsija prisutna u prethodnoj trudnoći, porodična istorija preeklampsije (majka, sestra, baba), indeks telesne mase (BMI) veći od 30, status 25(OH)D < 30 nmol/L, godine trudnice (žene > 40 godina), prisustvo bolesti bubrega i razmak između trudnoća veći od 10 godina<sup>(278, 284, 285)</sup>. U toku same trudnoće rizik za nastanak preeklampsije se povećava u prisustvu antifosfolipidnog sindroma, više-plodne trudnoće, kao i u prvoj trudnoći<sup>(274, 278)</sup>. Rezultati nekoliko studija pokazuju da se verovatnoća za razvoj preeklampsije povećava skoro četiri puta kada je dijabetes prisutan pre trudnoće<sup>(278, 286)</sup>, dok se rizik povećava skoro tri puta kada trudnica nosi blizance<sup>(287)</sup>. Zadnjih godina ističe se gojaznost kao nezavistan faktor za razvoj kardiovaskularnih bolesti u trudnoći, uključujući i preeklampsiju<sup>(288, 289)</sup>.

Međutim, uključivanje ovih faktora rizika u modele za predviđanje nastanka preeklampsije dalo je vrlo skromne rezultate. Stoga su za definisanje težine preeklampsije, njenu kliničku potvrdu i potencijalno predviđanje, pored regularnih biohemijskih parametara, predloženi sledeći biomarkeri: sFlt-1, PlGF i njihov odnos sFlt-1/PlGF, kao i BNP-natriuretični peptid tipa B (eng. B-type natriuretic peptide)<sup>(278, 290, 291)</sup>. Kao što je prethodno pomenuto, kod trudnica sa preeklampsijom nivo sFlt-1 u serumu i ekspresija u placenti su značajno uvećani u odnosu na normotenzivnu fiziološku trudnoću, pa je serumski sFlt-1 u direktnoj korelaciji sa težinom oblika preeklampsije. Sa druge strane PlGF je nizak u preeklampsiji, jer se vezuje za sFlt-1, pa se određivanjem

odnosa sFlt-1/PlGF može klasifikovati stepen preeklampsije prema težini (blaga ili teška). Tako e, detektovan odnos sFlt-1/PlGF 85 se povezuje sa neželjenim komplikacijama i poro ajem u najskorijem roku (do dve nedelje) <sup>(278, 290)</sup>.

**Tabela 5.** Faktori rizika za razvoj preeklampsije. Tablela je pripremljena na osnovu publikacija <sup>(269, 278, 281, 284, 286)</sup>

<b>Faktori rizika za razvoj preeklampsije</b>	<b>Relativan rizik (95% interval pouzdanosti)</b>
Antifosfolipidni sindrom	9.72 (4.34 - 21.75)
Preeklampsija u prethodnoj trudno i	7.19 (5.85 - 8.83)
Dijabetes ( <i>diabetes mellitus</i> )	3.56 (2.54 - 4.99)
Više fetalna trudno a	2.93 (2.04 - 4.21)
Prva trudno a	2.91 (1.28 - 6.61)
Porodi na istorija preeklampsije	2.90 (1.70 - 4.93)
Gojaznost pre i u toku trudno e (BMI 30)	2.47 (1.66 - 3.67)
Nedostatak vitamina D (25(OH)D < 30 nmol/L )	2.23 (1.29 - 3.83)
Hroni na hipertenzija	1.99 (1.78 - 2.22)
Godine (prvorotke starije od 40 godina)	1.68 (1.23 - 2.29)
Sistemska eritematozni lupus	Pove an rizik
Istorija trombofilije	Pove an rizik
Više od deset godina razmaka izme u trudno a	Pove an rizik
Bolesti bubrega	Pove an rizik

Nedavno je kao biomarker u preeklampsiji predložen BNP, koga lu e miociti srca kada su izloženi ishemiji ili istezanju, i smatra se nezavisnim predskazateljem smrtnosti i kardiovaskularnih komplikacija. Detektovan je pove an nivo BNP u preeklampsiji u odnosu na normotenzivnu fiziološku trudno u u nekoliko preliminarnih studija <sup>(291)</sup>. Trenutno se ovi biomarkeri ne koriste u klini koj praksi i neophodne su ve e prospektivne studije kojima bi se pokazalo da li zaista pove ane koncentracije BNP, sFlt-1 i odnosa sFlt-1/PlGF kao biomarkera mogu poslužiti u predvi anju nastanka preeklampsije i njenih komplikacija <sup>(278, 291)</sup>.

### 2.9.3. Terapija u preeklampsiji

Zbog same prirode preeklampsije izbor lekova i adekvatna terapija pacijenata predstavlja pravi izazov. Blagovremeni porođaj i izbacivanje placente za sada su jedini efikasan tretman koji u najvećem broju slučajeva eliminiše simptome preeklampsije. Međutim, za donošenje odluke o izazivanju porođaja neophodno je uzeti u obzir gestacionu starost, stanje majke i fetusa, kao i težinu oblika preeklampsije. Cilj farmakološke terapije je kontrolisanje prisutnih simptoma i smanjenje daljih komplikacija kao što su eklampsija, edem pluća i cerebralna hemoragija. Prethodnih godina objavljene su, od strane nekoliko naučnih udruženja, međusobno vrlo slične smernice za tretman žena sa preeklampsijom u cilju što boljeg ishoda <sup>(274, 275, 277, 279)</sup>. Osnova tretmana je antihipertenzivna terapija i magnezijum-sulfat, kao antagonista kalcijuma koji indukuje vazodilataciju. Pri postavljanju dijagnoze ključno je odrediti stepen težine preeklampsije, jer se razlikuju terapije za blagu i tešku preeklampsiju. Pored praćenja krvnog pritiska i proteinurije, terapija se prilagođava shodno vrednostima serumskog kreatinina, broja trombocita, faktora koagulacije, transaminaza jetre (ALT, AST), bilirubina, LDH, haptoglobina i C-reaktivnog proteina (CRP). Zdravlje i razvoj fetusa prate se putem merenja srčanog ritma, težine fetusa, volumena amnionske tečnosti itd. <sup>(279)</sup>.

### 2.9.4. Profilaksa preeklampsije

U terapiju kod žena u visokom riziku uključuje se mala doza aspirina (75-100 mg/dan) od 12 do 37 nedelje gestacije, kako bi se smanjio rizik za razvoj preeklampsije. Iako su prvi rezultati nakon primene aspirina bili zadovoljavajući, ukazujući na smanjenje pojave preeklampsije od 10-24%, rezultati novih istraživanja su oprezniji u pogledu značajnog smanjenja incidence preeklampsije nakon primene aspirina <sup>(292-294)</sup>. Zaštitna uloga aspirina verovatno potiče od inhibicije produkcije tromboksana, ali i dalje su neophodni dodatni dokazi na osnovu kojih bi zvanica preporuka u profilaksi preeklampsije bila primena malih doza aspirina <sup>(295)</sup>. Pored aspirina, u toku su istraživanja da li primena statina može imati koristi u preeklampsiji, jer je poznato da statini mogu stimulisati ekspresiju hem-oksigenaze koja može inhibirati sFlt-1, a povećati VEGF ekspresiju <sup>(281)</sup>. U preliminarnim studijama nađeno je da primena suplemenata kalcijuma (1 g/dan) utiče na smanjenje rizika za razvoj preeklampsije kod onih pacijenata čiji je početni nivo kalcijuma bio jako nizak, ali su potrebna obimnija dodatna istraživanja kako bi se ovaj

efekat potvrdio <sup>(293)</sup>. Ostale preventivne mere, koje su uključivale primenu antioksidanata, progesterona, smanjenje unosa soli, fizičke aktivnosti, kao i produžen odmor u krevetu, nisu uticale na smanjenje incidence preeklampsije sudeći prema najnovijim analizama objedinjenih studija u sistematskom pregledu <sup>(293)</sup>. U studiji sa trudnicima, prvenim od rane trudnoće, nedostatak vitamina D ( $25(\text{OH})_2\text{D} < 12\text{ng/mL}$ ) pre 20 nedelje gestacije je okarakterisan kao nezavisan faktor rizika za razvoj preeklampsije, čak i nakon statističkog korigovanja unavaznih faktora, kao što su gojaznost i godišnje doba <sup>(284)</sup>, ali suplementi vitamina D još uvek nisu na adekvatan način razmatrani u profilaksi preeklampsije. U narednom poglavlju dat je detaljan prikaz raspoloživih podataka o mogućoj povezanosti preeklampsije i nedostatka vitamina D. Koliko adekvatna primena suplementata vitamina D može uticati na smanjenje rizika za razvoj preeklampsije ostaje da se utvrdi u budućim randomiziranim interventnim studijama sa vitaminom D.

### **2.9.5. Potencijalni mehanizmi uticaja vitamina D na smanjenje rizika od preeklampsije**

Nedostatak vitamina D u trudnoći okarakterisan je kao jedan od faktora vezanih za povećanje rizika za razvoj preeklampsije, o čemu je bilo govora u poglavlju 2.8.4. Na koji način adekvatan nivo vitamina D može umanjiti rizik za nastanak preeklampsije nije razjašnjeno, ali su razmatrane inflamatorne promene, angiogeni faktori, gojaznost, promene u trofoblastu tokom implantacije kao i regulacije gena i predloženo je nekoliko potencijalnih mehanizama kojima su istraživanja u toku <sup>(296-300)</sup>.

Veruje se da je kod trudnica sa preeklampsijom jedan od ključnih faktora u patogenezi bolesti upravo sistemska inflamacija <sup>(301)</sup>. Kao što je ranije objašnjeno, u preeklampsiji je povećano oslobađanje Th1 citokina od kojih se faktor nekroze tumora-alfa (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ ) dovodi u vezu sa spontanim porođajem i prevremenim porođajem <sup>(302,303)</sup>. U placentalnim trudnicama sa preeklampsijom povećano oslobađanje TNF- $\alpha$  može prouzrokovati aktivaciju endotelne ćelije <sup>(304)</sup>. U *ex vivo* uslovima (sa ćelijama trofoblasta iz fizioloških trudnoća) prisustvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibira ekspresiju TNF- $\alpha$  <sup>(305)</sup> i reguliše ekspresiju IL-6, koja je takođe uvećana kod trudnica sa preeklampsijom <sup>(306-309)</sup>. Povećano oslobađanje IL-6 (kao i IL-1 i IL-8) može biti prouzrokovano abnormalnom aktivacijom monocita/makrofaga u uslovima hipoksije, u krvnim sudovima placente. To

dalje otežava diferencijaciju trofoblasta i potencijalno dovodi do pojačanog avanja vaskularnog otpora i neželjenih ishoda trudnoće, od kojih je jedan preeklampsija<sup>(310)</sup>. Na membrani monocita nalazi se „toll-like“ receptor 4 (TLR4), koji je uključen u imuni odgovor<sup>(311)</sup>. Qian i saradnici su pokazali da je kod trudnica sa rizikom za razvoj preeklampsije smanjena ekspresija TLR4 u monocitima periferne krvi, kao i sadržaj pro-inflamatornih citokina nakon suplementacije vitaminom D<sub>3</sub><sup>(298)</sup>. Stoga je suplementacija vitaminom D<sub>3</sub>, usled inhibicije ekspresije TLR4 monocita, predložena kao novi pristup u prevenciji preeklampsije.

U nekoliko preliminarnih studija zabeleženi su obećavajući rezultati nakon primene suplementacije vitaminom D u kombinaciji sa klasičnim inhibitorima renin-angiotenzin sistema (RAS) i antihipertenzivima<sup>(312, 313)</sup>. Osnova za potencijalni sinergistički efekat i vezu preeklampsije i vitamina D tražena je u RAS-u, kao centralnom regulatoru krvnog pritiska<sup>(312, 314)</sup>. Poznato je da su u fiziološkoj trudnoći povišeni koncentracija renina u plazmi, aktivnost renina i nivo angiotenzina II (Ang II). Interesantno je da je osetljivost na Ang II u fiziološkoj trudnoći smanjena, dok je kako se čini, u preeklampsiji povišena osetljivost na Ang II<sup>(314)</sup>. Iako nije razjašnjen mehanizam kojim bi se u preeklampsiji objasnila ova povišena osetljivost na Ang II, čini se da postoji mogućnost da je RAS umešan u patogenezu preeklampsije<sup>(312, 315)</sup>. Dakle, neophodne su nove studije koje bi ispitale efekat kombinovane anti-hipertenzivne terapije i suplementata vitamina D.

Još jedan od predloženih mehanizama za smanjenje rizika od nastanka preeklampsije pomoću vitamina D je potencijalna regulacija angiogeneze pomoću 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Dodatno obrazloženje za ovaj predlog je da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> može imati zaštitni efekat u preeklampsiji svojim učestvovanjem u transkripciji gena i ekspresiji vaskularno-endotelnog faktora rasta (VEGF)<sup>(296, 316, 317)</sup>. VEGF stimuliše angiogenezu i luči se kao odgovor na hipoksiju tkiva i oštećenje endotelne ćelije<sup>(296)</sup>. Povišena koncentracija VEGF je zabeležena kod trudnica sa preeklampsijom<sup>(278)</sup>. Studije su pokazale da prisustvo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dovodi do povišene proliferacije glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova pomoću povišene ekspresije VEGF<sup>(317)</sup>, kao i da na sličan način u *in vitro* uslovima promovise angiogenezu ćelija endotela i aktivnost metaloproteinaze<sup>(28)</sup>. Postavljena je hipoteza da je niska koncentracija 25(OH)D u serumu povezana sa smanjenom produkcijom VEGF i patogeneзом preeklampsije<sup>(318)</sup>, oko čega se nekoliko autora slaže

ali su potrebne opsežnije studije kojima bi se to potvrdilo <sup>(319, 320)</sup>.

Poslednjih godina dosta pažnje je posvećeno razmatranju gojaznosti u patogenezi preeklampsije i potencijalnih mehanizama koji povezuju gojaznost, vitamin D i preeklampsiju <sup>(321)</sup>. Razlog za to je činjenica da je gojaznost zajednički faktor rizika za razvoj preeklampsije i za nedostatak vitamina D <sup>(284)</sup>. Predlog potencijalnog mehanizma, koji bi povezao ova tri parametra, je vrlo složen. Poznato je da se rizik od nedostataka vitamina D vezuje za smanjenje bioraspoloživosti prisutnog 25(OH)D u telu usled deponovanja u mastima <sup>(255)</sup>, dok gojaznost može doprineti razvoju kardiovaskularnih bolesti <sup>(322)</sup>, povećanju sadržaja triglicerida i rezistencije na insulin <sup>(323)</sup>. Nekoliko studija ističe da u preeklampsiji dolazi do promena u metabolizmu lipida, koje dovode do povećane akumulacije lipida u endotelnim ćelijama i do povećanja koncentracije triglicerida, lipoproteina niske gustine (LDL) i neesterifikovanih masnih kiselina u krvi <sup>(324)</sup>. Ovakve promene zabeležene su i u stanjima poremećaja faktora koagulacije, koji su prisutni kao jedna od komplikacija u preeklampsiji <sup>(304)</sup>. Povećana koncentracija triglicerida i LDL u krvi trudnica može biti registrovana vrlo rano, čak znatno ranije nego predloženi markeri za predviđanje preeklampsije sFlt-1 i endoglin.

Zanimljivo je da se i gojaznost i preeklampsija povezuju sa oksidativnim stresom koji je već doveden u vezu sa nastankom hipertenzije. Oba stanja, preeklampsija i gojaznost, se odlikuju povećanom koncentracijom markera inflamacije kao što je CRP i inflamatorni citokini TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 <sup>(324, 325)</sup>. Ističe se da su u krvi trudnica sa preeklampsijom koncentracije CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 uvećane u odnosu na fiziološku trudnoću, i to znatno ranije (u prvom trimestru) pre pojave kliničkih simptoma preeklampsije <sup>(325, 326)</sup>. Značajni oksidativnog stresa u razvoju preeklampsije idu u prilog nedavno objavljeni rezultati studije sprovedene u zimskom periodu kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje <sup>(300)</sup>. Zabalović i saradnici merili su koncentraciju 25(OH)D u krvi trudnica i nivo oksidativnog stresa prateći koncentraciju izoprostana u urinu <sup>(300)</sup>. Paralelno su ispitali aktivnost citohrom P450 $\text{sc}$  u placenti (neophodnog za sintezu progesterona, metabolizam vitamina D<sub>3</sub> i stvaranje oksidativnog stresa) u uslovima oksidativnog stresa, i lipidnu peroksidaciju u ćelijama placentе *ex vivo*. Na osnovu dobijenih rezultata izneli su pretpostavke da vitamin D<sub>3</sub> može delovati kao kompetitivni inhibitor citohrom P450 $\text{sc}$  u placenti, čime sprečava nastanak peroksida lipida i povećanu sintezu progesterona, koji



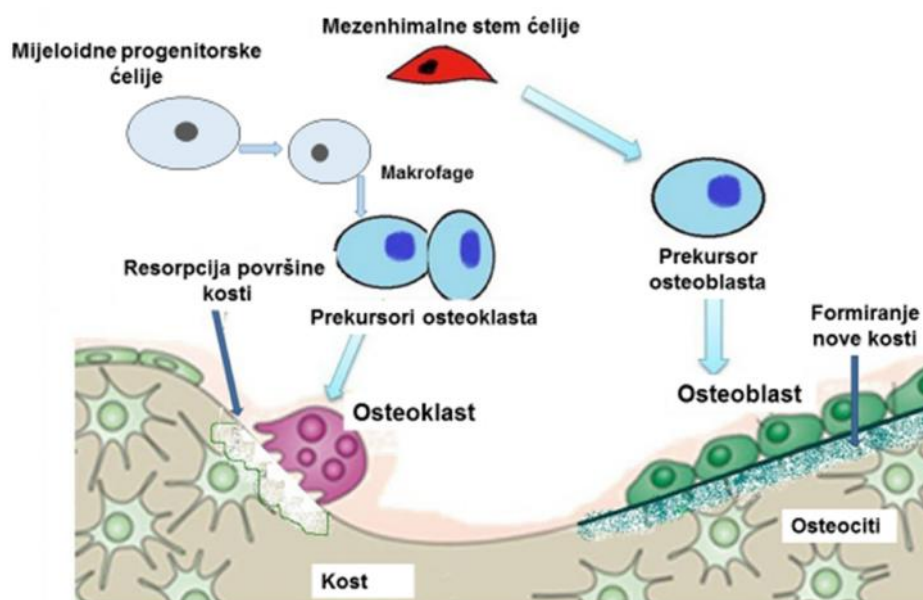
mogu doprineti u patogenezi preeklampsije <sup>(300)</sup>

## **2.10. Uticaj vitamina D na mineralizaciju kostiju i na koštanu masu**

Najviše poznata funkcija vitamina D vezana je za mineralizaciju kostiju i koštanu masu u odnosu na status vitamina D <sup>(163, 327, 328)</sup>. Kosti predstavljaju jedinstvenu vrstu masu vezivnog tkiva, koja formira skelet daju i tako vrstinu telu, dok zajedno sa mišićima ima kosti omogućavaju kretanje. Tokom života kosti se neprestano regenerišu u procesu remodelovanja kostiju koji se sastoji iz procesa resorpcije, zamene stare kosti, i formiranja nove kosti <sup>(329)</sup>. Sklonost prelomima kostiju zavisi od količine i gustine prisutnog koštanog tkiva i u kliničkoj praksi se procenjuje merenjem gustine kostiju (eng. bone mineral density, BMD). Kost se kao heterogeni kompozitni materijal sastoji od oko 60 % mineralne strukture (soli kalcijuma i fosfora) i oko 40 % ekstracelularnog matriksa, dok vode ima oko 4% <sup>(330, 331)</sup>. Ekstracelularni matriks sastoji se iz organske komponente-osteoida (30-35%) i neorganske komponente (70-65%) koju čine mineralne soli. Obe komponente funkcionišu udruženo obezbeđuju i fleksibilnost i vrstinu kostiju. Međutim, ukoliko dođe do smanjenja organske komponente matriksa kost postaje slaba, krta i lomljiva, dok sa smanjenjem neorganske (mineralne) komponente kost postaje gumasta i rastegljiva. Organska komponenta – osteoid sastoji se iz kolagenih vlakana (90%) i nekolagenih proteina (10%). Kolagena vlakna koštanog tkiva pripadaju grupi kolagena tipa I koja se sinteza može odvijati pod uticajem hormona (estrogen, testosteron, hormon rasta) unutar osteoblasta, ali i van ćelije. Sa druge strane, važnu ulogu u formiranju kostiju, procesu mineralizacije i regulaciji serumske homeostaze kalcijuma imaju nekolageni proteini u koštanom matriksu (osteokalcin, osteonektin, osteopontin, faktori rasta itd). Neorganske supstance, pre svega mineralne soli kalcijuma i fosfata, čine 2/3 ekstracelularnog matriksa kosti. Ove soli imaju kristalnu strukturu hidroksiapatita. U organizmu odraslog čoveka nalazi se 1-2 kg kalcijuma od čega je 99% u kostima <sup>(332)</sup>. Nivo mineralnih soli kalcijuma i fosfata u kostima zavisi od njihovog statusa u organizmu, kao i unosa hranom. Kalcitriol, aktivni oblik vitamina D<sub>3</sub>, povećava intestinalnu apsorpciju jona kalcijuma i fosfata <sup>(330, 333)</sup>.

Sama kost sastoji se iz koštane srži, sunđerastog i vrstog koštanog tkiva, pokosnice i hrskavice <sup>(334)</sup>. Vrsta masa koja okružuje koštanu srž naziva se kortikalno (vrsto)

koštano tkivo. Trabekularno ili sun erasto tkivo predstavlja mrežu kanala sun eraste strukture koji ine koštanu srž. Periost ili pokosnica je fibrozno vezivno tkivo koje okružuje kortikalni deo kosti i sadrži koštane elije: osteoblaste i osteoklaste (Slika 8). Kod zrelih kostiju ove koštane elije pomažu u remodelovanju kostiju što olakšava adaptaciju na biomehani ke sile. Tako e osteoblasti i osteoklasti pomažu u uklanjanju starih ili ošte enih delova kostiju i zameni novim, ja im i otpornijim koštanim tkivom <sup>(335)</sup> (Slika 8).



**Slika 8.** Šematski prikaz remodelovanja kostiju

Osteoblasti su elije koje stvaraju koštano tkivo i nalaze se na površini koštanog matriksa. Osteoblasti vode poreklo od mezenhimalnih stem elija, od kojih nastaju preko osteoprogenitorskih elija u prisustvu Wnt signalnih molekula (proteina). Dalje se osteoblasti, kao mononuklearne elije, terminalno diferenciraju u osteocite. Osteoblasti aktivno u estvuju u održavanju koštanog tkiva sintetišu i itav niz proteina kolagene i nekolagene prirode od kojih je osteokalcin (OC) najzastupljeniji nekolageni protein matriksa kostiju. Ova sintetska aktivnost osteoblasta je pod kontrolom mnogih faktora, kao što su estrogen i paratiroidni hormon, koji se vezuju za receptore na površini osteoblasta i na taj na in regulišu resorpciju koštanih elija <sup>(334)</sup>. Zanimljivo je da ekspresija CYP27B1 i CYP24A1 kao i VDR na površini elija osteoblasta i njihove

eljske loze omogu ava osteoblastima da sintetišu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  <sup>(86)</sup>. Pored osteoblasta i osteocita koji vode poreklo od mezenhimalnih elija, osteoklasti su koštane elije za koje se smatra da vode poreklo od makrofaga koštane srži i mijeloidnih progenitorskih elija <sup>(336)</sup> (Slika 8). Formiranje osteoklasta zahteva nuklearni faktor kapa B (NF- B) signalizaciju, kao odgovor na esencijalne citokine, receptor aktivatora NF- B liganda <sup>(337)</sup> i stimulatívni faktor kolonija makrofaga (eng. macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) <sup>(338)</sup>. Regulacija formiranja i aktivacije osteoklasta pomo u citokina može biti pozitivna i negativna. Na površini prekursora osteoklasta, RANKL se vezuje za svoj receptor aktivator nuklearnog faktora B (RANK) indukuju i nastanak osteoklasta <sup>(339)</sup>. Na ovaj na in RANKL kontroliše aktivaciju osteoklasta u procesu resorpcije kostiju, jer osteoklasti lu e hlorovodoni nu kiselinu, kao i proteoliti ke i hidroliti ke enzime koji dovode do razlaganja koštanih elija. U ovom procesu resorpcije kostiju osloba aju se hidrolizovani fragmenti kolagena, kao što su N-terminalni telopeptid i C-terminalni peptid kolagena tipa I (CTX), koji odlaze u cirkulaciju i mogu da posluže kao biomarkeri za resorpciju kostiju <sup>(340)</sup>. Sa druge strane, stromalne elije koštane srži proizvode osteoprotegerin (OPG) koji se tako e vezuje za RANK receptor i kao kompetitivni antagonist onemogu uje vezivanje RANKL za receptor, a time inhibira diferencijaciju osteoklasta i uti e na proces resorpcije kostiju <sup>(339)</sup>. Proces remodelovanja kostiju odvija se lokalno i uklju uje vrsto udružene grupe osteoklasta i osteoblasta koji postepeno vrše resorpciju starih i formiranje novih delova kostiju (Slika 8) <sup>(341)</sup>. Kod odraslih osoba za aktivnost ovih vrsto udruženih grupa (jedinica) osteoklasta i osteoblasta od velikog je zna aja  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (kalcitriol) koji pomaže u procesu remodelovanja kostiju <sup>(328)</sup>.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pove ava aktivnost osteoklasta na dva na ina: direktno uti u i na formiranje osteoklasta ili indirektno u prisustvu kalcitriola indukuje se sekrecija faktora koji promovišu aktivnost samog osteoklasta. Studije na životinjama su pokazale da translokacija  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u nukleus dovodi do pove anja RANKL, putem VDRE i gena promotera za RANKL, što tako e pove ava ekspresiju RANK receptora na površini osteoklasta i njihovih prekursora <sup>(339, 342, 343)</sup>. Sa druge strane, prisustvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dovodi do smanjenja OPG i na taj na in dovodi do diferencijacije osteoklasta i postepeno resorpcije kostiju. Sam RANKL/OPG odnos je dobar indikator za pra enje potencijalne resorpcije kostiju <sup>(344)</sup>. Sa staroš u se RANKL/OPG odnos pove ava kao posledica pove ane resorpcije u odnosu na sintezu kostiju, što može dovesti do gubljenja koštane

mase, osteoporoze kao i trajnih stanja inflamacije <sup>(345)</sup>. Osim toga, istraživanja na životinjama pokazala su da sa starenjem raste značajno RANKL/OPG odnos kao i osteoklastogeneza indukovana stromalno/osteoblastnim ćelijama, što utiče na trabekularni deo kosti i odnos osteoblasta i osteoklasta u njoj <sup>(346)</sup>. Sa druge strane, M-CSF se vezuje za receptore na osteoklastu i povećava aktivnost osteoblasta i dodatno utiče na povećanje mononuklearne ćelijske sinteze <sup>(338)</sup>. Osteoblasti i M-CSF kao odgovor na endokrinu stimulaciju paratiroidnim hormonom. PTH utiče na metabolizam kalcijuma i kostiju, vezuju se za receptore na površini osteoblasta što dalje utiče na aktivnost osteoblasta i osteoklasta <sup>(347, 348)</sup>. Takođe je pokazano da PTH povećava nivo RANKL, a smanjuje nivo OPG <sup>(349)</sup>, kao i da PTH može uticati na povećanje mineralizacije kostiju i broja osteoblasta inhibirajući i sklerostin (inhibitor Wnt metaboličkog puta) u osteocitima <sup>(86, 350)</sup>.

Pored direktnog uticaja na kosti, pokazano je da metaboliti vitamina D stimulišu makrofage i suzbijaju produkciju T-limfocita, usled čega se vitamin D povezuje i sa reumatoidnim artritismom <sup>(351)</sup>. U procesu reumatoidnog artritisa, pro-inflamatorni citokini indukuju ekspresiju RANKL na aktiviranim T ćelijama i time se promoviše osteoklastogeneza <sup>(352)</sup>. Holick je sugerisao da najverovatnije 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ima ulogu u reumatoidnom artritisu i to putem mehanizma koji uključuje Th17 imuni odgovor jer aktivnost osteoklasta zavisi od Th17 ćelija koje luče interleukin 17 (IL-17) <sup>(353)</sup>.

## 2.11. Procena strukture kostiju i koštane mase

U snimanju strukture kostiju i koštane mase koriste se razne tehnike koje uključuju procenu histološke strukture, gustine kostiju kao i njihove vrstine. Prvi snimak kostiju X zracima napravljen je davne 1895. godine i od tada do danas sa napredovanjem tehnologije razvijene su neinvazivne i bezbolne dijagnostičke metode koje obezbeđuju informacije o dinamici remodelovanja kostiju, kao i celularnoj strukturi. Pored radiografije, kao prve primenjene tehnike, u najširoj upotrebi danas su magnetna rezonanca, kompjuterizovana tomografija kao i dvostruko energetska apsorpciometrija X-zraka. Osnova svih metoda je snimanje u dvodimenzionalnoj (2D) ili trodimenzionalnoj (3D) tehnici i one se direktno mogu izmeriti određeni parametri strukture kostiju<sup>(354)</sup>. Radiografijom (rendgenom) dobijaju se 2D rendgenski snimci koji se najčešće koriste za procenu morfologije skeleta, dijagnostiku preloma i naprsina kao i praćenje zarastanja kostiju. Nova tehnika koja obezbeđuje znatno više informacija o volumetrijskoj gustini, mikrografiji i morfologiji kostiju, ali i mekih tkiva na osnovu 3D snimaka je mikrokompjuterizovana tomografija ( $\mu$ CT)<sup>(355, 356)</sup>. Do sada je proizvedeno pet generacija  $\mu$ CT skenera koji takođe koriste X zrake za rekonstrukciju 3D snimaka.  $\mu$ CT se koristi kao zlatni standard za procenu kortikalne i trabekularne koštane mase jer može postići izuzetno malu nominalnu veličinu za voksel od 5  $\mu$ m, gde voksel u trodimenzionalnoj grafici predstavlja najmanji deo nekog skeniranog 3D prostora, kao što je piksel u dvodimenzionalnoj tehnici<sup>(357)</sup>. Zbog ovih osobina  $\mu$ CT se koristi u *ex vivo* kao i *in vivo* istraživanjima gde pored snimaka u visokoj rezoluciji omogućava i longitudinalno praćenje strukture i sastava kostiju. U poslednje vreme u animalnim i humanim istraživanjima 3D strukture kostiju primenjuje se i periferna kvantitativna kompjuterizovana tomografija (pQCT). Ova tehnika se najviše koristi za snimke istanjenih kortikalnih struktura, koje se pojavljuju sa starenjem, ili za praćenje promena strukture kostiju tokom rasta i razvoja. Kvalitet i rezolucija ovih snimaka su predmet rasprave jer se najčešće tokom snimanja koristi veličina voksel od oko 70  $\mu$ m. Za razliku od pQCT, nanokompjuterizovana tomografija<sup>(358)</sup> koristi polarizovano zračenje koje omogućava detaljno snimanje u izrazito maloj rezoluciji ispod 1 mikrona. Usled toga nanokompjuterizovana tomografija je izuzetno skupa tehnika koja pored najsavremenije opreme zahteva veliko tehničko znanje i obučeno osoblje kako bi se obezbedilo adekvatno rukovanje<sup>(358)</sup>. Takođe, preveliko izlaganje rendgenskim zracima može biti

opasno po zdravlje i uvek treba odmeriti odnos između koristi i rizika izlaganja ovakvim snimanjima. Tehnika koja omogućava snimanje kostiju i mekih tkiva bez jonizujućeg X zračenja je magnetna rezonanca (MR). Tokom snimanja ovaj instrument koristi magnetno polje i radiofrekvencije, gde je usled kontrasta između struktura mekog tkiva i kostiju moguće dobiti snimak strukture kostiju kao pri histološkim analizama<sup>(359)</sup>. Međutim, snimanje MR ne daje podatke o mineralnoj masi kostiju pa se u tu svrhu koristi dvostruko energetska apsorpciometrija X-zraka (DXA). DXA tehnika omogućava snimanje celog tela ili određenih regija čime se dobijaju informacije o gustini i sastavu kostiju celog tela. Takođe DXA daje informacije o opštoj strukturi, uključujući i ukupne masti kao i mišićnu masu, jer je razdvajanje signala koji potiču od masnog i u odnosu na mišićnu masu omogućeno primenom dve vrste X zraka različite energije tokom snimanja<sup>(354)</sup>. Sa druge strane DXA daje 2D snimke na kojima nije moguće odrediti arhitekturu kostiju i volumetrijsku gustinu pa je za analizu trabekularnih i kortikalnih komponenti u sastavu kostiju neophodna trodimenzionalna analiza koju omogućavaju prethodno pomenute tehnike  $\mu$ CT i pQCT.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Hemikalije

Sve hemikalije primenjene u ovom radu bile su p.a. iste:

- J Metanol, hlorovodonična kiselina, mravlja kiselina, heksan, cink-sulfat, amonijum-acetat, metil-terc-butyl-etar, fiziološki rastvor, diizopropiletar i izopropanol nabavljeni su od Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- J 25(OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>2</sub> standardi (6PLUS1) nabavljeni od Chromsystems (Grafelfing, Nemačka), dok su standardi za 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i interni standard d6-24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dobijen je od saradnika Dr. Glenville Jones na Queens univerzitetu, gde je urađen deo analiza. Interni standardi d3-25(OH)D<sub>3</sub> i d3-25(OH)D<sub>2</sub> nabavljeni su od IsoSciences (King of Prussia, PA, SAD).
- J Rastvarači, aditivi i rastvori za ekstrakciju primenjene u LC-MS/MS metodi nabavljene su od kompanije Fisher Scientific (Waltham, SAD).
- J Cookson reagens, DMEQ-TAD {4-[2-(6,7-dimetoksi-4-metil-3,4-dihidrovinoksalinil)etil]-1,2,4-triazolin-3,5-dione} nabavljen od Key Synthesis LLC (Oaks, SAD)
- J Izofluran (2-hloro-2-(difluorometoksi)-1,1,1-trifluoro-etan), gas za anesteziju životinja, proizvođača PrAErrane nabavljen je od Baxter Corporation (Mississauga, Kanada)
- J Tetrametil-benzidin (supstrat peroksidaze) i TRIS-HCl pufer nabavljeni su od Boehringer Mannheim (Mannheim, Nemačka)
- J Azotna kiselina, cesijum-hlorid i lantan(III)-oksid su kupljeni od dobavljača Merck Millipore (Darmstadt, Nemačka)

Komercijalni kitovi:

- J Kit LIAISON® 25 OH Vitamin D Total, za određivanje ukupnog sadržaja 25(OH)D, nabavljen je od DiaSorin Inc (Stillwater, SAD)
- J komercijalni kit ELISA 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Boehringer, Mannheim, Nemačka)
- J Kit za određivanje sadržaja biološki aktivnog intaktnog PTH kod pacova (rat specific bioactive intact PTH ELISA) nabavljen je od kompanije Alpco (Salem, NH, SAD).
- J Kit C-terminalni telopeptid kolagena tipa I ELISA RatLap, za određivanje



koncentracije CTX u plazmi pacova, nabavljen je od Immunodiagnostic Systems (Gaithersburg, MD, SAD).

- J) Kitovi za određivanje RANKL i OPG u uzorcima plazme pacova (Rat Bone Panel Milliplex) su nabavljeni od kompanije Millipore and Luminex technology, koja je deo Merck KGaA (Darmstadt, Nemačka)

### 3.2. Aparati

U radu je korišćena sledeća oprema:

Centrifuge Beckman Coulter Allegra X-14® i Eppendorf Microfuge® 20, vodeno kupatilo Thermo Scientific, automatske pipete Thermo Scientific® i Eppendorf Research®, tehnička vaga A&D GH-202 Semi Micro, tehnička vaga A&D GX serije, vorteks Abbexa Ltd, LIAISON® analizator (DiaSorin Inc, Stillwater, SAD), termički hromatograf u tandemu sa masenom spektrometrom LC-MS/MS, sastavljen od ACQUITY UPLC® sa Xevo TQ-S masenim spektrometrom proizvođača Waters (Milford, SAD), Tanita vaga TBF-300 (Tanita Corp., Japan), aparat za merenje visine (Perspective Enterprises, Kalamazoo, Mich., SAD), biohemijski analizator Beckman Coulter AU480, hematološki analizator (ABBOTT CELLDyn 3700), DXA Hologic 4500 QDR Verzija 12.5 (Hologic Incorporated Bedford, SAD),  $\mu$ CT LaTheta LCT-200 za *in vivo* trodimenzionalna snimanja malih laboratorijskih životinja (Aloka, Tokyo, Japan), skener visoke rezolucije Skyscan 1174  $\mu$ CT (Skyscan, Belgija), Instron 5544 (Norwood, MA, SAD) sa Bluehill programom verzije 2 (Instron, Canton, MA, SAD), digitalni šubler Fisher Scientific (St-Laurent, QC, Kanada).

### 3.3. Upitnici za procenu unosa vitamina D

Da bi ispitali unos vitamina D žena u reproduktivnom periodu u Srbiji, neophodan korak bio je najpre razvoj, a zatim i validacija upitnika za procenu unosa vitamina D za naše područje. U ovom poglavlju dati su detalji o razvijanju upitnika o uсталosti konzumiranja namirnica za procenu unosa vitamina D. Proces validacije ovog novog upitnika obuhvata je prvom studijom ovog rada. Ukupno je na dobrovoljnoj bazi u studiju uključeno 450 žena koje su dale svoj pisani pristanak i popunile upitnik o

uestalosti konzumiranja namirnica žena u reproduktivnom dobu, i time dale informacije o svojim navikama u ishrani. Od tog broja, nasumično je odabrano 10% žena (n=45) i uključeno u dalji proces validacije, koji je uključivao 3 vremenski odvojena retrospektivna popunjavanja ankete dvadesetdnevne ishrane (24h-AI), antropometrijsko merenje i uzimanje uzorka krvi.

Validirani upitnik o uestalosti konzumiranja namirnica žena u reproduktivnom dobu primenjen je i u drugoj studiji ovog rada u kojoj su neposredno pre ili nakon porođaja trudnice sa preeklampsijom i bez nje popunjavale upitnik.

### **3.3.1. Upitnik o uestalosti konzumiranja namirnica žena u reproduktivnom dobu**

Upitnik o uestalosti konzumiranja namirnica žena u reproduktivnom dobu (eng. The Women and Reproductive Health Food Frequency Questionnaire (WRH-FFQ) je razvijen po ugledu na upitnik Block i saradnika (NCI/Block Health habits and History questionnaire) <sup>(360)</sup> i validiranog FFQ upitnika za procenu unosa folata <sup>(361)</sup>. Kombinovanjem ova dva upitnika i prilagodbom našem podneblju u vidu specifičnih namirnica i namirnica koje se tradicionalno koriste u Srbiji, nastao je WRH-FFQ upitnik (Prilog 1). Upitnik Block-a i saradnika prevedena su sa engleskog na srpski jezik tri dvojezi na ekspertu u oblasti ishrane. WRH-FFQ upitnik sadrži listu pitanja o veličini porcija i uestalosti konzumiranja namirnica obuhvaćenih upitnikom za period od mesec dana. Za svaku namirnicu, u upitniku su ponuđeni intervali uestalosti: nikada, jednom mesečno, dva do tri puta mesečno, jednom nedeljno, dva do tri puta nedeljno, četiri do šest puta nedeljno i svaki dan (Prilog 1). Svaki odgovor je preveden u uestalost konzumacije za datu namirnicu na dnevnom nivou (eng. frequencies per day). WRH-FFQ sadrži pitanja o konzumaciji 90 namirnica, kao i dodatnih 12 pitanja o korišćenju multivitamina, pojedinačnih vitamina i minerala i drugih suplemenata. Namirnice koje su konzumirane samo ponekad, a nisu uključene u osnovnu listu namirnica, zabeležene su na kraju upitnika. Velikine porcija (male, srednje, velike) su u upitniku predstavljene na fotografijama. Poseban deo WRH-FFQ je opšti upitnik koji sadrži pitanja o godinama, stepenu obrazovanja, prethodnom zdravstvenom stanju, detaljima upotrebe lekova i suplemenata, životnim navikama (pušenje, fizička aktivnost, konzumiranje alkohola, kafe i čaja), kao i sunčanje u solarijum ili na moru u poslednja tri meseca. Dodatno, tokom popunjavanja upitnika stručno lice iz oblasti ishrane bilo je na raspolaganju ispitanicima

u slučaju da im je potrebno objašnjenje o terminima vezanim za uсталost konzumacije kao i o veličinama porcija.

Validacija upitnika WRH-FFQ za procenu unosa vitamin D kod žena u reproduktivnom periodu urađena je u prvoj studiji, obuhvaćenoj ovom disertacijom. Upitnik je kreiran za Srbiju i ceo region u kome nema zakonski regulisanog obaveznog obogaćivanja namirnica vitaminom D (najčešće mlečnih proizvoda i sokova). Postoji mogućnost prilagođavanja upitnika u budućnosti ukoliko se određene namirnice po nu regularno obogaćivati vitaminom D, odnosno u okviru pitanja o obogaćenim namirnicama mogu se na listu dodati nove namirnice, i prerađun unosa vitamina D prilagoditi ovim izmenama.

### **3.3.2. Dvadeset etvoro asovna anketa ishrane**

U okviru validacije upitnika WRH-FFQ za procenu unosa vitamin D kod žena u reproduktivnom periodu u Srbiji, prosečan unos vitamina D procenjivan je kroz tri ponovljene dvadeset etvoro asovne ankete ishrane (24h-AI). Prvi zapis konzumiranih količina i namirnica u prethodnih 24 časa (od doručka do popodnevka) sproveden je sa ispitanicima u razgovoru sa stručnim licem u Centru za istraživanja ishrane i metabolizma u Beogradu. Drugi i treći 24h-AI zabeleženi su u telefonskom razgovoru sa ispitanicima. Sva tri 24h-AI sprovedena su u periodu od dve nedelje, uključujući i dva dana u toku radne nedelje i jedan dan u vikendu, u skladu sa preporukama u literaturi <sup>(362)</sup>. Pomoću ispitanicima u proceni količine konzumiranih namirnica u okviru porcije uključivala je fotografije sa porcijama (male, srednje, velike), kao i pribor u domaćinstvu.

### **3.3.3. Procena unosa vitamina D na osnovu podataka iz upitnika**

Procena unosa vitamina D, kao i drugih nutrijenata pomoću upitnika (WRH-FFQ i 24h-AI), prerađunata je korišćenjem elektronske Srpske baze podataka o sastavu namirnica <sup>(363)</sup>. Za procenu unosa vitamina D iz suplemenata korišćene su specifikacije proizvođača. Ukupni unos vitamina D po danu ( $\mu\text{g}/\text{d}$ ) prerađunat je korišćenjem specijalizovanog programa za procenu unosa DIET ASSESS <sup>(364)</sup>. Korekcije unosa vitamina D u odnosu na ukupan energetske unos prerađunate su prema metodi predloženoj od strane Willett i saradnika <sup>(365)</sup>. Kako unos vitamina D iz suplemenata ne učestvuje u ukupnom energetske unosu, sirovi podaci o unosu vitamina D iz suplemenata dodati su na unos vitamina D iz namirnica sa ciljem dobijanja objedinjenog rezultata o ukupnom unosu

vitamina D <sup>(366)</sup>. Na kraju je ukupni unos D vitamina kod ispitanika upoređen sa IOM preporukama zdravog nivoa unosa vitamina D, kojim se postiže adekvatan status vitamina u organizmu u odsustvu njegove endogene sinteze: a) za preporučeni dnevni unos (RDA) od 15 µg/dan i b) prosečan unos (EAR) od 10 µg/dan vitamina D za odrasle ljude (19-50 godina) <sup>(181)</sup>. Na osnovu ukupnog unosa vitamina D sagledan je broj, odnosno procenat u esnika iznad i ispod preporučениh RDA i EAR vrednosti, koje su bazirane upravo na podacima o dijetarnom unosu <sup>(367)</sup>. Dodatno je, korišćenjem dostupnih detaljnih preporuka za trudnice <sup>(368)</sup>, upoređen unos kolekcalna i grupa unetih namirnica od strane trudnica sa preeklampsijom i bez nje, u poslednjih mesec dana pre porođaja.

### **3.4. Antropometrijska merenja**

Antropometrijska merenja u humanim studijama uključivala su merenje visine i težine ispitanika bez obuće na nogama i jakne. Visina je merena sa preciznošću do 0.1 cm (Perspective Enterprises, Kalamazoo, Mich., SAD), a težina sa preciznošću od 0.5 kg pomoću Tanita vage (TBF-300, Tanita Corp., Japan) za procenu sastava tela. Antropometrijski parametri novorođenadi i majki preuzeti su iz njihovih bolničkih kartona.

### **3.5. *In vivo* ispitivanja na animalnom modelu**

Mladi Sprague Dawley pacovi, stari tri nedelje (36 mužjaka, 36 ženki) i teški oko 100 grama, nabavljeni su od Charles River Laboratories (Saint-Constant S.A., St-Constant, QC). Po prijemu u McGill centar za istraživanja na životinjama, pacovi su čuvani u preporučениm standardnim uslovima koji uključuju temperaturu prostorije od 23 °C, vlažnost od 50%, i cikluse mraka i svetla u trajanju od 12 sati. Nakon perioda adaptacije od sedam dana, svi pacovi su nasumično raspoređeni u šest grupa kako bi bili podvrgnuti različitim dijetama u cilju sagledavanja biološkog odgovora kostiju na sadržaj egzogenog i endogenog 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>.

### **3.6. Dijete za studiju sa animalnim modelom**

Tokom perioda od osam nedelja, šest grupa pacova hranjeno je standardnom hranom za mlade pacove AIN-93G koja je sadržala različite koncentracije vitamina D<sub>3</sub> ili njegovih metabolita. Kontrolna dijeta AIN-93G (1 IU vitamina D<sub>3</sub>/g hrane) i dve eksperimentalne

dijete sa sadržajem vitamina D<sub>3</sub> od 2 ili 4 IU/g hrane napravljene su da bi se ispitao dozno-zavisni odgovor na povećanu koncentraciju holekalciferola kod mladih pacova. Za ispitivanje biološke uloge 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> napravljene su dijetete sa 0.5 ili 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>/g hrane i referentna dijeta sa 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub>/g hrane, u kojima nije bilo holekalciferola. Destilovana voda je životinjama bila neograničeno dostupna.

Za eksperimentalne dijetete sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>, ove supstance su nabavljene od Isosciences (King of Prussia, PA, SAD) i poslate u Harlan Laboratorije (Madison, WI, SAD). Dijete bez holekalciferola su napravljene sa kazeinom ekstrahiranim u etanolu kako bi se minimizovao uticaj podloge na 25(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u dijetama. Pelete hrane sušene su na vazduhu da bi se osiguralo otklanjanje metabolita 25(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Dijete sa holekalciferolom napravljene su od AIN-93G hrane i smeše vitamina D<sub>3</sub> u maltodextrinu (Rovamix D<sub>3</sub> 500) koje su nabavljene od DSM Nutritional Products (Heerlen, Netherlands). Analizom proizvoda (No # 04323767), od strane DSM Nutritional Products, nije detektovan 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u Rovamix D<sub>3</sub> 500 (lot # UE 0110705/godina 2012). Dijete su bile različitih boja (boje za hranu: žuta, zelena, plava, bela, crvena i narandžasta, dodate su u dijetete) i na taj način kodirane tokom izvođenja studije, kako istraživači ne bi znali njihov sadržaj (slepe dijetete). Unos hrane meren je dva puta nedeljno.

### **3.7. Uzorci krvi u humanim studijama**

#### **3.7.1. Uzorci krvi za procenu unosa vitamina D kod žena u reproduktivnom periodu u Srbiji - studija validacije upitnika WRH-FFQ**

Kao što je predhodno pomenuto, u studiju validacije upitnika za procenu unosa vitamina D uključeno je na dobrovoljnoj bazi ukupno 450 žena u reproduktivnom periodu, sa tri najveća univerziteta, kako bi uzorak bio reprezentativan za celu zemlju. Kriterijumi za uključivanje u studiju odnosili su se na starosnu dob (od 18 do 35 godina), dobro opšte zdravstveno stanje, bez hroničnih oboljenja. Žene profesionalni sportisti, trudnice i dojilje nisu uključene u studiju. Od 450 u esnica studije, nasumično je izdvojeno oko 10% u esnica (n=45). Ova grupa je uključena u dalji proces validacije, koji je obuhvatio popunjavanje 24h-AI u tri ponavljanja (kako je opisano u poglavlju 3.3.2.), antropometrijsko merenje i uzimanje uzorka krvi. Uzorak krvi uzet je, nakon gladovanja preko noći, za standardne biohemijske analize i za određivanje sadržaja ukupnog 25-OH-

D. Sakupljeni uzorci plazme i seruma čuvani su na -80 °C do izvođenja pomenutih analiza.

### **3.7.2. Uzorci krvi trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorođenadi – studija ispitivanja statusa vitamina D**

Studija na trudnicama sa preeklampsijom i bez nje sprovedena je u zimskom periodu 2011. godine, od januara do aprila, kada je izloženost UVB zračenju minimalna a samim tim minimalna je i endogena sinteza vitamina D. Nakon prijema u Klinički centar Srbije, na odeljenju za ginekologiju i akušerstvo, trudne žene pozvane su da učestvuju u istraživanju potencijalne povezanosti statusa vitamina D i preeklampsije. U studiju je uključeno 60 trudnica i njihovih novorođenadi. Potpisani pristanak dobijen je od svih trudnica. Polovina ispitanika imala je dijagnozu preeklampsije PE grupa, dok je druga polovina imala normotenzivnu fiziološku trudnoću bez ikakvih zdravstvenih komplikacija (kontrolna grupa). Kriterijumi za uključivanje trudnica u studiju bili su: prva trudnoća, monofetalna trudnoća, nepuša i dobro zdravlje u prethodnom periodu. Kriterijum za dijagnozu preeklampsije, baziran na preporukama WHO, bio je: sistolni krvni pritisak iznad 140 mmHg i dijastolni krvni pritisak iznad 90 mmHg, kao i prisutna proteinurija. Gestaciona starost određena je prema poslednjem menstrualnom ciklusu i potvrđena pregledom ultrazvučnim aparatom pre 20 nedelje gestacije. Trudnice sa preeklampsijom i bez nje su uparene 1:1, na osnovu starosti žena (19-35 godina) i vremenskog okvira u odnosu na nedelju u kojoj su se porodile. Neposredno, pre ili nakon porođaja, sakupljeni su uzorci krvi trudnica (i izdvojeni serum i plazma) za određivanje statusa vitamina D. Na porođaju je, takođe, sakupljena krv iz pupčane vrpce, kako bi se odredio status vitamina D kod novorođenadi. Karakteristike porodilja i novorođenadi preuzete su iz njihovih medicinskih kartona. Takođe, neposredno pre ili nakon porođaja trudnice su popunile upitnik WRH-FFQ, kako bi se odredio unos vitamina D kroz ishranu i suplemente.

### **3.7.3. Uzorci krvi trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorođenadi rođenih prevremeno - preliminarno ispitivanje statusa vitamina D**

Kohort studija sa novorođenadima rođenim prevremeno sprovedena je u Manitobi (Kanada) pre nekoliko godina. Iz ove velike studije su izabrana novorođenadije su majke imale preeklampsiju (PE grupa) i uparene su sa novorođenadima rođenim iz

fizioloških normotenzivnih trudnica (kontrolna grupa) u odnosu 1:2. Sva novorođenad bila su rođena pre 32 nedelje gestacije, bez kongenitalnih malformacija i zadržana na bolničkoj jedinici. U ovoj maloj studiji (eng. nested case-control design) uključene su prevremeno rođene bebe iz PE grupe (n=8) i kontrolne grupe (n=16) trudnica. Svim trudnicama uzorak krvi uziman je na porođaju dok je prvi uzorak krvi novorođenadi uzet nekoliko dana nakon porođaja, krajem prve nedelje života. Prevremeno rođene bebe dodatno su praćene u toku prvih 5 nedelja života, kada su im snimljene kosti pomoću DXA aparata i ponovo uzet uzorak krvi (približno u vremenu punog termina). U svim uzorcima plazme novorođenadi i njihovih majki analizirana je koncentracija metabolita vitamina D pomoću LC-MS/MS metode. Svi antropometrijski i biohemijski parametri preuzeti su iz prethodne studije i medicinskih kartona majki i novorođenadi.

### **3.8. Uzorci krvi i kostiju u animalnoj studiji**

Tokom perioda od osam nedelja šest grupa mladih pacova hranjeno je sa različitim dijetama uz neograničen pristup destilovanoj vodi. Unos hrane meren je dva puta nedeljno tako što je za svaki kavez sa pacovima prvo izmerena određena količina hrane koja je davana životinjama, a zatim je nakon 3 ili 4 dana u svakom kavezu merena preostala količina hrane koja nije pojedena. Dužina trajanja studije definisana je na osnovu poluživota 25(OH)D<sub>3</sub> (15-21 dan), kako bi odgovarala trajanju od 3-4 poluživota ovog jedinjenja<sup>(46)</sup>. Takođe je prethodno u *in vivo* studijama pokazano da je period od osam nedelja kod mladih pacova dovoljan da se registruju promene na kostima u vidu promena u uvećanju koštane mase<sup>(369)</sup>, i postizanju maksimuma koštane mase<sup>(370)</sup>. Telesna težina pacova merena je na nedeljnom nivou, dok je njihova dužina izmerena na početku studije, na kraju četvrte nedelje (u sredini) i na kraju osme nedelje (kraj studije), kada im je uziman i uzorak krvi.

#### **3.8.1. Uzorci krvi životinja**

Uzorci krvi mladih pacova uzeti su nakon potpunog gladovanja, od minimum 8 h, u periodu između 8:00 i 10:00 ujutru. Svi uzorci su sakupljeni u ovom periodu kako bi se kontrolisale dnevne varijacije određenih biomarkera, kao što je npr. PTH. Krv je sakupljana tri puta, na početku, u sredini (nakon 4 nedelje) i na kraju (nakon 8 nedelja)

studije. Venska krv sakupljena je u heparinske mikroeprovete (Becton Dickinson, New Jersey, US) i centrifugirana 10 min na 2000 obrtaja na temperaturi od 4 °C. Svi uzorci su podeljeni u manje alikvote i čuvani na -80 °C do analize biomarkera metabolizma kostiju i metabolita vitamina D.

Na kraju četvrte i osme nedelje, sakupljena su i dva uzorka pune krvi u staklene cevi sa heparinom za određivanje koncentracije jona kalcijuma (ABL80 Flex, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Koncentracija jona kalcijuma analizirana je nakon uzimanja uzorka u intervalu od 4h.

### **3.8.2. Uzorci kostiju životinja**

Nakon osam nedelja, urađena su DXA i  $\mu$ CT snimanja *in vivo*, a potom su životinje uvedene u duboku anesteziju i žrtvovane putem kardijalne punkcije (vađenjem krvi iz srca). Zatim su tokom seciranja pacova, izvađene duge kosti i prvih četiri kičmena pršljena i sačuvane za dalja ispitivanja jona i mikrostrukture kostiju i *ex vivo* snimanja u visokoj rezoluciji pomoću  $\mu$ CT. Ošabene kosti su čuvane na -20 °C, zamotane u gazu i natopljene fiziološkim rastvorom.

## **3.9. Metode za određivanje koncentracije metabolita vitamina D**

Za određivanje koncentracije metabolita vitamina D korišćene su tri metode. Hemiluminiscentna metoda (Liason analizator) primenjena je za određivanje ukupnog 25(OH)D kod žena u reproduktivnom dobu, u studiji validacije upitnika za procenu unosa vitamina D. LC-MS/MS metoda za određivanje koncentracije metabolita vitamina D (25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) korišćena je u ostalim studijama obuhvaćenim ovom disertacijom, uključujući i studije sa trudnicama sa preeklampsijom i bez nje i njihovim novorođenim bebama u Srbiji i u Kanadi, kao i studiju na životinjama. Sadržaj aktivnog metabolita 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi određen je kompetitivnom imunoenzimskom metodom korišćenjem komercijalnog kita za određivanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Boehringer Mannheim, Mannheim, Nemačka). Svi uzorci seruma i plazme iz animalne i humanih studija čuvani su na -80 °C do izvođenja analiza. Uzorci seruma i plazme, sakupljeni u Beogradu transportovani su na suvom ledu, kojim je garantovan transport u zaleđenom stanju, u Kanadu na McGill Univerzitet, gde su do izvođenja analiza takođe



uvani na -80 °C.

### **3.9.1. Određivanje koncentracije ukupnog 25(OH)D u plazmi hemiluminiscentnom metodom**

U uzorcima plazme mladih žena u reproduktivnom periodu koje nisu trudne, sadržaj ukupnog 25(OH)D određen je hemiluminiscentnom metodom korišćenjem komercijalnog kita LIAISON® 25 OH Vitamin D Total (DiaSorin Inc, Stillwater, SAD) na LIAISON® analizatoru. Ova hemiluminiscentna metoda je detaljno opisana ranije<sup>(371, 372)</sup>.

Po 250 µL uzorka plazme dodato je u bunar i e na plo i (96 plate), na ijem se dnu, nalaze magnetne kuglice presvu ene specifi nim monoklonskim antitelom ovce. Postupak se sastoji iz tri faze: 1) inkubacija u toku 10 minuta, pri kojoj se 25(OH)D odvaja od proteina plazme (za koje je bio vezan) i vezuje za specifi no antitelo imobilisano na vrstoj fazi (na magnetnim kuglicama); 2) dodatak obeleživa a (25(OH)D konjugovanog sa derivatima izoluminola) i inkubacija u trajanju od deset minuta, kada se 25(OH)D iz plazme i obeležen 25(OH)D konjugovan sa derivatima izoluminola takmi e za vezivna mesta na antitelu ; 3) ispiranje materijala koji se nije vezao za antitelo na magnetnim kuglicama, dodatak reagensa – startera koji inicira hemiluminiscentnu reakciju. Intenzitet svetlosti, izmeren pomo u LIAISON® analizatora, je obrnuto proporcionalan koncentraciji 25(OH)D u ispitivanim uzorcima, kao i u kalibratorima i kontrolnim uzorcima.

Tokom merenja, pored DiaSorin kontrolnih uzoraka koji sadrže niske i visoke koncentracije 25(OH)D, analizirani su i standardni uzorci Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (NIST) nivoa 1 i nivoa 2 (NIST 972) i DEQAS (eng. Vitamin D External Quality Assessment scheme). Koeficijent varijacije (CV) u okviru ovog testa (eng. intra-assay) CV=3.18% (0.55% -7.17%) izra unat je na osnovu ponovljenih merenja DiaSorin kontrolnih uzoraka plazme sa visokom i niskom koncentracijom 25(OH)D, koji su u referentnom opsegu za odrasle osobe. Vrednosti dobijene pri proveriti nosti testa, uzimaju i srednji opseg specifikacija proizvo a a, iznosile su 104% i 103% za DiaSorin kontrolne uzorke (niske i visoke koncentracije, respektivno), 97% i 90.44% za uzorke Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (NIST 972a nivo 1 i

NIST 972 nivo 2, respektivno). Laboratorija na McGill Univerzitetu, u kojoj su analizirani uzorci, u estvuje u programu za procenu kvaliteta odre ivanja koncentracija metabolita vitamina D - DEQAS i ima sertifikate za 2013-2014. To zna i da više od 75% rezultata koji su potekli iz ove laboratorije spadaju u najpreciznijih 25% rezultata (All-Laboratory Trimmed Mean) iz svih laboratorija sveta koje u estvuju u DEQAS programu.

### **3.9.2. Odre ivanje koncentracije metabolita D vitamina LC-MS/MS metodom**

U uzorcima plazme trudnica i novoro enadi obuhva enih ovom disertacijom, kao i uzorcima seruma pacova, koncentracija metabolita vitamina D odre ena je pomo u LC-MS/MS metode. Analize su uklju ivale odre ivanje koncentracija 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, ukupnog 25(OH)D (zbira svih 25(OH)D oblika) kao i ukupnog 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, koji uklju uje oba C-3 epimera. Analize su izvedene pomo u jedinstvenog protokola na Queen's Univerzitetu (uzorci humanih studija) i u Warnex laboratoriji u Montrealu (uzorci pacova). LC-MS/MS analize uklju ivale su analize ekstrakata uzoraka plazme u triplikatu zajedno sa setom kalibratora i uzoraka za kontrolu kvaliteta. Pored humanih i animalnih uzoraka analizirani su i DEQAS i NIST uzorci (standardni uzorci koji odgovaraju referentnim vrednostima), u cilju kontrole kvaliteta. Koeficijent varijacije (CV) izme u razli itih serija LC-MS/MS analiza (eng. inter-assay) za 25-OH-D<sub>3</sub> odstupao je izme u -0.7% i -17% od referentnih DEQAS/ NIST vrednosti. Kao laboratorije sertifikovane u DEQAS i NIST programu o ekivano je da više od 75% rezultata, koji su potekli iz ovih laboratorija, mogu odstupati do ±15% od NIST referentnih vrednosti i da spadaju u najpreciznijih 25% rezultata (All-Laboratory Trimmed Mean) iz svih laboratorija sveta koje u estvuju u DEQAS programu. Svi rezultati dobijeni LC-MS/MS metodom su tako e bili u ovim granicama. Kalibracione krive su za svaki metabolit konstruisane na osnovu etiri razli ite koncentracije standarda analiziranih u duplikatu, osim za 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (šest ta aka kalibracije). U cilju kalibracije aparata za odre ivanje 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> koriš en je pik sa 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, jer trenutno ne postoji DEQAS ili NIST standard za eksternu procenu kvaliteta 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(141)</sup>.

Vitamin D iz uzoraka (humanih i animalnih) ekstrahovan je postupkom, koji uklju uje Diels-Alder derivatizaciju i nekoliko faza pre iš avanja, i koji je predhodno detaljno opisan od strane Kaufmann i saradnika <sup>(141)</sup>. Nakon toga, uzorci su analizirani u triplikatu

pomo u te ne hromatografije udružene sa masenom spektrometrijom LC-MS/MS.

### 3.9.2.1. Priprema uzoraka

U mikro-epruvetama, 100  $\mu\text{L}$  uzorka seruma (ili plazme) ili kalibratora rastvoreno je u 200  $\mu\text{L}$  vode, dodati su interni standardi: 80 ng/mL d3-25(OH)D<sub>3</sub>, 65 ng/mL d3-25(OH)D<sub>2</sub> i 6 ng/mL 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, i 100  $\mu\text{L}$  rastvora 0.1 M hlorovodoni ne kiselina. Nakon dodavanja svake supstance mikroeprove su stavljanje na vortex da bi se sadržaj dobro izmešao. Taloženje proteina izvedeno je sa dodatkom 0.2 M cink-sulfata i 450  $\mu\text{L}$  metanola. Nakon toga, sadržaj u mikro-epruvetama centrifugiran je 10 minuta na 12 000 obrtaja. Supernatant je preba en u borosilikatne staklene epruvete u koje je dodato 700  $\mu\text{L}$  heksana i 700  $\mu\text{L}$  metil-terc-butil-etra, uz mešanje na vorteksu nakon dodavanja svake supstance. Gornja organska faza odvojena je u epruvete za uzorke za LC-MS/MS i uparena u struji N<sub>2</sub> na 37 °C. Suvi ostaci uzoraka rastvoreni su dodatkom 25  $\mu\text{L}$  0.1 mg/mL DMEQ-TAD u etilacetatu i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, ime je zapo et proces njihove derivatizacije. Nakon ponovnog dodatka DMEQ-TAD uzorci su inkubirani još 60 minuta <sup>(373)</sup>. U slede em koraku dodato je 40  $\mu\text{L}$  etanola i tako derivatizovani uzorci su ponovo upareni do suva. Suvi ostatak je rastvoren u 60  $\mu\text{L}$  smeše metanola i vode (60:40, v/v).

### 3.9.2.2. LC-MS/MS analiza

Uzorci, pripremljeni na predhodno opisan na in, analizirani su pomo u te nog hromatografa ACQUITY UPLC Waters (Milford, SAD) sa masenim detektorom Xevo TQ-S Waters (Milford, SAD). Elektrosprej jonizacija je ra ena u pozitivnom modu sa kapilarnim naponom od 1.0 kV i protokom azota od 1000 L/h (Desolvation gas flow) i 150 L/h (Cone gas flow). Za hromatografsko odvajanje koriš ena je BEH-Phenyl UPLC kolona (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1x50 mm) Waters (Milford, SAD) i gradijentni sistem rastvara a na bazi metanola i vode. Koriš ene su dve mobilne faze: mobilna faza A (2 mM amonijum-acetat sa 0.1 % mravlje kiseline u vodi i mobilna faza B ( 2 mM amonijum-acetat sa 0.1 % mravlje kiseline u metanolu). Gradijent je sadržao 65-90 % mobilne faze B (% vol.). Temperatura u koloni bila je 40 °C, dok je svaki put ubrizgavano po 10  $\mu\text{L}$  ekstrakta (full loop mode). U ukupnom ekstraktu koji se analizira pomocu LC-MS/MS nalazi se okvirno 1/6 (oko 17  $\mu\text{L}$ ) od po etnih 100  $\mu\text{L}$  analiziranog uzorka. Vreme potrebno za LC-MS/MS

analizu bilo je manje od 5 minuta. Postupak su do detalja opisali Kaufmann i saradnici<sup>(141)</sup>, koji su uradili najveći broj analiza uzoraka, obuhvatajućih ovom tezom, u laboratoriji na Queens univerzitetu.

### **3.9.3. Određivanje koncentracije 1,25-dihidroksivitamina D u plazmi**

U uzorcima plazme trudnica sa i bez preeklampsije sadržaj 1,25-dihidroksivitamina D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D) određeno je kompetitivnom imuno-enzimskom metodom sa selektivnim monoklonskim antitelom pomoću komercijalnog kitta ELISA 1,25-(OH)<sub>2</sub>D (Alpco, Salem, SAD). Po 1 mL ispitivanih uzoraka, zajedno sa standardima i kontrolnim uzorcima, su pipetirani na kolone Chromabond<sup>®</sup> Se2112 (Alpco, Salem, SAD) i inkubirani 10 minuta. Zatim su eluirani diizopropil-etrom (4x1mL), pri čemu je eluat direktno kapao sa kolone u kertridže napunjene silika-gelom (vrsta faza, Silica Cartridges Se2112, Alpco, Salem, SAD), koji su dva puta ispirani sa 8mL izopropanola i heksana (6:94 v/v). U sledećem koraku 1,25-(OH)<sub>2</sub>D je ispiran dva puta sa silika-gela sa 2 mL smeše izopropanola i heksana (25:75 v/v). Ovako dobijeni ekstrakti uzoraka direktno su skupljani u staklene epruvete, nakon čega je njihov sadržaj uparavan na 37 °C u struji azota. Upareni ekstrakti uzoraka, zajedno sa standardima i kontrolnim uzorcima, inkubirani su sa antitelom za detekciju 60 minuta na sobnoj temperaturi 18-26°C. U sledećem koraku na 96 mikro-ploču obloženu sa 1,25-(OH)<sub>2</sub>D dodati su ekstrakti prethodno inkubirani sa antitelom za detekciju i ostavljeni 19 sati na temperaturi od 6-10°C. U toku ove inkubacije odvija se kompeticija između imobilisanog 1,25-(OH)<sub>2</sub>D i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D iz ispitivanih uzoraka za antitelo za detekciju. Nakon perioda od 19 sati, ispire se materijal koji se nije vezao za antitelo pet puta sa 250 µl rastvora pufera za ispiranje gde se u poslednjem ispiranju uklone ostaci rastvora za ispiranje prislanjanjem mikro-ploče na papir koji upija. U sledećem koraku se u svaki bunar i dodaje konjugat poliklonskog antitela miševa obeleženog peroksidazom i ostavi tačno 60 minuta na sobnoj temperaturi 18-26°C na horizontalnom mikseru za mikro-ploče nakon čega se ponovo ispire materijal pet puta sa 250µl rastvora pufera za ispiranje. U sledećem koraku se u sistem dodaje tetrametilbenzidin i inkubira u mraku na sobnoj temperaturi 15-25 minuta. U završnom koraku se u svaki bunar i dodaje 50 µl stop rastvora što se manifestuje promenom boje iz plave u žutu. Apsorbancija bojenog proizvoda meri se na talasnoj dužini od 450 nm i obrnuto je proporcionalna koncentraciji 1,25-(OH)<sub>2</sub>D u uzorcima.

Koeficijent varijacije u okviru ovog testa za 1,25-(OH)<sub>2</sub>D iznosio je 8.6%.

### **3.10. Standardne biohemijske analize**

#### **3.10.1. Praćenje standardnih biohemijskih parametara u humanim uzorcima**

Standardni biohemijski parametri i karakteristike porodilja i novorođenadi, u esnika u studijama preuzete su iz njihovih medicinskih kartona. Biohemijske analize u okviru rutinske provere stanja pacijenata uključivale su za sve majke proveru krvne slike, funkcije bubrega (serumski kreatinin i urea), funkcije jetre (bilirubin, alanin-transaminaze (ALT), aspartat-transaminaze (AST), gama-glutamil-transferaze (Gama GT) i C-reaktivni protein (CRP). Ove analize urađene su u Srbiji u laboratoriji Kliničkog Centra Srbije koja poseduje sertifikat o kvalitetu za medicinski biohemijski program za period 2011-2012. godina. Standardni biohemijski parametri analizirani su na Beckman Coulter AU480, krvna slika na hematološkom analizatoru (ABBOTT CELLDyn 3700), a koncentracija CRP određena nefelometrijski (Siemens BN ProSpec). U preliminarnoj studiji u Kanadi, za pre vremena i u terminu rođenju novorođenadi i njihove majke, navedeni biohemijski parametri kao i biomarkeri metabolizma kostiju su preuzeti iz njihovih medicinskih kartona iz Zdravstveno-Naučnog Centra Vinipeg (Winnipeg's Health Sciences Centre).

#### **3.10.2 Praćenje biohemijskih parametara u animalnim uzorcima plazme**

Biohemijska analiza uzoraka plazme mladih pacova uključivala je određivanje koncentracije u plazmi PTH, CTX, OPG, RANKL korišćenjem komercijalnih kitova specifičnih za istraživanja na pacovima (poglavlje 3.1.). Sve biohemijske analize uzoraka plazme pacova urađene su u biohemijskoj laboratoriji Škole za ishranu i dijetetiku na McGill Univerzitetu. Koeficijent varijacije za PTH iznosio je 10.2 %, a za CTX 6.2 %, dok je za RANKL i OPG bio 17.8 % i 14.1 %.

### **3.11. Određivanje koncentracije jona metala u humanim uzorcima plazme**

U uzorcima plazme majki sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorođenadi kvantitativno je određena koncentracija jona kalcijuma, magnezijuma, gvožđa, cinka i bakra. Određivanja su rađena u triplikatu pomoću atomskog apsorpcionog spektrometra Spectra AA 10, Varian (Pty Ltd., Mulgrave Victoria, Australia), korišćenjem plamena vazduh/acetilen uz upotrebu deuterijuma za korekciju pozadinskog zračenja. <sup>(374)</sup> Pri određivanju koncentracije jona Ca i Mg, kao otpuštajući agens dodat je lantanijum (0.1% w/v). Kalibracija je rađena sa kontrolnim uzorcima ClinChek-Control (GmbH, Nemačka). Intenzitet propuštene svetlosti za određivane jone, meren je na sledećim talasnim dužinama (nm): Ca 422.7, Mg 285.2, Cu 324.7, Fe 248.3, Se 279.5 i Zn 213.9. Koncentracija selena (Se) određivana je u uzorcima plazme na istom instrumentu, uz dodatak jedinice Varian VGA-76 <sup>(375)</sup>. Dobijene vrednosti koeficijenta varijacije za određivanje jona Mg, Fe, Zn, Cu i Se bile su 1.24%, 3.42%, 2.25%, 3.07% i 5.63%, redom.

### **3.12. Procena strukture, sastava i jačine kostiju kod mladih pacova**

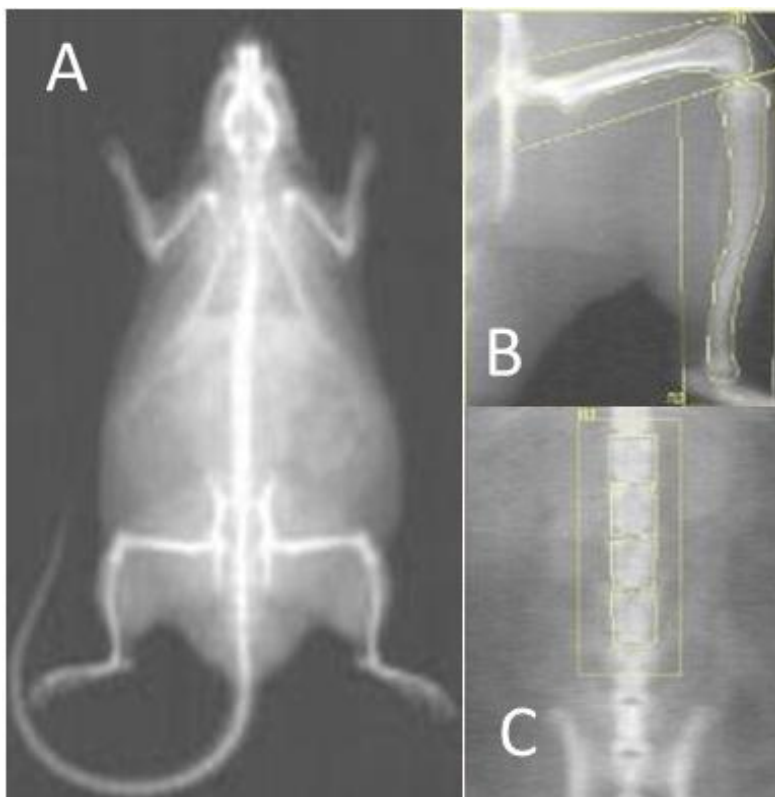
Procena strukture i sastava kostiju kod mladih pacova uključivala je *in vivo* i *ex vivo* skeniranja. Na početku, u sredini i na kraju studije, odmah nakon uzimanja krvi, pacovi su uvođeni u laku anesteziju da bi se podvrgli skeniranju kostiju. Pomoću DXA uređaja pacovima je skenirano najpre celo telo, a zatim posebno femur i tibija i na kraju kičmeni pršljenovi. Na početku i na kraju studije nakon DXA snimaka, životinjama koje su i dalje pod anestezijom, sniman je lumbalni pršljen 3 (L3), koristeći *in vivo*  $\mu$ CT za male životinje. Pacovi su bili izloženi x-zračenju u trajanju do okvirno 30 minuta (DXA i  $\mu$ CT) pri svakom od tri merenja u toku osam nedelja. Prethodno je pokazano da izlaganje pacova x-zračenju na nedeljnom nivou od 35 minuta ili na mesečnom nivou od 25 minuta nema negativan efekat na rast i razvoj koštane mase <sup>(376,377)</sup>.

#### **3.12.1. Snimanja kostiju *in vivo* pomoću DXA aparata**

Pre skeniranja kostiju, životinje su uvođene u anesteziju u posebnoj komori pomoću 5% gasa izoflurana (PrAErrane, Baxter Corp. Mississauga, Kanada). Tokom snimanja, pacovima je pomoću maske dopreman 2% izofluran kako bi se održavalo stanje

anestezije. U stanju anestezije, pacovima je merena dužina, od nosa do korena repa, kao i od nosa do kraja repa. Neposredno pre snimanja, životinje su postavljane u leže i položaj za snimanje celog tela (eng. whole body - WB) (Slika 9A) i za snimanja pojedina nih kostiju femura i tibije (Slika 9B) u visokoj rezoluciji, kao i ki menih pršljenova (L1-4) (Slika 9C). Kostiju su snimljene pomoću DXA aparata Hologic 4500, QDR Version 12.5 (Hologic Incorporated Bedford, SAD). Snimanja celog tela (WB) pomoću DXA aparata sa Hologic hardverom i softverom su prethodno validirana za pacove teže od 130 g <sup>(378)</sup> i za snimanja u visokoj rezoluciji pojedina nih kostiju kod malih glodara <sup>(379)</sup>.

DXA snimci su analizirani pomoću Hologic specifičnog programa za analiziranje snimaka malih životinja i time su dobijeni *in vivo* podaci o mineralnom sadržaju kostiju (BMC), aBMD-mineralnoj gustini kostiju po jedinici površine (eng. areal Bone Mineral Density) ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) i površini svake analizirane kosti (eng. bone area). Smatra se da skeniranje celog tela (WB) omogućava idealno praćenje intenzivnog rasta životinja, dok se snimanjem dugih kostiju i kičme mogu najbolje uočiti promene u mineralnom sadržaju i gustini kostiju (BMC i BMD). Pomoću vrednosti BMC i BMD, dobijenih za period tokom osam nedelja, moguće je izračunati % promene ovih parametara tokom vremena i povećanje (porast) mineralnog sadržaja kostiju kod pacova. Sve analize DXA snimaka, u vidu opretnosti kontura kostiju na svakom snimku, uradila je jedna osoba kako bi se minimizovala odstupnja i potencijalne nedoslednosti.



**Slika 9.** Primer DXA snimaka celog tela (A), femura i tibije (B) i ki menih pršljenova od 1 do 4 (C) mladih pacova

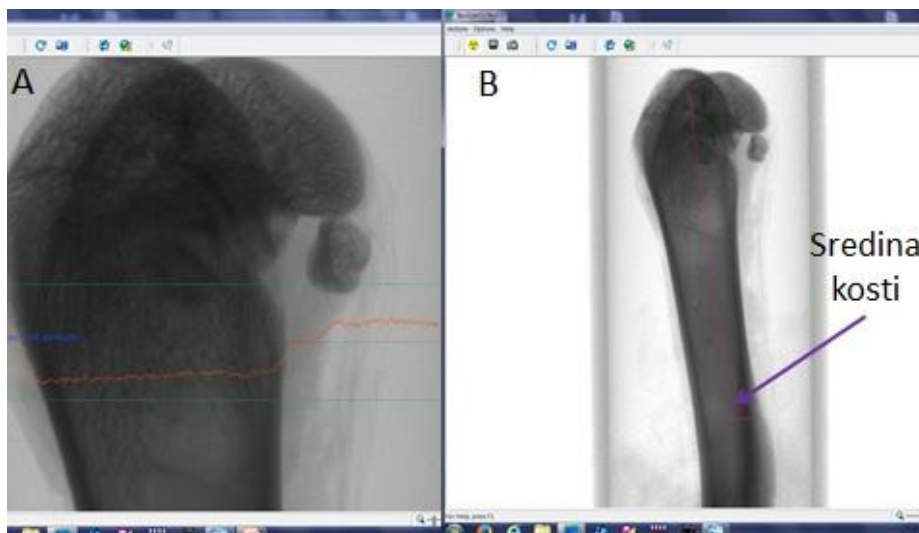
### 3.12.2. Snimanja kostiju *in vivo* pomo u $\mu$ CT aparata

Za preciznija merenja, vBMD-mineralne gustine kostiju po jedinici zapremini (eng. volumetric BMD) ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) i strukture kostiju, *in vivo* pacovi su na po etku i na kraju studije snimani pomo u  $\mu$ CT aparata LaTheta, model LCT200 (EchoMRI, Texas, SAD), kojim se mogu skenirati životinje težine do 1,5 kg. Odmah nakon DXA snimanja, pacovi su prebacivani u komoru  $\mu$ CT aparata i pozicionirani prema standardnim protokolima za snimanja životinja u opštoj anesteziji. Snimanje je obuhvatalo samo L3 u rezoluciji od  $120 \mu\text{m}^3$  i snagom od 50 kV i 0.5 mA (power settings). Analiza L3 snimaka pomo u LaTheta programa obuhvatala je centralni vertebralni region L3 u dužini od 1.44 mm za snimke sa po etka studije i dužinu od 2.88 mm za snimke sa kraja studije. Na taj na in dobijeni su rezultati trodimenzionalnog BMD ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), oblika i veli ine L3, kao i kortikalno-trabekularne zapremine L3.



### 3.12.3. Snimanja kostiju *ex vivo* pomoću u $\mu$ CT aparata

Mikro-struktura kostiju pacova (L3 i femura) procenjena je pomoću skenera visoke rezolucije Skyscan 1174  $\mu$ CT (Skyscan, Belgija). Sat vremena pre snimanja, zamrznute kosti su vađene iz zamrzivača i ostavljane da se postepeno odmrznu na sobnoj temperaturi (23 °C). Nakon potpunog odmrzavanja, svaka kost je vađena iz gaze i uvijana u Parafilm™ (Pechiney, Menasha, SAD) da bi se sprečilo sušenje kostiju tokom snimanja. Zatim je kost postavljena u usku plastičnu cev unutar skenera, koja je omogućavala postavljanje svih kostiju na identičan način za snimanje. Snimanje je urađeno propuštanjem X-zraka jačine 50 kV i 800  $\mu$ A, sa vremenom izloženosti (eng. exposure time) od 7000 ms za femur i 8000 ms za L3. Stepent rotacije kostiju prilikom snimanja bio je 0.9° dok je prosečan kadar (eng. frame averaging) procenjivan na osnovu dva kadra. Korišćenjem aluminijumskog filtera od 0.2 mm za femur i L3, kao pred-filtera X-zraka na izvoru zračenja, korigovan je uticaj na linearnost funkcije zbog različitih debljina kostiju i tkiva u njima kao apsorbera zračenja<sup>(380)</sup>. Kosti femura snimane su dva puta, distalni deo u rezoluciji od 11.7  $\mu\text{m}^3$ , a srednji deo femura u rezoluciji od 30.6  $\mu\text{m}^3$  (Slika 10), kako bi se na najadekvatniji način procenio sadržaj kortikalnog i trabekularnog koštanog tkiva. L3 je sniman u rezoluciji od 14.2  $\mu\text{m}^3$ . Rekonstrukcija snimaka urađena je pomoću specijalizovanog programa NRecon v1.6.4.1 (Skyscan, Belgija). Rekonstruisani snimci su manuelno podeljeni na kortikalne i trabekularne delove koštanog tkiva, zatim konvertovani u binarne slike, i na kraju analizirani pomoću CT Analyser v1.11.8.0 (Skyscan, Belgija). Prilagođavanje graničnih vrednosti je korišćeno za segmente koštanog tkiva i određena je specifična oblast za svako tkivo (eng. region of interest - ROI). Za analize trabekularnog tkiva femura po svakom ROI je postavljen na udaljenosti od 1.17 mm od epifize i obuhvatao je 1.75 mm dužine femura u proksimalnom pravcu. Za analize kortikalnog tkiva ROI je obuhvatio 3.06 mm središnjeg dela femura (mid-diaphysis). Za razgraničenje između različitih koštanih tkiva korišćena je funkcija 3D “shrink-wrap” u programu CT Analyser v1.11.8.0 (Skyscan, Belgija). Kako bi se minimizovala odstupanja i potencijalne nedoslednosti sve analize i snimanja uradila je ista osoba.

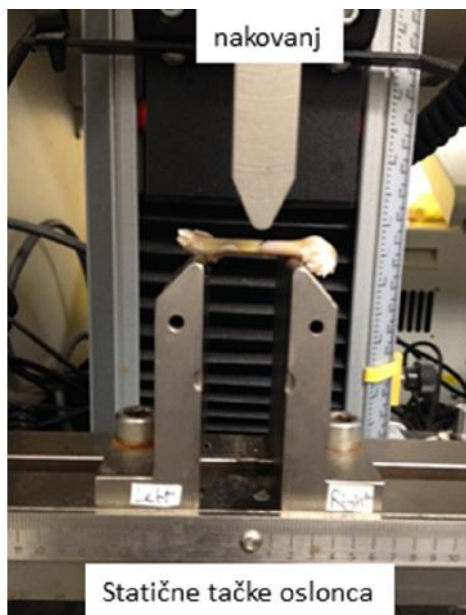


**Slika 10.** *Ex vivo* Skyscan 1174  $\mu$ CT snimci femura u rezoluciji od  $11,7 \mu\text{m}^3$  (A) i rezoluciji od  $30,6 \mu\text{m}^3$  (B) za procenu sadržaja trabekularnog i kortikalnog koštanog tkiva

#### 3.12.4. Test fleksibilnosti kostiju u tri ta ke

Fleksibilnost kostiju u tri ta ke testirana je na kostima femura pacova pomo u instrumenta Instron 5544 (Norwood, MA, SAD). Prethodno zamrznute i uvane kosti na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  su postepeno odmrznute u vodenom kupatilu, tokom perioda od tri sata, na sobnoj temperaturi ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Dužina cele kosti i dijametar femura u srednjoj ta ki svake kosti mereni su pomo u digitalnog Fisher Scientific šublera (St-Laurent, QC, Kanada), pri emu je crnim markerom obeležena središna ta ka na femuru merena po dužini kosti. Svaka kost je spoljašnjom stranom naslonjena na dve nepokretne ta ke oslonca instrumenta (slika 11) i centrirana tako da je rastojanje između ta aka oslonca instrumenta bilo konstantno (za ženke pacova iznosilo je 22 mm, a za mužjake 24 mm). Tre a, pokretna ta ka u ovom testu je tzv. ‘nakovanj’ (eng. anvil), koji se spuštao na kost sa unapred odre enom brzinom od 1 mm/s (Slika 11). Pri kontaktu kosti i ‘nakovnja’ brzina spuštanja bi se automatski promenila na 0.1 mm/min do ta ke pucanja, odnosno trenutka u kome je kost usled pritiska polomljena. Tada se ‘nakovanj’ zaustavljao, a instrument o itavao izmereno maksimalno optere enje savijanja (eng. maximum flexure load - Fmax) i maksimum istezanja kostiju pri maksimalnom optere enju (eng. maximum extension - dmax). Pomo u programa Bluehill verzija 2 (Instron, Canton, SAD) koji je konstruisao krivu deformacije kosti u odnosu na optere enje, dobijen je podatak o energiji

u trenutku preloma (eng. energy at break). Koriste i prethodno validirane jedna ine <sup>(381)</sup> izra unati su stres ( $\sigma$ ) i istežanje ( $\epsilon$ ) pri  $F_{max}$ , kao i Jangov modul, koji predstavlja odnos stresa i istežanja u linearnom delu deformacione krive.



**Slika 11.** Test fleksibilnosti kostiju u tri tačke, urađen za femur pacova na instrumentu Instron 5544 (Norwood, MA, SAD)

### 3.13. Obrada rezultata

Za obradu rezultata korišćeni su statistički programi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., SAD) i SAS 9.4.0. (SAS Institute Inc., Cary, NC), a u studiji validacije upitnika i Med Calc Software (MedCalc version 10.2.0.0) i IBM SPSS Statistics 20.0. Da li je raspodela podataka normalna, ispitano je pomoću Shapiro-Wilk-ovog testa, dok je homogenost varijansi (eng. homogeneity of variances) ispitivana pomoću Levene testa. Korelacija između varijabli ispitivana je Pirsonovom ili Spearmanovom korelacionom analizom. Značajnost razlika karakteristika u esnika u studijama ispitivana je pomoću  $\chi^2$ -testa ili Fišerovog testa za kategoričke promenljive, i Studentovog t-testom za kontinuirane promenljive. Razlike između kontrolnih grupa i tretiranih ili obolelih identifikovane su uz pomoć miksa-modela ANOVA (sa ili bez ponovljenih merenja u zavisnosti od studije) uz post-hoc testove (Bonferroni i Tuckay). Podaci u svim studijama su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (S.D.), osim ukoliko nije

druga i je naznačeno. Vrednosti  $p < 0.05$  smatraju se statistički značajnim.

U svim humanim studijama učesnici su klasifikovani u kategorije prema statusu vitamina D. Ove kategorije su povezane sa nedostatkom vitamina D, odnosno sa koncentracijama vitamina D neadekvatnim ili adekvatnim za zdravlje kostiju i opšte zdravlje pojedinaca u odnosu na njihov status vitamina D (ukupnu koncentraciju 25(OH)D u krvi) <sup>(179)</sup>. Kao što je pomenuto u poglavlju o preporukama za status vitamina D, IOM je 2011. godine predložio definicije statusa vitamina D bazirane na koncentracijama ukupnog 25(OH)D u krvi. Prema ovim preporukama, učesnici studija, sprovedenih u okviru ove teze, podeljeni su prema statusu vitamina D na sledeće kategorije: nedovoljan (25(OH)D nivo  $< 30$  nmol/L), neadekvatan (25(OH)D nivo između 30-50 nmol/L), adekvatan (25(OH)D nivo između 50-125 nmol/L) i potencijalno toksičan (25(OH)D nivo  $> 125$  nmol/L) nivo <sup>(20, 181, 382, 383)</sup>

U studiji validacije WRH-FFQ ispitivana je korelacija (računati Spearmanovi koeficijenti) između dnevnog unosa vitamina D procenjenog upitnicima i koncentracije ukupnog 25(OH)D u plazmi ispitanika (kao biomarkera statusa vitamina D). Pomoću Bland-Altman-ovih plotova ispitivan je potencijal (pouzdanost) WRH-FFQ i 24h-AI upitnika u proceni unosa u odnosu na status vitamina D kod mladih žena u reproduktivnom dobu u Srbiji. Takođe je ispitivana sposobnost klasifikacije unosa vitamina D ispitanika u kvartile pomoću WRH-FFQ upitnika u odnosu na 24h-AI i sadržaj ukupnog 25(OH)D utvrđivanjem broja (procenta) ispitanika koji su ispravno klasifikovani (ispitanici u istom kvartilu), približno klasifikovani (ispitanici u istom ili susednom kvartilu) i pogrešno klasifikovani (ispitanici u suprotnom kvartilu). U studiji validacije WRH-FFQ primenjen je metod trijada (detaljno opisan u poglavlju koje se bavi validacijom upitnika), koji omogućio izračunavanje koeficijenta validacije WRH-FFQ (QI). QI predstavlja korelaciju između unosa nutrijenta procenjenog pomoću FFQ i nepoznatog 'stvarnog' unosa nutrijenta ispitanika <sup>(153)</sup>. Za izračunavanje koeficijenta validacije FFQ (QI) primenjena je jednačina:

$$\dots QI \times \sqrt{r_{QB} \cdot \frac{r_{QR}}{r_{BR}}}$$

u kojoj  $r_{QB}$  predstavlja koeficijent korelacije između FFQ podataka unosa i biomarkera,

rBR - koeficijent korelacije između biomarkera i 24h-AI podataka, dok je rQR koeficijent korelacije između FFQ i 24h-AI. Pored koeficijenta validacije FFQ izrađena je i 95% interval pouzdanosti za srednju vrednost koeficijenta validacije na prethodno opisan način u poglavlju 2.5 <sup>(155, 156)</sup>.

U studiji, koja je uključivala trudnice sa preeklampsijom i bez nje i njihovu novorođenčad, dodatno su korišćene neparametrijske metode za ispitivanje korelacija između koncentracije vitamina D u krvi majke sa ishodima kod novorođenčadi, jer distribucija podataka nije bila normalna. Pomoću linearne regresione analize ispitana je korelacija između koncentracija CRP, kao zavisno-promenljive, i koncentracija minerala i metabolita vitamina kao nezavisno-promenljivih. U studiji sa mladim pacovima korišćen je miks-model ANOVA za ponovljena merenja, gde su u statističkom modelu dijeta i vreme definisani kao fiksni efekti, a unos hrane u danu pre uzimanja krvi kao slučajni efekat.

### **3.14. Etičko odobrenje za izvođenje istraživanja**

Etičko odobrenje za studiju validacije FFQ upitnika dobijeno je od strane etičkog odbora Opšte Bolnice u Leskovcu, dok je osnovni protokol studije sa majkama sa preeklampsijom i bez nje odobrio etički odbor Kliničkog Centra Srbije u Beogradu. Dodatno je dobijeno odobrenje Etičkog odbora na Macdonals kampusu McGill Univerziteta za prenos uzoraka sakupljenih u Srbiji i analizu sadržaja metabolita vitamina D u tim uzorcima. Animalna studija sa mladim pacovima je odobrena od strane Odbora za zaštitu životinja na Macdonals kampusu McGill univerziteta u skladu sa Kanadskim standardima zaštite životinja <sup>(384)</sup>.

## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Validacija upitnika o uсталosti konzumiranja namirnica za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji (WRH-FFQ)**

Procena unosa vitamina D kod žena u reproduktivnom periodu je važan parametar u zaštiti zdravlja. Da bi se uo ili potencijani nedostaci i ispitao unos vitamina D i drugih nutrijenata kod žena u reproduktivnom dobu, postoji potreba za standardizovanim upitnicima. Budu i da na prostoru centralne i isto ne Evrope ne postoji validirani upitnik o uсталosti konzumiranja namirnica koje sadrže vitamin D, prvi cilj ove teze bilo je najpre kreiranje, a zatim i validacija upitnika o uсталosti konzumiranja namirnica (WRH-FFQ), koji bi omogućio procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji.

Upitnik WRH-FFQ prikazan je u prilogu 1, dok su razvoj i proces validacije WRH-FFQ prethodno opisani u poglavlju 3.3.1. Forma upitnika o uсталosti konzumiranja namirnica (eng. FFQ) izabrana je zbog svoje rasprostranjenosti i široke primene za procenu prose nog unosa nutrijenata u definisanom vremenskom periodu <sup>(150)</sup>. U pogledu validacije FFQ upitnika, preporu ena je primena dve referentne metode, kao što su ankete ishrane (ponovljeni upitnik, dnevnik ishrane sa merenjem namirnica itd.) ili kvantifikacija biomarkera statusa za ispitivanu hranu <sup>(150-152)</sup>. U ovoj studiji, upitnik WRH-FFQ je validiran pomo u tri ponovljena popunjavanja ankete dvadeset etvoro asovne ishrane (24h-AI) i odre ivanjem sadržaja biomarkera vitamina D (25(OH)D) u serumu u esnica studije. Primena kvantifikacije biomarkera kao referentne metode ima prednost, jer je manja mogućnost pojave grešaka u odnosu na viši procenat slučajnih grešaka do kojih može do i u anketama ishrane <sup>(154)</sup>. U slučaju vitamina D, koncentracija 25(OH)D odražava unos iz egzogenih izvora i endogenu sintezu vitamina D. U zimskom periodu koncentracija 25(OH)D u krvi direktno odgovara unosu vitamina D iz egzogenih izvora (namirnica i suplementi).

Studija validacije WRH-FFQ sprovedena je u zimskom periodu (2010. i 2011. godine), kada je endogena sinteza vitamina D minimalna usled smanjenog UVB zra enja. Prethodno je pokazano da koncentracija 25(OH)D u krvi direktno odgovara egzogenom unosu vitamina D u zimskom periodu u odnosu na letnji kada statusu vitamina D doprinosi endogena sinteza ovog vitamina. Žene starosti od 18 do 35 godina, pozvane su

da u estvuju u studiji validacije WRH-FFQ upitnika koriš enjem letaka i usmenog obaveštenja. Obaveštenja su poslata na tri najve a univerziteta u Srbiji, u Beogradu, Nišu i Novom Sadu, kako bi se dobio adekvatan uzorak na nivou države. Ukupno je u studiju pozvano 500 žena, od kojih je 450 potvrdilo u eš e i popunilo WRH-FFQ upitnik daju i informacije o svojim navikama u ishrani. Iz ove grupe, nasumi no je odabrano 10 % žena i uklju eno u dalji proces validacije, koji je obuhvatao tri ponovljena popunjavanja 24h-AI, uzimanje uzorka krvi za dalje analize i antropometrijsko merenje, na na in koji je opisan u poglavljima 3.3.2. i 3.7.1.

Unos vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{dan}$ ) procenjen je na osnovu podataka dobijenih primenom upitnika WRH-FFQ i 24h-AI, koriš enjem programa za procenu unosa DIET ASSESS <sup>(364)</sup> i elektronske srpske baze podataka o sastavu namirnica <sup>(363)</sup> (poglavljje 3.3.3). Sadržaj ukupnog 25(OH)D u krvi odre en je prethodno opisanom hemiluminiscentnom metodom (poglavljje 3.9.1) koriš enjem komercijalnog kita LIAISON® 25 OH Vitamin D Total (DiaSorin Inc, Stillwater, SAD). Koncentracija 25(OH)D u uzorcima plazme odre ena je kod onih žena ija je koli ina uzorka plazme bila dovoljna za izvo enje ove analize (n=23).

Da li je procena unosa vitamina D pomo u (WRH-FFQ) upitnika adekvatna ispitano je primenom metode trijada, pored klasi nog pristupa pore enja WRH-FFQ sa dve referentne metode <sup>(153)</sup>. Metoda trijade predstavlja trostruki pristup validaciji i detaljno je opisana u poglavljju 2.5.7. Korelacija izme u vrednosti unosa vitamina D procenjenog upitnicima i koncentracije biomarkera u krvi interpretirana je kao donja granica validnosti upitnika <sup>(152)</sup>. Primenom metode trijada, vrednosti koeficijenata korelacije dobijene pri ispitivanju korelacije podataka dobijenih primenom tri navedene metode koriš ene su za ra unanje koeficijenta validacije FFQ ( QI) uz pomo jedna ine

$$\dots QI = \sqrt{r_{QB} \cdot \frac{r_{QR}}{r_{BR}}}$$

U jedna ini QI predstavlja koeficijent validacije FFQ,  $r_{QB}$  - koeficijent korelacije izme u podataka FFQ i biomarkera,  $r_{BR}$  - koeficijent korelacije izme u biomarkera i podataka 24h-AI, dok je  $r_{QR}$  koeficijent korelacije izme u podataka FFQ i 24h-AI. Da



bi se naglasilo da su u pitanju Spearmanovi koeficijenti korelacije u prikazu rezultata označeni su sa  $\rho_{QB}$ ,  $\rho_{RB}$  i  $\rho_{QR}$ . Detalji o primeni metode trijada i obradi rezultata opisani su u poglavlju 3.13.

#### 4.1.1. Karakteristike u esnica u studiji

Upitnike WRH-FFQ su adekvatno popunile 422 (94%) žene, dok je 28 njih isključeno iz studije zbog nepotpunih odgovora. Pod-grupa 24h-AI od 44 u esnice formirana je od onih žena koje su popunile tri 24h-AI i WRH-FFQ upitnik. Porede i opšte karakteristike cele grupe žena ( $n=422$ ) sa pod-groupom 24h-AI ( $n=44$ ) nisu na one značajne razlike u godinama ( $23.3 \pm 2.4$  godina vs.  $25.5 \pm 2.2$  godina), visini ( $166.2 \pm 26.2$  cm vs.  $170.6 \pm 5.5$  cm), težini ( $58.3 \pm 12.8$  kg vs.  $61.5 \pm 6.4$  kg) i BMI ( $20.7 \pm 2.2$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $21.2 \pm 2.2$  kg/m<sup>2</sup>). Izmereni BMI ( $21.2 \pm 2.2$  kg/m<sup>2</sup>) kod žena u pod-grupi 24h-AI bio je vrlo sličan podacima za BMI ( $21.5 \pm 2.1$  kg/m<sup>2</sup>) koje su one prijavile popunjavaju i WRH-FFQ upitnik. Rezultati antropometrijskih merenja, krvnog pritiska i određenih biohemijskih parametara dati su u tabeli 6 za 24h-AI pod-grupu A ( $n=44$ ) i među njima za žene kojima je određen biomarker-status 25(OH)D u krvi ( $n=23$ , pod-grupa 24h-AI-B). Srednja vrednost koncentracije 25(OH)D bila je  $32.2 \pm 14.7$  nmol/L ( $n=23$ ). Među tim 3 žene su isključene zbog izlaganja UVB zračenju u solarijumu, pa je grupu u metodi trijada činilo 20 žena, za koju je srednja vrednost koncentracije 25(OH)D iznosila  $29.5 \pm 13.8$  nmol/L ( $n=20$ ). Najveći broj žena (90 %) kojima je određen status vitamina D u krvi imao je koncentraciju 25(OH)D ispod preporučenih 20 ng/mL (50 nmol/L), dok je 70 % imalo nivo 25(OH)D ispod 12 ng/mL (30 nmol/L).

Sve u esnice u studiji bile su studentkinje ili osobe sa visokim obrazovanjem. 15 % u esnica bile su pušači. Od 422 žene, 31.7 % nije konzumiralo alkohol na nedeljnom nivou, 47.3 % pilo je 2-3 šolje kafe dnevno, a čak 47.7 % pilo je 4-5 šolja kafe na dan. Trideset procenata u esnica nije se bavilo nikakvom dodatnom fizičkom aktivnošću, dok je preostalih 70 % upražnjavalo šetnje, vežbe, plivanje, vožnju bicikla itd. U pod-grupi žena A, njih 22.7 % nije prijavilo nikakvu fizičku aktivnost, a 77.3 % se na nedeljnom nivou bavilo aktivnošću u trajanju od 30 min do 3.5 sata.

**Tabela 6.** Opšte karakteristike podgrupa u esnica u studiji: u esnice koje su popunile tri ponovljena upitnika (24h-AI A) i kojima je odreivan sadržaj ukupnog 25(OH)D u krvi (24h-AI-B). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ( $\bar{X}$ )  $\pm$  standardna devijacija (SD).

	24h-AI A (n=44)		24h-AI-B (n=23)	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
Starost (godine)	25.0	2.2	26.1	2.4
<b>Antropometrijski parametri</b>				
BMI – indeks telesne mase	21.5	2.2	21.4	2.4
Visina (cm)	170.0	5.7	172.4	5.0
Telesna masa (kg)	62.1	6.6	63.5	6.7
Masti %	26.03	5.25	26.2	6.2
Masno tkivo (kg)	16.42	4.73	16.9	5.4
Obim struka (cm)	72.91	5.72	75.0	6.7
Obim kukova (cm)	100.30	4.94	100.4	6.2
<b>Krvni pritisak</b>				
Sistolni krvni pritisak (mm Hg)	112.58	12.21	112.5	13.3
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg)	72.63	7.10	72.1	7.3
Otkucaji srca (br. otkucaja/min)	74.30	10.68	75.4	11.3
<b>Biohemijski parametri</b>				
Hemoglobin	121.14	28.59	122.7	30.8
Glukoza	4.21	0.44	4.3	0.4
25(OH)D nmol/L	-	-	29.5	13.8

#### 4.1.2. Rezultati procene unosa vitamina D preko konzumiranih namirnica

Na osnovu podataka dobijenih pomo u WRH-FFQ i 24h-AI upitnika izdvojeno je 6 namirnica koje su bili najbogatiji izvori vitamina D kod ispitivanih žena (tabela 7). Pet od njih su masne ribe, uvezene na naše tržište sa izuzetkom potone pastrmke. Detaljan prikaz namirnica obuhvaenih WRH-FFQ upitnikom, koje su tako e registrovane pomo u tri ponovljena 24h-AI upitnika<sup>(385)</sup>, dat je u Prilogu 2. Nijedna od ispitane 422 žene nije konzumirala hranu obogaenu vitaminom D, a samo je 4.7 % uzimalo suplemente vitamina D u obliku multivitaminskih preparata. U pod-grupi 24h-AI A,

nijedna od 44 žene nije prijavila upotrebu bilo kakvih suplemenata, kao ni u 24h-AI-B podgrupi žena kojima je određen status vitamina D u krvi. Unos vitamina D kod 96% u esnica, nezavisno od upitnika kojim je unos procenjivan (WRH-FFQ ili 24h-AI) kretao se od 1.2 do 2.4  $\mu\text{g}/\text{dan}$  (Tabela 8), što je daleko ispod preporučenog EAR nivoa od 15  $\mu\text{g}/\text{dan}$ . Pored unosa vitamina D u tabeli 8 dat je dnevni unos hranljivih supstanci, kao i ukupan energetska unos procenjen na osnovu WRH-FFQ i 24h-AI upitnika.

**Tabela 7.** Namirnice, koje su prema podacima dobijenim iz WRH-FFQ i 24h-AI upitnika, najbolji izvora vitamina D

<b>WRH-FFQ</b>	<b>24h-AI</b>
Slatkovodne ribe (pastrmka)	Pastrmka (slatkovodne ribe)
Losos	Sardine
Tuna	Tuna
Sardine	Meso
Meso	Losos
Jaja	Jaja

**Tabela 7.** Procenjeni dnevni energetske unos, unos hranljivih supstanci i unos vitamina D pomo u WRH-FFQ i 24h-AI upitnika za pod-grupu A (n=44) i u okviru njih pod-grupu žena kojima je odre en status vitamina D (24h-AI-B, n=23). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ( $\bar{X}$ )  $\pm$  SD

	WRH-FFQ (n=422)		WRH-FFQ (n=44)		24h-AI A (n=44)		WRH-FFQ (n=23)		24h-AI-B (n=23)	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
UE (kJ) <sup>(386)</sup>	6988.5	2940.1	6442.1	1789.5	5978.1	1208.5	6577.2	1910.4	6075.6	1300.0
Ugljenihidrati (% UE)	51.2	13.0	54.1	15.3	42.3	7.5	52.8	14.2	42.1	9.6
Masti (% UE)	28.1	6.8	27.3	6.8	32.1	4.9	26.5	5.9	31.8	5.6
Proteini (% UE)	24.1	5.7	22.6	6.3	18.4	2.9	21.3	5.9	19.4	3.0
Vitamin D ( $\mu$ g)*	4.0	3.3	3.1	2.3	2.2	2.0	2.7	1.7	1.8	1.6
Vitamin D ( $\mu$ g/1000 kcal)*	2.4	1.6	2.0	1.6	1.5	1.3	1.7	1.2	1.2	1.0
Kalcijum <sup>(387)</sup>	682.7	6.2	645.4	224.5	538.4	260.8	634.7	232.5	628.8	297.3

UE- ukupni energetske unos; \*1  $\mu$ g vitamina D = 40 IU vitamina D

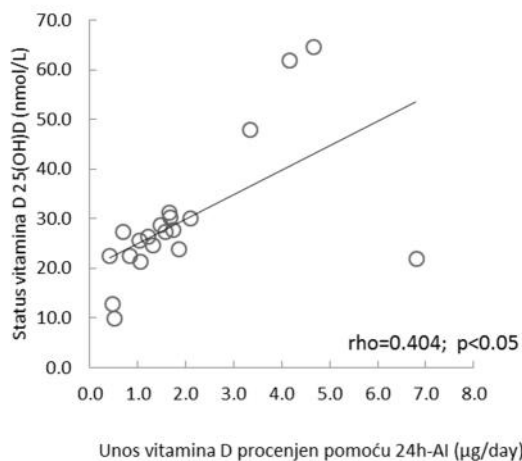
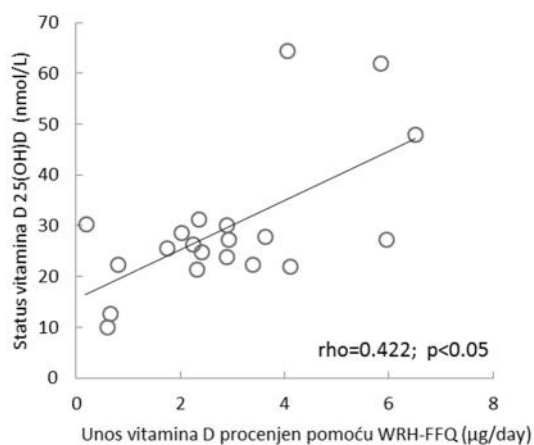
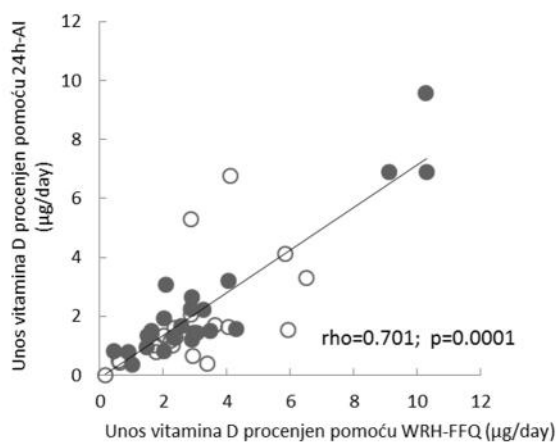
#### **4.1.3. Korelacije podataka o unosu i statusu vitamina D, dobijenih primenom tri metode**

Podaci o unosu vitamina D, dobijeni primenom dva upitnika (WRH-FFQ, 24h-AI) i odreivanjem sadržaja 25(OH)D u plazmi (24h-AI-B) međusobno su korelisani (Slika 12). Izračunati su Spearmanovi koeficijent korelacije sa osnovnim podacima za unos vitamina D, kao i sa podacima korigovanim za ukupan energetske unos (prema metodi predloženoj od strane Willett-a i saradnika<sup>(365)</sup>). Vrednosti koeficijenata, dobijene pri korelaciji osnovnih podataka ukupnog unosa vitamina D procenjenog pomoću WRH-FFQ i biomarkera, i korigovanih podataka i biomarkera, bile su gotovo jednake ( $r = 0.422$ ,  $r = 0.415$ , redom). Međutim, nivo značajnosti dobijen sa korigovanim podacima je bio značajno viši u odnosu na dobijen sa sirovim, nekorigovanim podacima ( $p = 0.001$ ;  $p = 0.032$ , redom). Između korigovanih podataka unosa vitamina D (dobijenih iz 24h-AI upitnika i koncentracije biomarkera) nije nađena statistički značajna korelacija ( $r = 0.346$ ,  $p = 0.067$ ), ali je značajna ukoliko se uzmu nekorigovani podaci unosa vitamina D ( $r = 0.404$ ,  $p = 0.039$ ).

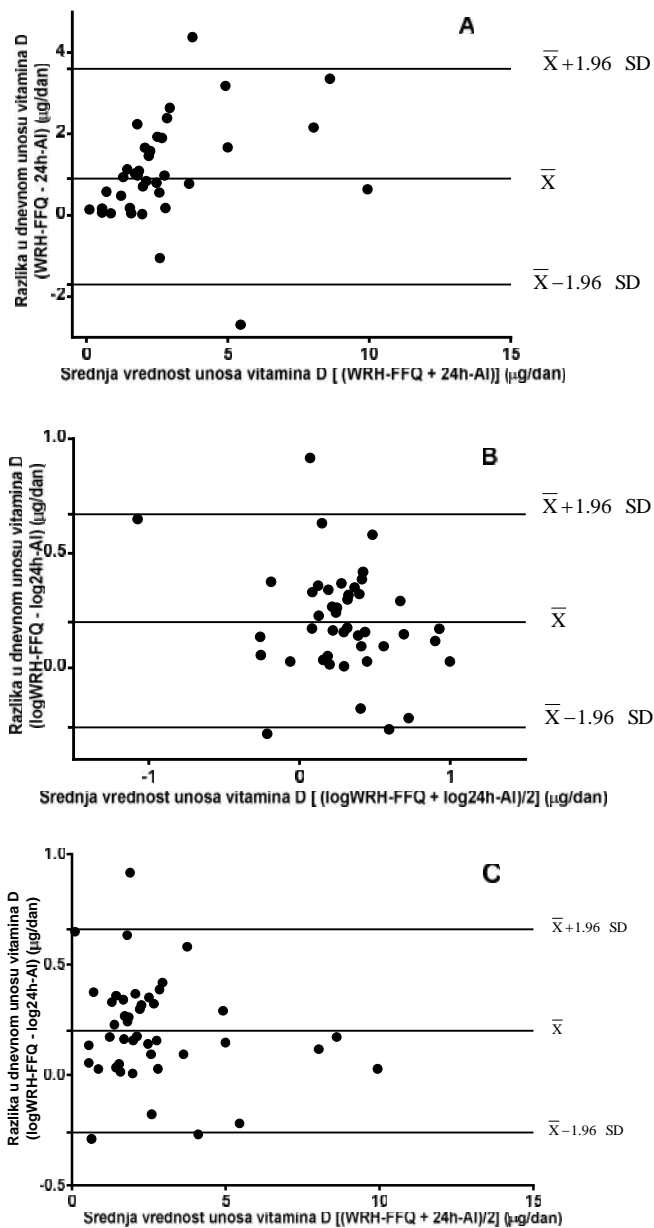
Slaganje između vrednosti unosa vitamina D procenjenih pomoću WRH-FFQ i 24h-AI upitnika prikazana je pomoću Bland-Altman-ovih plotova (Slika 13). Pored srednjih vrednosti unosa vitamina D, dobijenih primenom oba upitnika, i njihovih razlika (Slika 13A), prikazane su i njihove logaritamske vrednosti (Slika 13 B i C). Uočava se visoko slaganje između vrednosti unosa vitamina D dobijenih pomoću WRH-FFQ i upitnika o konzumiranju hrane u toku 24 h (24h-AI).

#### **4.1.4. Unakrsna klasifikacija unosa vitamina D u kvartile**

U cilju sagledavanja svojstva WRH-FFQ upitnika da omogući klasifikaciju učesnika studije u iste kvartile kao i 24h-AI i biomarker (ukupni 25(OH)D), unosi nutrijenata su podeljeni u kvartile (Tabela 9). Unakrsna klasifikacija je pokazala da je u proseku 80 % žena klasifikovano u isti ili približni kvartil pomoću WRH-FFQ i 24h-AI upitnika, kao i prema statusu vitamina D (25(OH)D), dok je manje od 20 % neadekvatno klasifikovano u suprotni kvartil (Tabela 9).



**Slika 12.** Korelacije između podataka unosa vitamina D, koji su procenjeni pomoću WRH-FFQ i 24h-AI upitnika (A); WRH-FFQ i biomarkera statusa vitamina D 25(OH)D (B) i 24h-AI upitnika i biomarkera statusa vitamina D 25(OH)D (C). • – u esnicima u studijama kojima nije određen status vitamina D; o – u esnicima u studijama kojima je određen status vitamina D



**Slika 13.** Bland–Altman-ovi plotovi za ispitivanje slaganja izme u vrednosti unosa vitamin D procenjenih upitnikom WRH-FFQ i srednjih vrednosti podataka dobijenih pomo u tri ponovljena 24h-AI upitnika, kod žena u reproduktivnom dobu ( $n = 44$ ). Razlika izme u prose nog unosa vitamina D procenjenog sa oba upitnika je prikazana na y osi, a  $\bar{x}$  srednja vrednost unosa procenjenog sa oba upitnika na x osi za svaku u esnicu studije;----- Srednja vrednost razlika ( $\bar{x}$ ) ; --- granice slaganja od 95 %.

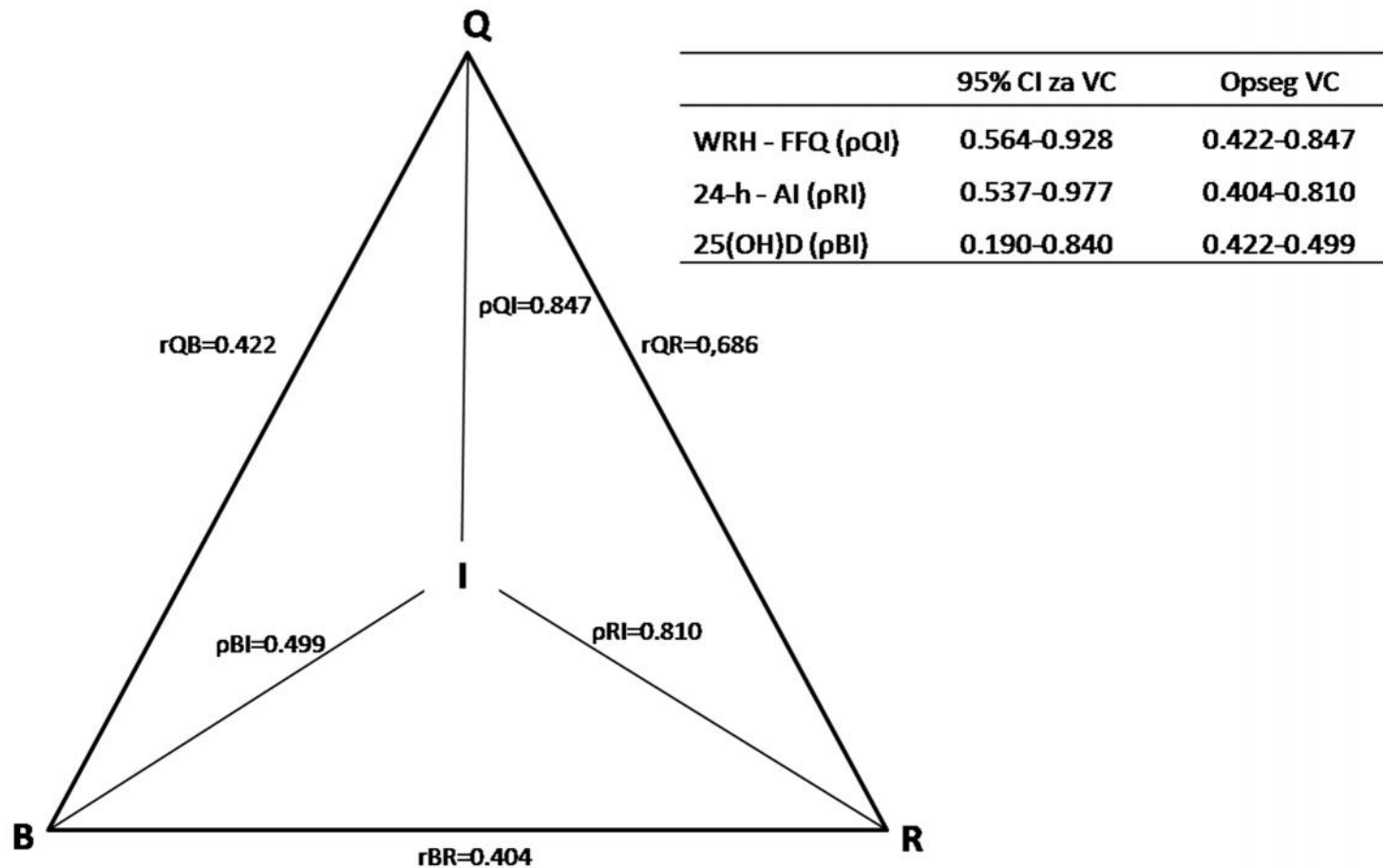
**Tabela 9.** Unakrsna klasifikacija u kvartile (%) unosa vitamina D procenjenog pomo u WRH-FFQ upitnika i referentnih metoda za validaciju (24h-AI upitnika i biomarkera, sadržaja 25(OH)D u plazmi)

<b>Unos vitamin D procenjen pomo u WRH-FFQ upitnika</b>	<b>Isti kvartil</b>	<b>Isti ili približni kvartil</b>	<b>Suprotni kvartil</b>
24h-AI	65	80	20
25(OH)D	50	80	20

#### **4.1.5. Validacija WRH-FFQ upitnika metodom trijada**

Prema modelu trijada, najpre su izra unati Spearmanovi koeficijenti korelacije ( $\rho_{QB}$ ,  $\rho_{RB}$ ,  $\rho_{QR}$ ) izme u podataka dobijenih svakom od tri primenjene metode: unosa vitamina D procenjenog pomo u WRH-FFQ (Q), srednje vrednosti unosa vitamina D procenjene pomo u tri ponovljena popunjavanja 24h-AI upitnika (R) i koncentracije 25(OH)D u plazmi - biomarkera statusa vitamina D (B). Koeficijenti korelacije ( $\rho_{QB}$ ,  $\rho_{RB}$ ,  $\rho_{QR}$ ) koriš eni su za izra unavanje koeficijenata validacije WRH-FFQ upitnika (VC: QI, BI, RI) izme u takozvanog 'stvarnog' unosa vitamina D (I) i procenjenih unosa vitamina D. Vrednosti koeficijenata validacije QI i RI (za WRH-FFQ i 24h-AI upitnik, 0.847 i 0.810, redom) su ve e od vrednosti BI (0.499), koeficijenta validacije biomarkera (Slika 14). Me utim, koeficijenti validacije dobijeni za WRH-FFQ su bili ve i u odnosu na koeficijente dobijene za druge dve metode (24h-AI i biomarker), dok su gornje granice 95 % intervala pouzdanosti (CI) za koeficijente validacije bile manje od jedan.





**Slika 14.** Metodom trijada izra unati koeficijenti korelacije ( $r_{QB}$ ,  $r_{RB}$ ,  $r_{QR}$ ) izme u unosa vitamina D procenjenog pomo u WRH-FFQ (Q), srednje vrednosti unosa vitamina D procenjenog pomo u tri 24h-AI upitnika (R) i koncentracije 25(OH)D biomarkera statusa vitamina D (B), kao i koeficijenti validacije (VC: QI, BI, RI) izme u stvarnog unosa vitamina D (I) i procenjenih unosa vitamina D pomo u upitnika. CI-Interval pouzdanosti.

## 4.2. Ispitivanje unosa i statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i kod novorođenadi

U Srbiji, zemlji gde namirnice nisu obogaćene vitaminom D, prepoznata je potreba da se ispita unos i status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje, kao i da se odredi udeo epimera u ukupnom 25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na zdravstvene ishode majki i novorođenadi. Postavljena je hipoteza da trudnice sa preeklampsijom i njihova novorođenad imaju niži status vitamina D u odnosu na zdrave žene u trudnoći i bez komplikacija i njihovu novorođenad.

U cilju ispitivanja postavljene hipoteze, sprovedena je studija, od januara do aprila 2011. godine. Učesnice ove studije bile su trudnice iz Ginekološko-akušerske klinike Kliničkog centra Srbije, u koju se upućuju najviše i broj trudnica sa preeklampsijom iz cele Srbije. Tokom perioda od tri meseca u studiju su uključene sve trudnice sa dijagnozom preeklampsije (n=30) što predstavlja okvirno 75 % svih slučajeva preeklampsije koji se na godišnjem nivou leče u ovoj bolnici<sup>(388)</sup>. Odmah nakon uključivanja trudnice sa preeklampsijom, radi uparivanja u odnosu 1:1, prva sledeća trudnica pred porođajem, približnih godina, u normotenzivnoj fiziološkoj trudnoći, pozvana je da učestvuje u studiji. Od pozvanih zdravih trudnica 91 % pristalo je da učestvuje u studiji (kontrolna grupa). Dakle, u studiju je uključeno ukupno 60 trudnica i njihovih novorođenadi, od kojih je polovina trudnica imala dijagnozu preeklampsije (PE grupa).

Svim trudnicama uzet je uzorak venske krvi neposredno pre porođaja, dok je na porođaju uzet uzorak krvi iz pupčane vrpce. U ovim uzorcima određena je koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 25-(OH)D<sub>2</sub> pomoću LC/MS/MS metode i u krvi trudnica analiziran je i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>(387)</sup>. Dodatno su u uzorcima krvi atomskom apsorpcionom spektrometrijom analizirane koncentracije jona kalcijuma, magnezijuma, gvožđa, bakra i selena. Neposredno pre ili nakon porođaja sve trudnice su popunile validirani upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica (WRH-FFQ), kojim se procenjivao unos vitamina D iz namirnica i suplemenata u periodu od mesec dana pre porođaja. Detalji o procesu regrutacije i kriterijumima za uključivanja ispitanika, sakupljanju uzoraka i primenjenim analitičkim metodama opisani su u poglavlju 3.7.2.

#### **4.2.1. Karakteristike trudnica i novorođenadi**

Između trudnica sa preeklampsijom (PE grupa) i bez nje (kontrolna grupa) nije bilo značajne razlike u godinama, kao što je prikazano u Tabeli 10. Međutim, BMI pre trudnoće i na porođaju bili su značajno veći kod trudnica sa preeklampsijom u odnosu na kontrolnu grupu, dok je prirast telesne mase u toku trudnoće bio približan u obe grupe (Tabela 10). Trudnice sa preeklampsijom su se dominantno porađale carskim rezom i to u ranijem gestacionom dobu u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 10) što je rezultiralo značajnim razlikama u svim antropometrijskim parametrima između PE i kontrolne grupe novorođenadi (Tabela 11). APGAR skor vrednosti su takođe bile niže u grupi novorođenadi koje su majke imale preeklampsiju. Dodatno, z-skor vrednosti za težinu, korigovane za gestacionu starost i pol, ukazuju da su novorođenad iz grupe PE bila značajno manja u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 11).

#### **4.2.2. Procena dijetarnog unosa trudnica**

Trudnice PE i kontrolne grupe imale su skoro jednake srednje vrednosti unosa vitamina D iz namirnica i suplemenata kao što je prikazano u Tabli 10. Unos vitamina D, procenjen pomoću WHR-FFQ, bio je ispod preporučenih 400 IU/dan (EAR) kod 77 % ispitanih trudnica (PE grupa 86.5%, n=26/30; kontrolna grupa 67 %, n=20/30). Od svih ispitanih trudnica samo jedna žena (3.3%) je dostigla vrednost preporučenog dnevnog unosa (RDA) vitamina D od 600 IU/dan usled upotrebe suplemenata. Samo 13 % trudnica sa preeklampsijom i 33 % trudnica iz kontrolne grupe dostiglo je preporučenju EAR vrednost od 400 IU/dan. Nijedna od 60 ispitanih trudnica nije konzumirala namirnice obogaćene vitaminom D koje su dostupne na tržištu i obuhvaćene upitnikom (Imlek AD mleko ili uvozne proizvode). Suplemente tokom trudnoće nije koristilo 12 (36 %) trudnica sa preeklampsijom i 11 (33 %) trudnica kontrolne grupe. Od trudnica koje su koristile suplemente, najveći broj je uzimao 250 IU vitamina D u formi multivitaminskih preparata za trudnice (MamaVit®, PharmaSwiss ili Centrum Materna®, Wyeth).

**Tabela 10.** Karakteristike trudnica. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ( $\bar{X}$ )  $\pm$  SD.

	PE grupa (n=30)		Kontrolna grupa (n=30)		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
Starost (godine)	28.6	4.9	28.4	4.5	0.7379
<b>Antropometrijski parametri</b>					
BMI pre trudno e (kg/m <sup>2</sup> )	23.7	4.5	21.4	2.6	0.0258
Pre trudno e					
Slabo uhranjene (n (%))	0		3 (10)		
Normalno uhranjene (n (%))	22 (73.3)		21 (70)		0.735
Preterano uhranjene (n (%))	5 (16.7)		6 (20)		
Gojazne (n (%))	3 (10)		0		
Prirast težine u trudno i (kg)	18.5	8.7	15.8	7	0.2577
BMI na poro aju (kg/m <sup>2</sup> )	30.5	6.8	27.4	3.8	0.0391
<b>Unos vitamina D</b>					
Ukupan unos (IU/day)	292.9	135.2	313.7	183.8	0.3658
Unos suplementima (IU/day)	151.7	148.5	200	151.9	0.2345
Unos iz namirnica (IU/day)	146.2	85.7	133.7	70.7	0.6351
<b>Parametri povezani sa trudno om</b>					
Gestaciona starost na poro aju (nedelje)	36.3	2.1	37.7	0.5	0.029
Tip poro aja					
Carskim rezom (n (%))	21 (70%)		1 (3.3%)		<0.0001
Vaginalni (n (%))	9 (30%)		29 (96.7%)		<0.0001
Max sistolni krvni pritisak (mm Hg)	167	18	122	12	<0.0001
Max dijastolni krvni pritisak (mmHg)	109	11	78	8	<0.0001
<b>Biohemijski parametri</b>					
Hemoglobin (g/L)	110	15	121	13	0.0084
Glukoza (mmol/L)	4.3	0.8	4.8	0.7	0.0257
RBC (x10e12/L)	3.8	0.5	4.2	0.5	0.0088
Le (x10e9/L)	15	6	13	3	0.268
PL (x10e9/L)	226	87	210	60	0.3703
CRP (mg/L)	43	38	7	7	<.0001

RBC- eritrociti; Le- lekociti; PL- trombociti; CRP- C-reaktivni protein.

**Tabela 11.** Karakteristike novorođenadi na porođaju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ( $\bar{X}$ ) ± standardna devijacija (SD).

	PE grupa (n=30)		Kontrolna grupa (n=30)		P
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
<b>Gestaciona starost (nedelje)</b>	36.29	2.12	37.71	0.54	0.029
Apgar skor 1 min	7.2	1.5	8.9	0.2	<0.0001
Apgar skor 5 min	7.9	1.3	9.0	0.0	<0.0001
Muškog pola (n (%))	13(43)		18(60)		
<b>Antropometrijski parametri</b>					
Obim glave (cm)	33.3	2.2	34.8	1.0	0.0007
Dužina (cm)	47.8	4.1	50.9	1.7	0.0007
Telesna masa (g)	2644	826	3367	360	<0.0001
z-skor težina-za-uzrast <sup>1</sup>	-0.50	1.19	0.37	0.67	<0.0001

<sup>1</sup> Korigovan za gestacionu starost i pol novorođeneta<sup>(389)</sup>

Dnevni energetske unos i unos hranljivih supstanci procenjeni su pomoću WHR-FFQ upitnika, kao i unos porcija hrane na dnevnom nivou (Tabela 12). Različite navike u ishrani trudnica sa preeklampsijom u odnosu na kontrolnu grupu ogledale su se u povećanom unosu brašna, žitarica, mesa i mesnih prerađevina, čokolade i količine ulja i masti korišćenih za pripremanje hrane (Tabela 9). Sa druge strane, trudnice sa preeklampsijom nisu unosile preporučeni broj porcija voća i povrća, kao i mleka i mlečnih proizvoda na dnevnom nivou (Tabela 12). Pomoću WHR-FFQ upitnika identifikovano je pet namirnica koje su bile najbogatiji izvori vitamina D kod ispitivanih trudnica u poslednjih 30 dana pre porođaja: meso, jaja i masne ribe, od kojih je pastrmka bila domaća, dok ostale ribe (tuna i sardine) bile uvežene na naše tržište. Sve trudnice, bez obzira na grupu, su na dnevnom nivou u proseku konzumirale 250 mL kafe (domaća kafa, espresso i instant kafa) i 250 mL čaja i to najčešće čaj od kamilice ili nane, dok je upotreba crnog i zelenog čaja bila retka. Dodatno je kod 55 % trudnica identifikovana upotreba gaziranih pića od okvirno 250 mL na dan, a najčešće konzumirano gazirano piće bila je Coca-cola®. Sve trudnice su na dnevnom nivou konzumirale manje od 1.5 L vode.

**Table 12.** Procenjeni unos hranljivih supstanci kod žena sa preeklampsijom i bez nje, za period od 30 dana pre porođaja.

<b>Dnevni unos <sup>a</sup></b>	<b>Preporuke</b>	<b>PE grupa (n=30)</b>	<b>Kontrolna grupa (n=30)</b>	<b>P</b>
<b>Makronutrienti</b>	<b>Procenjene prosečne potrebe<sup>(390)</sup></b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	
Energetski unos (KJ)	8000	8719 ± 1690	7837 ± 1703	0.0901
Proteini (g)	71	92 ± 24	77 ± 22	0.0136
Ukupne masti (g)	ND	67 ± 27	59 ± 23	0.3120
Ugljeni hidrati (g)	135	261 ± 56	258 ± 76	0.3718
<b>Grupe namirnica <sup>b</sup></b>	<b>Vodi za dnevne porcije hrane<sup>(368)</sup></b>	<b>Porcija na dan</b>	<b>Porcija na dan</b>	
Voće i povrće	7 - 8	6	9	
Žitarice	6 - 7	16.5	15.5	
Mleko i mlečni proizvodi ili zamene	2	1.2	1.3	
Meso i prerađevine	2	4.1	3.5	
Povrće-porcije		2.2	2.8	
Voće-porcije		3.8	6.2	
<b>Ostale namirnice</b>				
okolada (g/day)	ND	40	27	
Meso (g/day)	75	192	151	
Riba (g/day)	75	44	45	
Ulja i masti (ml/day)	30 - 45	194	182	

<sup>a</sup> Dnevni unos je procenjen pomoću validiranog upitnika WRH-FFQ za period od 30 dana <sup>(391)</sup>

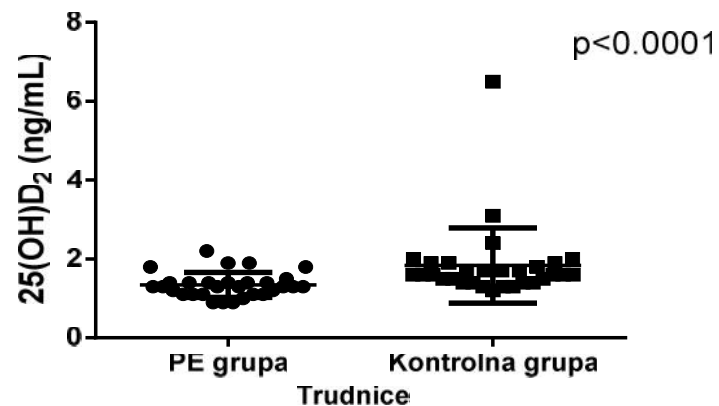
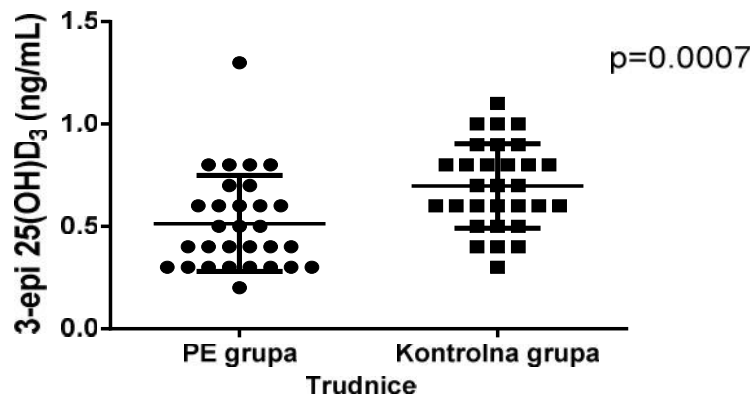
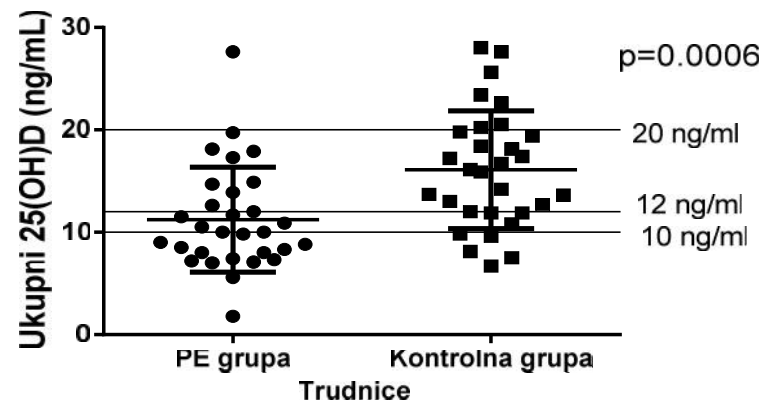
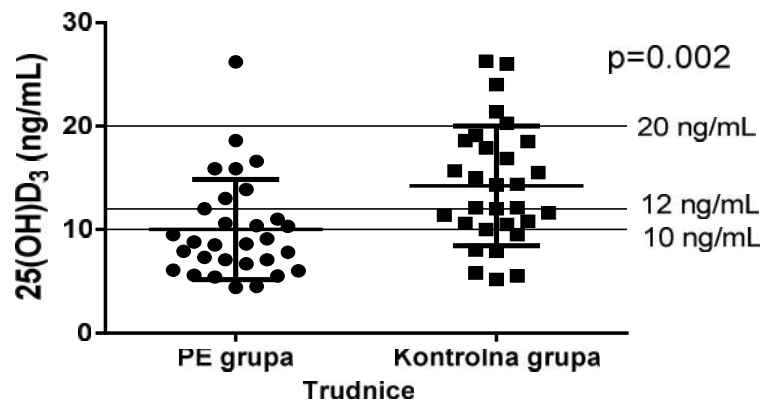
<sup>b</sup> Prema preporukama vodiča za dnevne porcije hrane (eng. Food Guide Servings) u trudnoći treba na dnevnom nivou uključiti 2 do 3 dodatne porcije bilo koje od četiri grupe namirnica

### 4.2.3. Status vitamina D kod trudnica i novorođenadi

Iako je srednja vrednost procenjenog unosa vitamina D bila vrlo slična u obe grupe ispitivanih trudnica (PE grupa: 292.9; kontrolna grupa: 313.7 IU/dan, Tabela 10), kao i koncentracija jona kalcijuma u krvi (PE grupa:  $99.1 \pm 8.9$ ; kontrolna grupa:  $95.8 \pm 21.6$  mg/L;  $p=0.743$ ), trudnice sa preeklampsijom imale su značajno niže koncentracije ukupnog 25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>2</sub> and 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi (Slika 15). Sa druge strane, koncentracija 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (PE grupa:  $0.8 \pm 0.6$ ; kontrolna grupa:  $0.8 \pm 0.4$  ng/mL;  $p=0.2381$ ) i odnos 25(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (PE grupa:  $16.8 \pm 6.6$ ; kontrolna grupa:  $18.7 \pm 3.7$ ;  $p=0.2944$ ) nisu se razlikovale kod obe grupe trudnica. Određivanjem aktivnog metabolita vitamina D, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D u krvi utvrđeno je značajno manja koncentracija kod trudnica sa preeklampsijom (PE grupa:  $56.5 \pm 26.6$ ; kontrolna grupa:  $81.0 \pm 25.7$  pg/mL;  $p=0.0178$ ).

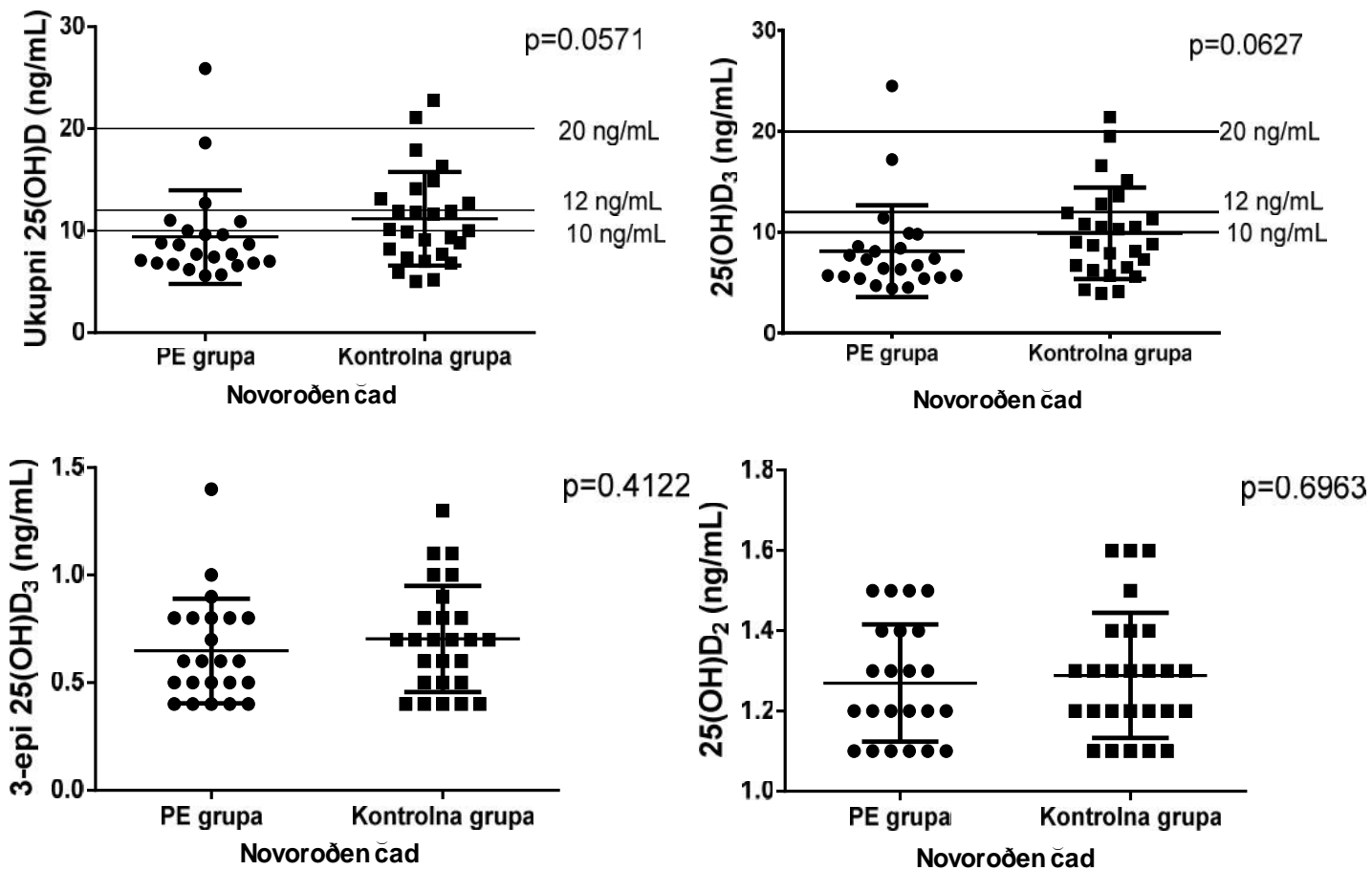
Suprotno od majki, kod novorođenadi nije bilo značajne razlike između PE i kontrolne grupe u koncentraciji ukupnog 25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>2</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (Slika 16), 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (PE grupa:  $0.5 \pm 0.3$ ; kontrolna grupa:  $0.5 \pm 0.2$  ng/mL;  $p=0.8295$ ) ili u odnosu 25(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (PE grupa:  $16.8 \pm 4.5$ ; kontrolna grupa:  $19.9 \pm 4.2$ ;  $p=0.0935$ ). Međutim, između dve grupe novorođenadi uočeno je vrlo sličan trend kao i kod njihovih majki (Slike 15 i 16). Takođe je kod novorođenadi koje su majke imale preeklampsiju primećeno povećan sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, izražen kao procenat od ukupnog 25(OH)D<sub>3</sub> (PE grupa:  $7.9 \pm 1.1$ ; kontrolna grupa:  $7.0 \pm 1.4$  %;  $p=0.0054$ ).

Kod 97 % trudnica sa preeklampsijom i 77 % trudnica iz kontrolne grupe, koncentracije ukupnog 25(OH)D u plazmi bile su ispod 20 ng/mL (Slika 15), odnosno ispod koncentracije koja je prema preporukama IOM potrebna za očuvanje zdravlja kostiju. Vrednosti ispod 12 ng/ml, koje se povezuju sa nedostatkom vitamina D, uočene su kod 67 % trudnica sa preeklampsijom i 27 % trudnica u kontrolnoj grupi. Teška deficijencija vitamina D, sa vrednostima ukupnog 25(OH)D u plazmi <10 ng/ml, bila je prisutna kod 47 % trudnica sa preeklampsijom i 17 % žena u kontrolnoj grupi (Slika 15).



**Slika 15.** Status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom (PE grupa; n=30) i bez nje (kontrolna grupa; n=30). Značajnost je ispitana pomoću Man-Whitney testa. -- 20 ng/ml - koncentracija vitamina D u krvi preporučena za održavanje zdravlja kostiju; -- koncentracije ispod 12 ng/ml povezane su sa deficijencijom vitamina D; -- koncentracije ispod 10 ng/ml povezane su sa teškom deficijencijom vitamina D.





**Slika 16.** Status vitamina D kod novorođenadi majki sa preeklampsijom (PE grupa; n=23) i bez nje (kontrolna grupa; n =26). Značajnost je ispitana pomoću Man-Whitney testa. -- 20 ng/ml koncentracija vitamina D u krvi preporučena za održavanje zdravlja kostiju; -- koncentracije ispod 12 ng/ml povezane su sa deficijencijom vitamina D; -- koncentracije ispod 10 ng/ml povezane su sa teškom deficijencijom vitamina D.

Ukupno 94 % svih ispitanih novorođenadi imalo je koncentraciju ukupnog 25(OH)D u krvi ispod 20 ng/mL, 80 % njih je imalo nedostatak vitamina D (<12 ng/mL) dok je 59 % svih novorođenadi imalo tešku deficijenciju vitamina D (<10 ng/mL) (Slika 16).

Rezultati određivanja koncentracije jona metala u plazmi trudnica i njihovih novorođenadi date su u Tabeli 13. Kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje nije bilo značajne razlike u koncentraciji jona Ca, Mg, Cu, Zn i Fe, ali je koncentracija Se bila povećana u PE grupi. Suprotno od trudnica, koncentracija Ca je bila manja kod novorođenadi koje su majke imale preeklampsiju.

**Tabela 13.** Koncentracije jona metala u plazmi određene atomskom apsorpcionom spektroskopijom.

	PE grupa (n=21)		Kontrolna grupa (n=20)		P vrednost
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
<b>Trudnice</b>					
Kalcijum (mg/L)	99.1	8.9	95.7	22.6	0.7017
Magnezijum (mg/L)*	20.5	5.4	18.5	4.6	0.7226
Gvožđe (mg/L)	2.2	1.6	2.2	1.7	0.8923
Selen (µg/L)	63.0	21.4	46.9	12.3	0.0093
Cink (mg/L)	0.6	0.2	0.7	0.2	0.1021
Bakar (mg/L)	1.9	0.4	1.7	0.6	0.5418
<b>Novorođenad</b>					
Kalcijum (mg/L)	97.6	15.9	116.6	19.4	0.0012
Magnezijum (mg/L)	22.2	7.7	18.7	3.4	0.1073
Gvožđe (mg/L)	4.4	4.4	2.8	1.3	0.4330
Selen (µg/L)	48.8	16.5	45.2	14.7	0.4573
Cink (mg/L)	1.1	0.2	1.1	0.3	0.8672
Bakar (mg/L)	0.4	0.1	0.4	0.5	0.0524

\*Trudnice sa preeklampsijom primale su terapiju sa 20 % MgSO<sub>4</sub> u toku 24 h pre porođaja (10 mL i.m. na 8 h)

Rezultati regresione analize ukazuju da je koncentracija jona Mg u plazmi bila u direktnoj korelaciji sa koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) u grupi trudnica sa preeklampsijom, i da se 75% varijacija CRP moglo povezati sa koncentracijama Ca, Mg, Fe, Se, Cu i Zn (adjusted R Square=0.750), što nije bio slučaj sa 25(OH)D<sub>3</sub> i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D. Slabe korelacije na one su između u karakteristika trudnica (sistolni i dijastolni krvni pritisak, nedelja gestacije i BMI na porođaju) i koncentracija ukupnog 25(OH)D i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (Tabela 14). Korelacijom karakteristika novorođenadi i procentnog udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom 25(OH)D<sub>3</sub> dobijene su sledeće vrednosti Spearman-ovih rang-koefficientata korelacije: za APGARskor u prvom i petom minutu  $r = -0.3526$  (95% CI: -0.5845 do -0.06743;  $p = 0.014$ ) i  $r = -0.3004$  (95% CI: -0.5448 do -0.009116;  $p = 0.038$ ), a za tip porođaja  $r = -0.3856$  (95% CI: -0.6091 do -0.1053;  $p = 0.007$ ).

Popunjavaju u upitnik WRH-FFQ o životnim navikama, nijedna trudnica nije prijavila da konzumira cigarete, što je i bio jedan od kriterijuma za uključivanje u studiju. Takođe, 13 trudnica je prijavilo da na nedeljnom nivou konzumira jednu čašu vina (PE grupa: 6; Kontrolna grupa: 7). Samo jedna trudnica imala je umerenu fizičku aktivnost u poslednjem mesecu trudnoće (pilates za trudnice dok su tri trudnice išle u šetnju duže od 30 minuta na dnevnom nivou). Porede i grupe trudnica sa preeklampsijom i bez nje nisu primećene značajne razlike u procentu udatih žena (PE grupa: 100%; kontrolna grupa: 92%), žena koje su živele u gradskoj sredini (PE grupa: 90%; kontrolna grupa: 93%) ili u stepenu obrazovanja u smislu završene srednje škole (PE grupa: 57%; kontrolna grupa: 50%) i fakulteta (PE grupa: 43%; kontrolna grupa: 50%).

Tabela14. Korelacije ukupnog vitamina D, metabolita 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> sa karakteristikama trudnica

<b>Vitamin D</b>	<b>Karakteristike majke</b>	<b>Spearman-ov koeficijent korelacije</b>	<b>95 % interval pouzdanosti</b>	<b>P vrednost</b>
<b>3-epi-25(OH)D<sub>3</sub></b> (ng/mL)	BMI na poro aju	-0.2178	-0.4590 - 0.0532	0.1036
	gestaciona nedelja	0.2828	0.0210 - 0.5083	0.0300
	max dijastolni KP	-0.4186	-0.6143 - -0.1745	0.0010
	max sistolni KP	-0.4704	-0.6529 - -0.2363	0.0002
	tip poro aja	0.3027	0.0427 - 0.5242	0.0198
<b>Ukupni 25(OH)D</b> (ng/mL)	BMI-na poro aju	-0.2643	-0.4971 - 0.0039	0.0469
	gestaciona nedelja	0.2593	-0.0044 - 0.4892	0.0474
	max dijastolni KP	-0.3857	-0.5892 - -0.1362	0.0026
	max sistolni KP	-0.4429	-0.6325 - -0.2032	0.0004
	tip poro aja	0.3273	0.0699 - 0.5438	0.0114

KP- krvni pritisak

### **4.3 Preliminarno ispitivanje statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorođenadi rođeni pretermeno**

Preliminarno ispitivanje statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorođenadi sprovedena je u Kanadi, zemlji u kojoj se namirnice obogaćuju vitaminom D. Ova preliminarna studija naslanja se na studiju, koja je opisana u poglavlju 4.2. i koja je sprovedena sa trudnicama sa preeklampsijom i bez nje i njihovim novorođenadima u Srbiji, u okviru koje su detaljno objašnjene potrebe za ovakvim istraživanjima kao i njihova naučna opravdanost. Ova preliminarna studija je uključila mali broj učesnika i su uzorci sakupljeni u okviru nacionalnog projekta gde je ispitivan uticaj vitamina D na rast i razvoj pretermeno rođenih novorođenadi. U preliminarnu studiju uključena su novorođenadima koje su majke imale preeklampsiju (PE grupa) i uparena su sa novorođenadima rođenim iz fizioloških normotenzivnih trudnoća (kontrolna grupa) u odnosu 1:2. Dakle, u ovu studiju uključena su pretermeno rođena novorođenad (PE grupa=8, kontrolna grupa=16) i njihove majke. Kod pretermeno rođenih novorođenadi, dovoljna količina uzorka za sve analize dobijena je od 19 novorođenadi (PE grupa=7, kontrola=12), pa su stoga samo za ovu novorođenadi i njihove majke rezultati obrađeni i prikazani. Sva pretermeno rođena novorođenad bila su rođena pre 32 nedelje gestacije, bez kongenitalnih malformacija i zadržana na bolničkom lečenju gde su prva pet nedelja života. Novorođenadima je uzet uzorak venske krvi u prvoj nedelji života, dok je majkama uzorak krvi uzet na porođaju. Nakon prvih 5 nedelja života svim pretermeno rođenim novorođenadima snimljene su kosti pomoću DXA aparata i ponovo uzet uzorak krvi (približno u vremenu punog termina). U svim uzorcima plazme novorođenadi i njihovih majki određena je koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$ ,  $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  i  $25-(\text{OH})\text{D}_2$  pomoću LC-MS/MS metode. Antropometrijski i biohemijski parametri preuzeti su iz medicinskih kartona majki i novorođenadi.

#### **4.3.1. Karakteristike majki**

Između grupa majki sa preeklampsijom i bez nje nije bilo razlika u starosnom dobu, kao ni u BMI i prirastu telesne težine u toku trudnoće (Tabela 15). Dominantan tip porođaja majki sa preeklampsijom bio je carski rez. Majke u obe grupe nisu koristile suplemente vitamina

D niti multivitaminske preparate za trudnice u poslednjih mesec dana pre poro aja (Tabela 15), me utim nije bilo mogu e proceniti njihov dijetarni unos vitamina iz suplemenata i namirnica, jer nisu popunjavale upitnik o u estalosti konzumiranja namirnica. Podatak, koji je bio zabeležen u njihovim medicinskim kartonima, odnosio se na uzimanje suplemenata vitamina D i/ili multivitamin periodu od mesec dana pre poro aja.

#### **4.3.2. Status vitamina D kod majki**

Kod trudnica, koje su u estvovala u ovoj studiji, zna ajno niža koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}_2$  zabeležena je kod majki sa preeklampsijom dok je njihov odnos  $25(\text{OH})\text{D}_3 : 24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  i procentni udeo 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  u ukupnoj koncentraciji  $25(\text{OH})\text{D}_3$  bio viši u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 15). Me utim, nije bilo zna ajnih razlika u ukupnoj koncentraciji  $25(\text{OH})\text{D}$ ,  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  izme u grupa trudnica sa preeklampsijom i bez nje.

#### **4.3.3. Karakteristike novoro en ad ro**

Novoro en ad ro ena pre termina, ije su majke imale preeklampsiju, nisu se zna ajno razlikovala od kontrolne grupe u pogledu gestacione starosti, vrednostima za apgar skor u prvom i petom minutu, težini placente, kao ni u antropometrijskim parametrima na ro enju (dužina, telesna masa i obim glave) (Tabela 16).

#### **4.3.4. Status vitamina D kod novoro en ad ro**

Koncentracije analiziranih metabolita vitamina D nisu se zna ajno razlikovale izme u grupa novoro en ad ro enih od strane majki sa preeklampsijom i bez nje (Tabela 16).

**Tabela 15.** Karakteristike majki sa preeklampsijom i bez nje na poro aju. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Razlike izme u PE grupe i kontrolne grupe testirane su pomo u Mann-Whitney testa

	<b>PE grupa (n=7)</b>	<b>Kontrolna grupa (n=12)</b>	<b>p vrednost</b>
<b>Karakteristike na poro aju</b>			
Godine starosti	26.4 $\pm$ 7.1	23.5 $\pm$ 5.1	0.757
BMI na poro aju	28.9 $\pm$ 4.1	27.2 $\pm$ 5.2	0.214
Prirast telesne mase u trudno i (kg)	7.9 $\pm$ 1.3	8.2 $\pm$ 1.2	0.118
Tip poro aja – carski rez (n (%))	6(86)	6(50)	
Pušenje (n (%))	3 (43)	5 (42)	
Unos suplemenata vitamina D (n (%))	0 (0)	0 (0)	
<b>Biohemijski parametri</b>			
25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	12.20 $\pm$ 6.52	15.35 $\pm$ 8.48	0.415
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	0.70 $\pm$ 0.42	0.62 $\pm$ 0.35	0.705
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (% ukupnog 25(OH)D <sub>3</sub> )	5.00 $\pm$ 0.86	3.98 $\pm$ 0.65	0.005
25(OH)D <sub>2</sub> (ng/mL)	0.90 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.22	0.009
Ukupni 25(OH)D (ng/mL)	13.10 $\pm$ 6.58	16.03 $\pm$ 8.83	0.514
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)	1.10 $\pm$ 0.61	1.04 $\pm$ 0.74	0.893
25(OH)D <sub>3</sub> : 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> odnos	12.0 $\pm$ 2.17	16.65 $\pm$ 4.84	0.012

**Tabela 16.** Karakteristike novoro enadi, prevremeno ro enih od strane majki sa preeklampsijom i bez nje, utvr ene odmah po ro enju. Ukupan sadržaj vitamina D i njegovih metabolita odre en je na kraju prve nedelje života. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Zna ajnost razlika izme u PE grupe i kontrolne grupe testirana je pomo u Mann-Whitney testa

	<b>PE grupa (n=7)</b>	<b>Kontrolna grupa (n=12)</b>	<b>p vrednost</b>
<b>Karakteristike na poro aju</b>			
Gestaciona starost (nedelje)	30.0 $\pm$ 1.8	28.4 $\pm$ 0.9	0.063
Apgar skor 1 min	4.7 $\pm$ 3.3	6.7 $\pm$ 2.5	0.156
Apgar skor 5 min	7.9 $\pm$ 1.3	8.2 $\pm$ 1.2	0.537
Muškog pola (n(%))	3(43)	7(58)	
<b>Antropometrijski parametri</b>			
Obim glave (cm)	26.7 $\pm$ 2.1	26.3 $\pm$ 0.6	0.460
Dužina (cm)	35.8 $\pm$ 3.8	38.6 $\pm$ 2.3	0.299
Telesna masa (g)	1097 $\pm$ 36	1172 $\pm$ 210	0.496
Težina placente (g)	281 $\pm$ 63	370 $\pm$ 101	0.052
<b>Metaboliti vitamina D</b>			
25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	18.20 $\pm$ 8.61	18.00 $\pm$ 6.55	0.885
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	6.40 $\pm$ 6.89	4.35 $\pm$ 1.30	0.365
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (% ukupnog 25(OH)D <sub>3</sub> )	22.48 $\pm$ 9.00	20.06 $\pm$ 4.60	0.849
25(OH)D <sub>2</sub> (ng/mL)	1.39 $\pm$ 0.52	1.48 $\pm$ 0.41	0.635
Ukupni 25(OH)D (ng/mL)	19.57 $\pm$ 9.04	19.46 $\pm$ 6.67	0.366
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)	0.91 $\pm$ 0.48	0.89 $\pm$ 0.51	0.989
25(OH)D <sub>3</sub> : 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> odnos	21.67 $\pm$ 6.55	22.54 $\pm$ 5.37	0.804



#### 4.3.5. Rezultati pra enja unosa vitamin D, sadržaja njegovih metabolita i parametara kostiju kod novoro en adi ro enih prevremeno, tokom prvih pet nedelja života

Prevremeno ro ena novoro en ad majki sa preeklampsijom i bez nje pra ena su u bolnici tokom prvih pet nedelja života. Kako na po etku studije izme u grupa nije bilo zna ajne razlike, ni u jednom od posmatranih parametara (Tabela 16) i kako je sva novoro en ad bila podvrgnuta istom tretmanu u procesu suplementacije vitaminom D (doza u IU odre ena prema kg telesne mase), objedinjeni su u jednu grupu u cilju pra enja unosa vitamina D i promene u koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, kao i povezanosti metabolita vitamina D i parametara kostiju.

Unos vitamina D novoro en adi pra en je svakoga dana, uklju uju i sve izvore vitamina D: iz dodatih suplemenata, humanog oboga enog mleka, ukupne parenteralne ishrane i maj inog mleka. Na nedeljnom nivo prera unat unos vitamina D dat je u Tabeli 17. Porast u unosu vitamina D prime en je tokom perioda od 5 nedelja.

**Tabela 17.** Unos vitamina D kod novoro en adi (prevremeno ro enih, n=19), tokom prvih pet nedelja života

Unos vitamina D iz svih izvora (IU)	Srednja vrednost	SD	Minimum	Maksimum
Nedelja 1	202.8 <sup>a</sup>	115.9	4.5	400.7
Nedelja 2	189.3 <sup>a</sup>	118.0	54.9	442.8
Nedelja 3	250.8 <sup>a</sup>	155.7	65.0	551.9
Nedelja 4	366.2 <sup>b</sup>	163.6	42.5	626.3
Nedelja 5	489.3 <sup>c</sup>	186.9	93.1	736.7

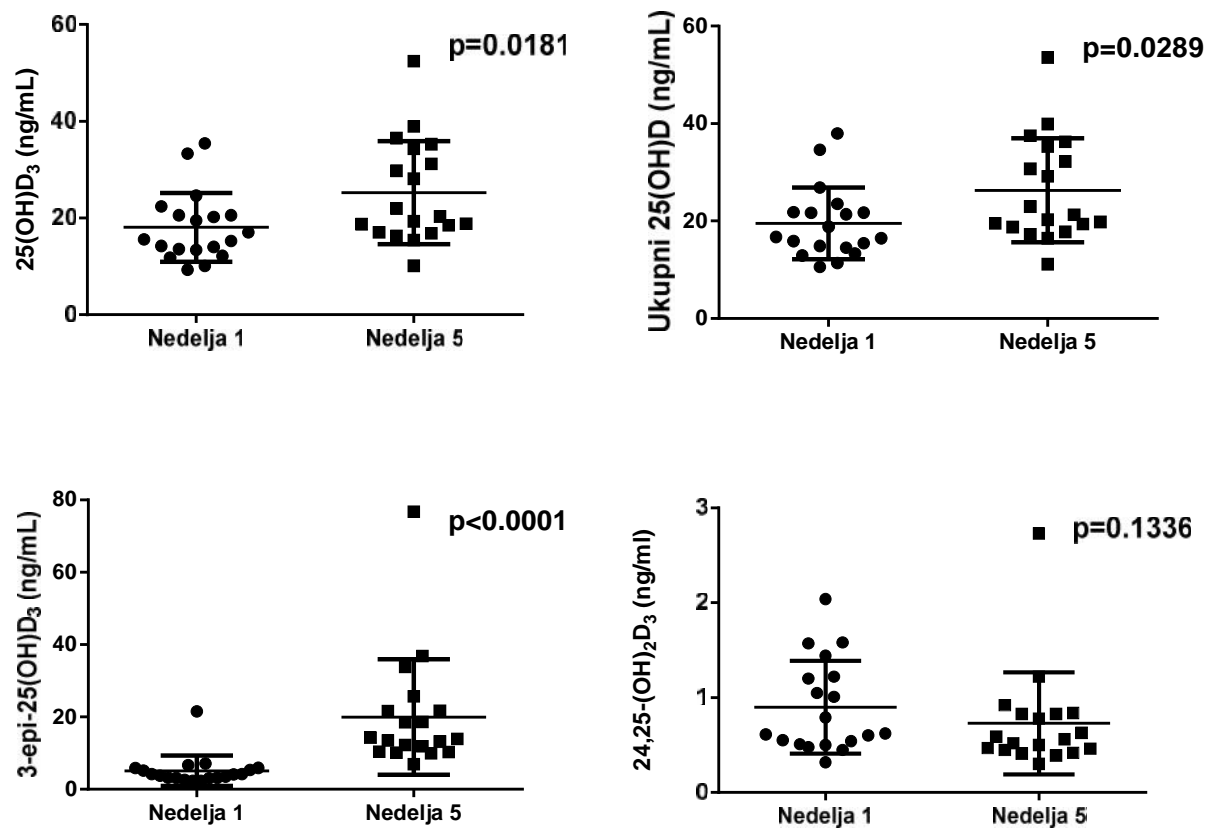
Razlike izme u unosa tokom nedelja testirane su pomo u mix model ANOVA uz korekcije sa Bonferroni post-hoc testom. Srednje vrednosti unosa vitamina D ozna ene sa razli itim malim slovom u superskriptu (a,b ili c) se me usobno zna ajno razlikuju, p<0.05.

Glavne karakteristike novorođenadi, prevremeno rođene, kao i koncentracije metabolita vitamina D određene su u prvoj i na kraju pete nedelje života (Tabela 18). U statusu vitamina D primenjena je značajna porast koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi(25-OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>2</sub> u plazmi tokom prvih pet nedelja života novorođenadi, kao što je prikazano na Slici 17. Tokom tog vremenskog perioda koncentracija 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi se nije značajno promenila.

**Tabela 18.** Karakteristike novorođenadi rođene prevremeno, na kraju prve i pete nedelje života. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Značajnost razlike između srednjih vrednosti u prvoj i petoj nedelji testirana je pomoću mix model ANOVA uz korekcije sa Bonferroni post-hoc testom

<b>Karakteristike novorođenadi</b>	<b>Novorođenad rođena prevremeno (n=19)</b>		
	<b>Nedelja 1</b>	<b>Nedelja 5</b>	<b>p vrednost</b>
Gestaciona starost (nedelje)	30.0 ± 1.5	33.9 ± 1.5	<0.0001
Starost novorođene eta (dani)	7 ± 1	35 ± 1	<0.0001
Obim glave (cm)	26.5 ± 1.0	29.6 ± 1.8	<0.0001
Dužina (cm)	37.8 ± 2.0	40.7 ± 4.0	<0.0001
Telesna masa (g)	1091 ± 207	1620 ± 430	<0.0001
<b>Metaboliti vitamina D</b>			
25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	18.60 ± 7.14	25.27 ± 10.65	0.0181
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)	5.10 ± 4.23	20.00 ± 15.95	<0.0001
3-epi-25(OH)D <sub>3</sub> (% ukupnog 25(OH)D <sub>3</sub> )	20.95 ± 4.93	41.74 ± 8.48	<0.0001
25(OH)D <sub>2</sub> (ng/mL)	1.45 ± 0.44	1.04 ± 0.18	<0.0001
Ukupni 25(OH)D (ng/mL)	19.51 ± 7.38	26.29 ± 10.67	0.0289
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (ng/mL)	0.90 ± 0.49	0.73 ± 0.54	0.1336
25(OH)D <sub>3</sub> : 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> odnos	22.22 ± 5.67	37.88 ± 6.64	<0.0001

### Prevremeno rođena novorođenčad



**Slika 17.** Promene koncentracija metabolita vitamina D tokom prvih 5 nedelja života kod novorođenadi prevremeno rođene. Značajnost izmeđ u vrednosti u prvoj i petoj nedelji testirane su pomoću mix modela ANOVA uz korekcije sa Bonferroni post-hoc testom

Rezultati DXA snimanja prevremeno rođene novorođenadi na kraju pete nedelje života (približno njihovom punim terminom) pokazuju da je za 19 novorođenadi mineralni sadržaj kostiju celog tela (WB BMC g/kg telesne mase:  $15.55 \pm 4.54$ ), femura (Femur BMC:  $1.18 \pm 0.36$  g) i četiri lumbalna pršljenova (L1-4 BMC:  $1.03 \pm 0.29$  g), kao i mineralna gustina četiri lumbalna pršljenova (L1-4 BMD:  $0.17 \pm 0.05$  g/cm<sup>2</sup>) nešto niži od referentnih normativnih vrednosti postavljenih za novorođenad rođene u terminu, u toku prve godine života za WB BMC celog tela, L1-4 i femura i BMD L1-L4<sup>(392)</sup>.

Slabe korelacije nađene su između mineralne gustine i mineralnog sadržaja četiri lumbalna pršljenova (L1-4) i koncentracija ukupnog 25(OH)D i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, u petoj nedelji života, dakle u vreme punog termina preveremno rođene novorođenadi (Tabela 19).

**Tabela 19.** Korelacije metabolita vitamina D i parametara kostiju u petoj nedelji života novorođenadi, rođene pre vremena (n=19)

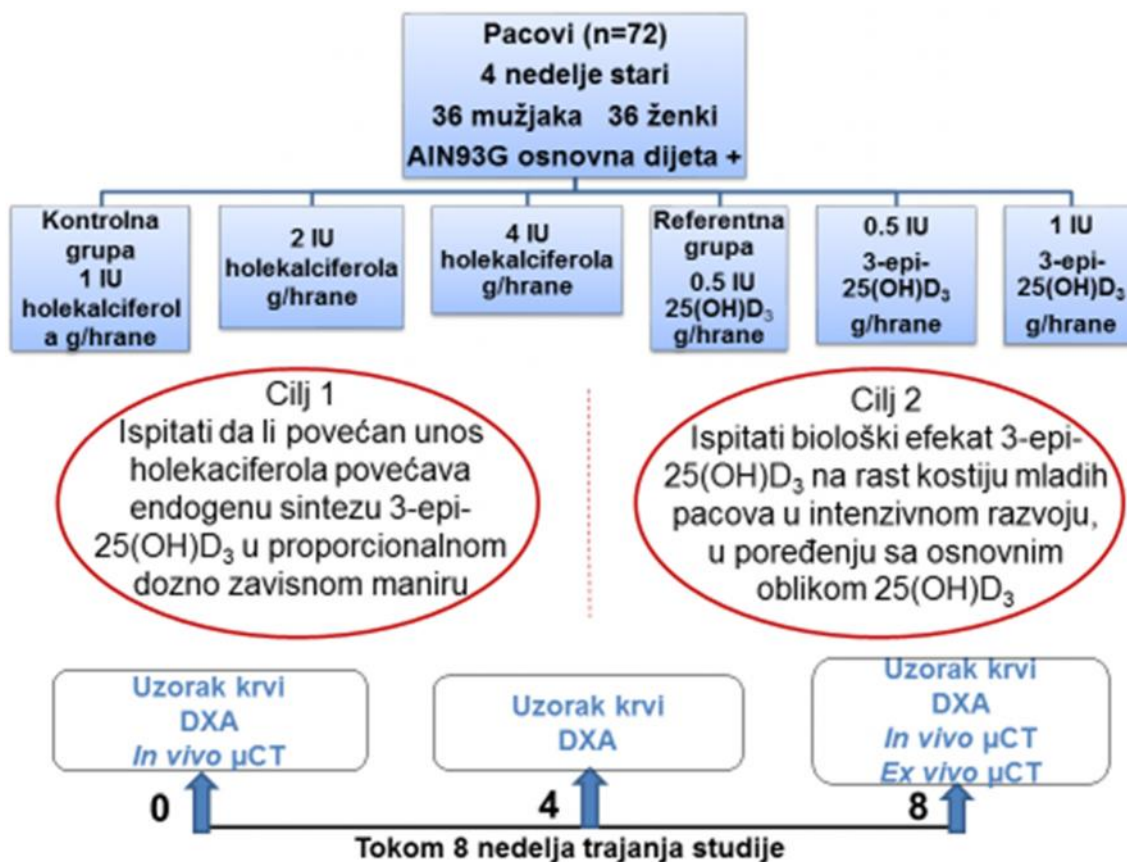
Metabolit vitamina D	Karakteristike novorođenadi	Spearman-ov koeficijent korelacije	95 % interval pouzdanosti	P vrednost
3-epi- 25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)	WB BMC (g/kg uk.mase)	-0.1411	-0.6056 do 0.3950	0.6020
	BMC femura (g)	-0.0496	-0.5159 do 0.4394	0.8452
	BMC L1-4 (g)	0.4609	-0.0061 to 0.7629	0.0470
	BMD L 1-4 (g/cm <sup>2</sup> )	0.4686	0.0037 do 0.7670	0.0430
Ukupni 25(OH)D (ng/ml)	WB BMC (g/kg uk.mase)	0.0983	-0.3993 do 0.5508	0.6987
	BMC femura (g)	0.0782	-0.4226 do 0.5310	0.7819
	BMC L1-4 (g)	0.3381	-0.1525 do 0.6939	0.1581
	BMD L 1-4 (g/cm <sup>2</sup> )	0.4031	-0.0764 do 0.7318	0.0865

3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epimer-25-hidroksiholekalciferol; 25(OH)D, 25-hidroksivitamin D; WB, celo telo; BMC, mineralni sadržaj kostiju; BMD, mineralna gustina kostiju; L1-4, prva četiri lumbalna pršljenova novorođenadi

#### **4.4 Ispitivanje uticaja C-3- epimera 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> iz endogenih i egzogenih izvora na rast kostiju kod animalnog modela**

Ciljevi ove studije na mladim pacovima u intenzivnom razvoju uključivali su testiranje dozno-zavisnog odgovora endogene sinteze 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na povećan unos holekalciferola (cilj 1), kao i biološki efekat 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na rast i gustinu kostiju u poređenju sa osnovnim 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> oblikom 25(OH)D<sub>3</sub> (cilj 2). Postavljena je hipoteza da će povećani unos holekalciferola povećati endogenu sintezu 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i da će 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> iz endogenih i egzogenih izvora podjednako efikasno podržavati rast i razvoj kostiju kao i osnovni oblik 25(OH)D<sub>3</sub>.

Mladi Sprague Dawley pacovi (n=72), stari četiri nedelje, su nakon perioda adaptacije nasumično raspoređeni u šest grupa kako bi konzumirali različite, posebno definisane dijetete na osnovu dva specifična cilja studije. Detaljan protokol studije opisan je u poglavlju 3.5 dok je shematski prikaz dat na Slici 18. Ukratko, tokom perioda od osam nedelja pacovi su hranjeni standardnom hranom za mlade pacove AIN-93G, koja je sadržala različite koncentracije vitamina D<sub>3</sub> ili njegovih metabolita. Kontrolna dijeta AIN-93G (1 IU vitamina D<sub>3</sub>/g hrane) i dve eksperimentalne dijetete sa različitim sadržajem vitamina D<sub>3</sub>, odnosno holekalciferola (od 2 ili 4 IU/g hrane) su pripremljene da bi se ispitalo dozno-zavisni odgovor na povećanu koncentraciju holekalciferola kod mladih pacova (cilj 1). Za ispitivanje biološke uloge 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> pripremljene su dijetete sa 0.5 ili 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>/g hrane i referentna dijeta sa 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> /g hrane, u kojima nije bilo holekalciferola.



**Slika 18.** Shematski prikaz protokola studije sa mladim Sprague Dawley pacovima za period od 8 nedelja

Unos hrane meren je dva puta nedeljno, a telesna masa na nedeljnoj bazi. Dužina pacova merena je tokom snimanja kostiju na početku, u sredini i na kraju studije (0, 4 i 8 nedelja). Tri puta u toku studije (0, 4 i 8 nedelja), kao što je prikazano na slici 18, životinjama je uziman uzorak krvi za biohemijske analize, nakon čega su uvođene u laku opštu anesteziju za *in vivo* DXA snimanja kostiju celog tela (WB), femura i lumbarnog pršljenja 3 (L3). Na početku i na kraju studije pršljen L3 je dodatno sniman pomoću *in vivo* μCT, dok su na kraju studije duge kosti i L3 snimani *ex vivo* u visokoj rezoluciji pomoću μCT. Postupak i svaka od ovih tehnika detaljno su opisane u poglavlju 3.12.

Eksperimentalne dijetete, pripremljene su na način opisan u poglavlju 3.6, od osnovne AIN-93G dijetete za mlade pacove, koja je sadržala različite koncentracije vitamin D<sub>3</sub> ili njegovih

metabolita. Kompanije uklju ene u proces izrade dijeta uradile su analize kojima su potvrdile sastav svake od eksperimentalnih dijeta (Isosciences: No # 04323767 i DSM Nutritional Products: lot # UE 0110705/ 2012 godina). Detalji o sastavu dijeta dati su u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Sastav dijeta koriš enih u studiji sa mladim Sprague Dawley pacovima

<b>Sastojci</b>	<b>g/kg dijete</b>
Kazein, “Bez vitamina D”	200
L-Cistin	3
Kukuruzni skrob	397
Maltodekstrin	132
Saharoza	99.70
Sojino ulje	70
Celuloza	50
Mineralni Mix, AIN-93G-MX	35
Vitaminski Mix AIN-93 w/o A,D,E	10
Vitamin A Palmitat (500, 000 IU/g)	0.008
Vitamin E, DL-alfa-tokoferol-acetat (500 IU/g)	0.15
Holin-bitartarat	2.5
TBHQ, antioksidans	0.014
Vitamin D <sub>3</sub> , holekalciferol (50,000 IU/g u saharozi)*	0.02
Boje za hranu**	0.1

Svaka dijeta je sadržala 63.8% ugljenih hidrata, 16.7% masti i 19.4% proteina po gramu dijete kao za AIN-93G.

\*Eksperimentalne dijete sadržale su različite koncentracije holekalciferola (2 i 4 IU/g) i 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub> u koncentraciji od 0.5 IU/g kao i 3-epi-25- hidroksivitamin D<sub>3</sub> u koncentraciji od 0.5 i 1 IU/g dijete.

\*\* Različite boje za hranu dodate su u svaku dijetu da bi se omogućilo razlikovanje dijeta bez znanja o njihovom sastavu tokom trajanja studije.

Kako su na početku studije postavljena dva cilja istraživanja, dobijeni rezultati posmatrani su odvojeno: rezultati dobijeni za grupu pacova hranjenih holekalciferolom i za grupe pacova hranjenih epimerom i 25(OH)D<sub>3</sub>, dok su u okviru svake grupe mušjaci i ženke posmatrani zasebno.

#### **4.4.1. Dijetetski unos i antropometrijski parametri**

Na početku studije nije bilo prisutnih značajnih razlika između u grupama pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom u pogledu količine unete hrane na dnevnom nivou, dužine i telesne mase, kao što je prikazano u Tabeli 21. U toku studije, nisu primećene značajne razlike između u grupama pacova u količini unete hrane. Značajan efekat dijetete na dužinu pacova bio je prisutan samo kod ženki, koje su hranjene dijetama sa 2 i 4 IU holekalciferola ( $p=0.022$ ), pri čemu nije bilo značajnih razlika u njihovoj masi. Za mušjake i ženke, u svim grupama, značajan uticaj imao je faktor vreme (u smislu trajanja izloženosti pacova dijetama) na količinu hrane unete na dnevnom nivou, na dužinu i telesnu masu pacova ( $p<0.0001$ ), što je otkriveno za pacove koji intenzivno rastu, dok unakrsni efekat vremena i dijeta nije bio prisutan (Tabela 21).

Između u grupama pacova na 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub> dijetama, nisu nađene značajne razlike u količini unete hrane na dnevnom nivou, dužini i telesnoj masi na početku, niti u toku trajanja studije, ali su se ove vrednosti statistički značajno povećale tokom vremena u okviru svake grupe ( $p<0.0001$ ). Značajan efekat dijetete na dužinu pacova bio je prisutan samo kod ženki, sa najvećim vrednostima prisutnim kod jedinki hranjenih 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> dijetama, ali je značajna razlika u pogledu dužine bila prisutna i na samom startu studije (Tabela 21).



**Tabela 21.** Antropometrijski parametri i unos hrane kod mladih Sprague Dawley pacova hranjenih dijetama sa Vitaminom D<sub>3</sub> ili 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u periodu od 8 nedelja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

	Pol	Vreme	Dijeta			Glavni efekti		Dijeta			Glavni efekti			
			Kontrolna grupa	2 IU holekalciferol	4 IU holekalciferol	Dijeta p	Vreme** p	25(OH)D <sub>3</sub>	0.5 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	1 IU3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	Dijeta p	Vreme** p		
			(n=6)	(n=5)	(n=6)	vred.	vred.	(n=6)	(n=6)	(n=6)	vred.	vred.		
			(n=6)	(n=6)	(n=6)			(n=6)	(n=6)	(n=6)				
<b>Unos hrane (g/dan)</b>	M	0	12.8 ± 0.5	12.6 ± 2.1	12.7 ± 0.9	0.15	<0.0001	13.1 ± 1.9	12.9 ± 0.1	12.9 ± 1.2	0.16	<0.0001		
		4	26.9 ± 2.4	24.6 ± 2.5	25.8 ± 0.7			26.5 ± 1.5	27.5 ± 2.1	25.5 ± 1.4				
		8	29.9 ± 3.5	28.6 ± 0.4	30.2 ± 0.5			32.3 ± 2.0	32.0 ± 2.6	29.7 ± 0.6				
	Ž	0	11.9 ± 1.3	11.4 ± 1.0	12.2 ± 0.3	0.91	<0.0001	12.0 ± 1.6	12.1 ± 0.6	11.5 ± 1.7	0.57	<0.0001		
		4	19.3 ± 2.0	19.4 ± 2.6	18.6 ± 1.0			19.1 ± 2.9	17.9 ± 2.4	17.8 ± 1.8				
		8	20.2 ± 1.9	20.6 ± 1.7	21.5 ± 1.7			20.5 ± 1.3	18.7 ± 3.1	19.9 ± 1.5				
<b>Telesna težina (g)</b>	M	0	89.4 ± 9.0	90.4 ± 15.4	92.9 ± 8.4	0.45	<0.0001	93.7 ± 7.8	87.0 ± 4.6	92.2 ± 13.9	0.70	<0.0001		
		4	343.4 ± 24.5	344.5 ± 44.9	342.2 ± 14.7			379.7 ± 40.5	378.9 ± 26.5	355.3 ± 26.9				
		8	571.0 ± 48.3	565.9 ± 81.0	586.7 ± 36.0			589.8 ± 85.2	590.7 ± 36.4	564.4 ± 48.1				
	Ž	0	84.9 ± 6.4	81.1 ± 8.6	86.3 ± 6.7	0.09	<0.0001	81.3 ± 9.1	92.2 ± 3.9	81.8 ± 10.0	0.86	<0.0001		
		4	252.8 ± 15.7	243.9 ± 36.6	249.5 ± 4.5			252.5 ± 33.1	254.7 ± 34.1	244.8 ± 17.8				
		8	334.9 ± 30.7	340.6 ± 27.6	336.7 ± 28.0			335.0 ± 31.2	325.3 ± 58.0	331.7 ± 34.8				
<b>Dužina (cm)</b>	M	0	25.5 ± 0.8	26.5 ± 1.6	26.0 ± 1.6	0.07	<0.0001	26.4 ± 1.0	25.2 ± 1.2	25.9 ± 2.1	0.76	<0.0001		
		4	41.5 ± 0.5	42.8 ± 1.6	42.0 ± 1.1			42.3 ± 1.2	42.7 ± 0.8	42.2 ± 1.2				
		8	47.6 ± 1.0	48.5 ± 2.0	48.6 ± 1.2			48.3 ± 1.3	48.6 ± 0.9	48.6 ± 1.0				
	Ž	0	25.5 ± 0.5	25.4 ± 0.5	25.7 ± 0.5	0.022	<0.0001	24.5 ± 0.6	26.0 ± 1.1	25.5 ± 0.8	0.01	<0.0001		
		4	38.0 ± 0.4	38.5 ± 0.5	39.1 ± 0.6			Dijeta x vreme	37.7 ± 1.0	38.2 ± 1.1			38.5 ± 0.5	Dijeta x vreme
		8	42.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	42.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	42.9 ± 0.6 <sup>b</sup>			p=0.52	41.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	42.1 ± 1.1 <sup>ab</sup>			42.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	p=0.45

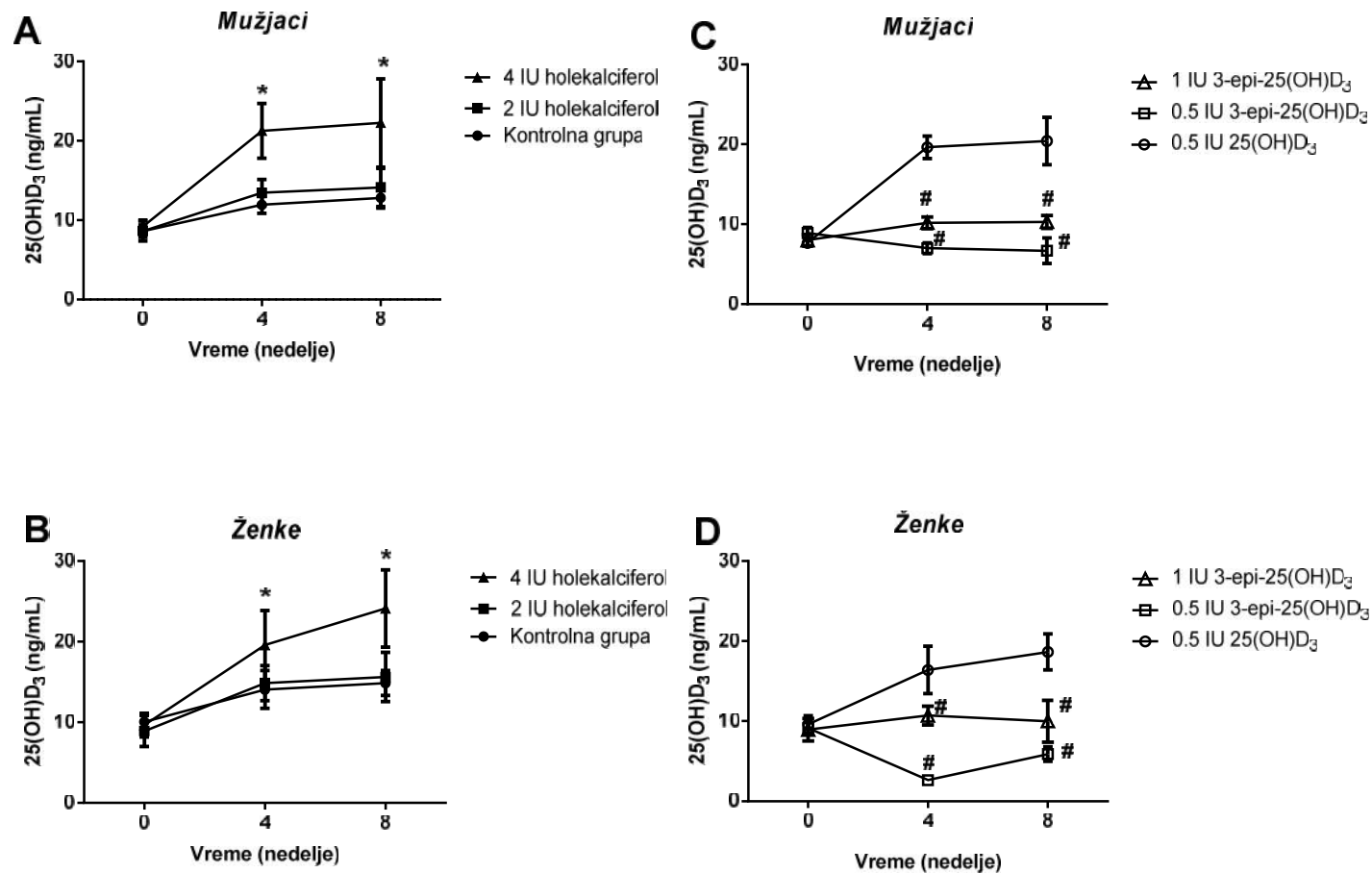
\*Uticaj glavnih efekata i interakcije su testirani pomoću mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05). Razlike u dužini ženki izmeću grupa, označene malim slovima superskriptu a i b, su značajne (glavni efekat dijetete)

\*\* Statistička značajnost porasta vrednosti u periodu od 1-4 nedelje i od 4-8 nedelje (p<0.05).

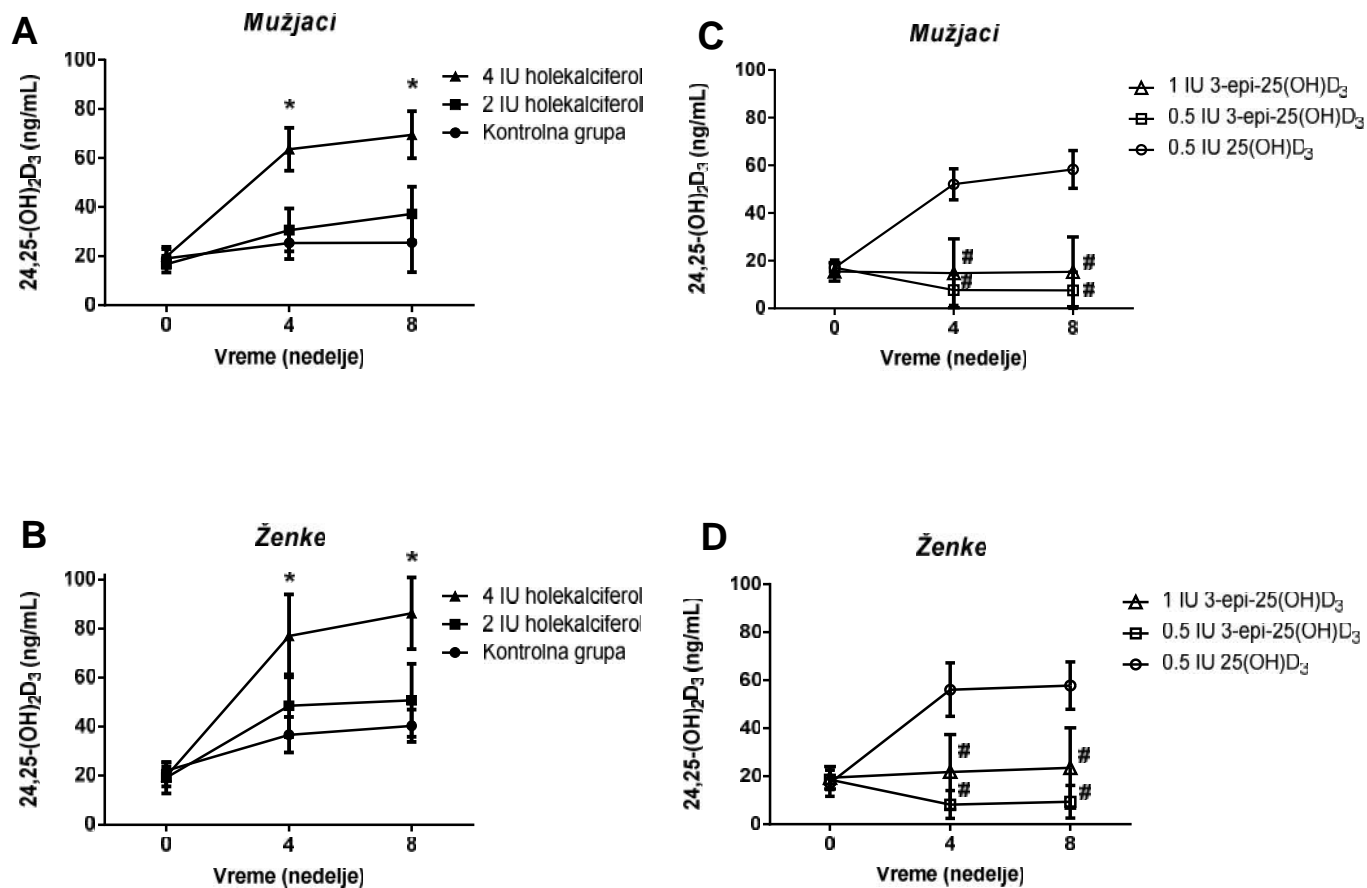
#### 4.4.2. Metaboliti vitamina D

Vrednosti analiziranih metabolita vitamina D nisu se značajno razlikovale na početku studije između grupa na dijeti sa holekalciferolom (1 IU, 2 IU i 4 IU). Kod mužjaka i ženki, koncentracije  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  su bile značajno veće ( $p < 0.0001$ ) u 4 IU-holekalciferol-grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 19a-b; Slika 20a-b), u 4 i 8 nedelji studije. Značajno veća ( $p < 0.05$ ) koncentracija 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  zabeležena je kod ženki hranjenih 4 IU-holekalciferol dijetom (Slika 21b). Tokom vremena kod pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom koncentracije svih metabolita vitamina D u plazmi su porasle, sa izuzetkom 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  kod mužjaka. Međutim, sadržaj 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$ , izražen kao procenat od ukupnog  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , porastao je na kraju 8 nedelje kod ženki (kontrolna grupa: 25.9%, 2 IU: 49.6% and 4 IU: 47.1%), ali i kod mužjaka (kontrolna grupa: 15.3%, 2 IU: 40% and 4 IU: 26%). Kod pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom nađena je pozitivna korelacija između koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $r=0.9$ ,  $p < 0.001$ ),  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  ( $r=0.5$ ,  $p < 0.0001$ ), kao i 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $r=0.4$ ,  $p < 0.0001$ ).

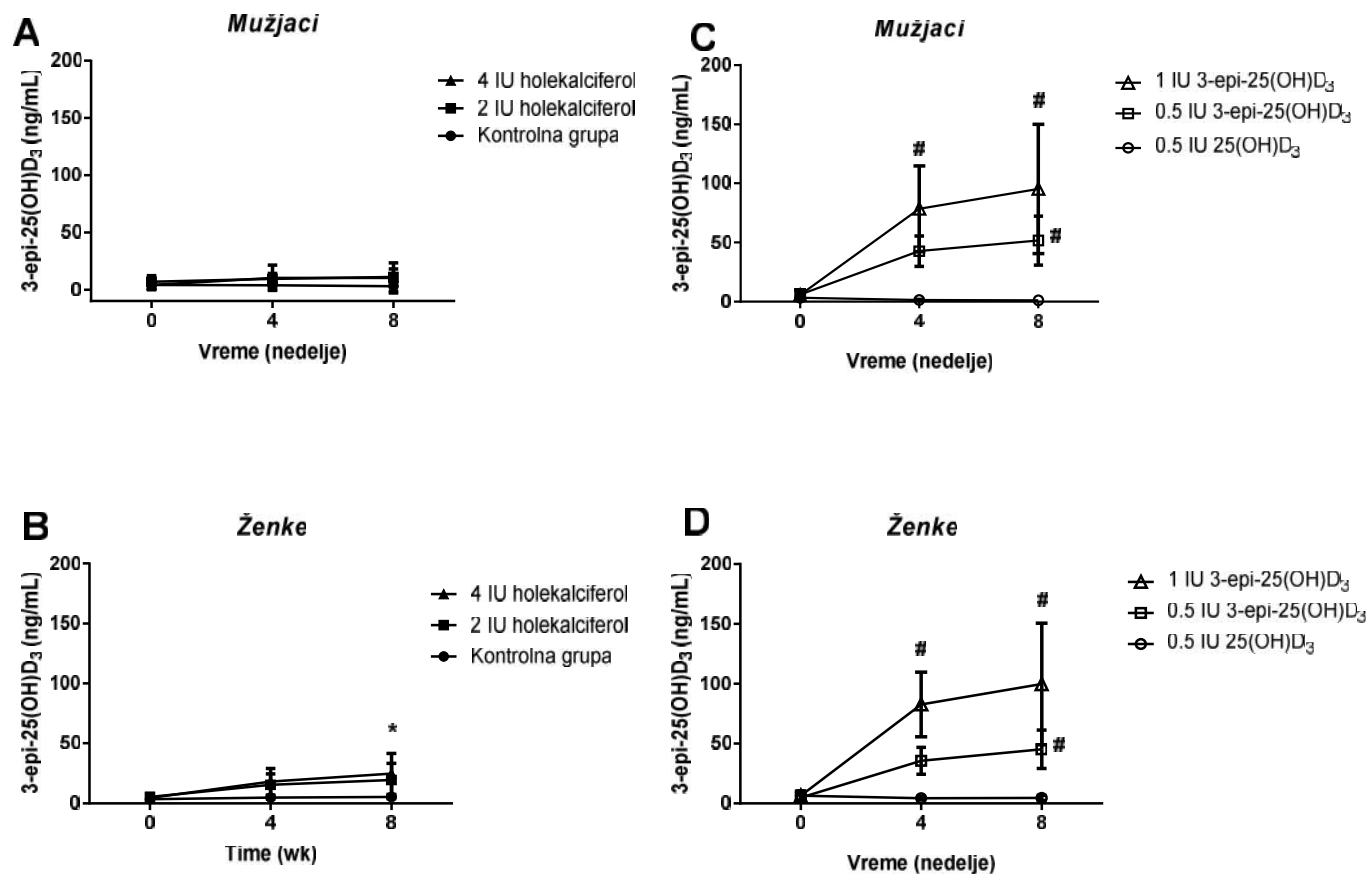
Na početku studije, kod mužjaka i ženki pacova hranjenih dijetama sa  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  (0.5 IU i 1 IU) nije bilo značajne razlike u koncentracijama analiziranih metabolita vitamina D. Značajan uticaj dijetete, kao i interakcija faktora dijeta i vreme, zabeleženi su za sve analizirane metabolite vitamina D ( $p < 0.0001$ ; Slika 19c-d; Slika 20c-d; Slika 21c-d). Mužjaci i ženke hranjeni sa 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  dijetama imali su manje koncentracije  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dok je koncentracija 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  bila značajno veća kod ženki, veću četvrtoj nedelji, za obe dijetete sa 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  (0.5 IU i 1 IU). Međutim, povećana koncentracija 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  zabeležena je nakon četvrte nedelje kod mužjaka hranjenih dijetom sa većom koncentracijom epimera (1 IU), dok je tek nakon osme nedelje primećen porast kod pacova hranjenih dijetom sa manjom koncentracijom epimera (0.5 IU). Koncentracija 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$  metabolita nije se značajno menjala tokom vremena kod pacova u referentnoj grupi, hranjenoj dijetom sa 0.5 IU  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (Slika 21c-d).



**Slika 19:** Koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi mladih Sprague Dawley pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom (A i B) i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (C i D) tokom perioda od 8 nedelja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ±SD, n=6 pacova pol/dijeta osim za mužjake 2 IU-holekalciferol-grupe, gde je n=5. Značajne razlike su utvrđene pomoću mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05). \* Srednja vrednost se značajno razlikuje u odnosu na kontrolnu grupu (hranjena AIN-93G dijetom); # Srednja vrednost se značajno razlikuje u odnosu na referentnu grupu (hranjena 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> dijetom).



**Slika 20:** Koncentracija 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi mladih Sprague Dawley pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom (A i B) i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (C i D) tokom perioda od 8 nedelja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ±SD, n=6 pacova pol/dijeta osim za mužjake 2 IU-holekalciferol-grupe, u kojoj je n=5. Zna ajne razlike su utvr ene pomo u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05). \* Srednja vrednost je zna ajno razli ita u odnosu na kontrolnu grupu, hranjenu AIN-93G dijetom); # Srednja vrednost je zna ajno razli ita u odnosu na referentnu grupu, hranjenu 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> dijetom.



**Slika 21:** Koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi mladih Sprague Dawley pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom (A i B) i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (C i D) tokom perioda od 8 nedelja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ±SD, n=6 pacova pol/dijeta osim za mužjake 2 IU-holekalciferolgrupe, u kojoj je n=5. Zna ajne razlike su utvr ene pomo u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05). \* zna ajno razli ita u odnosu na kontrolnu grupu, hranjenu AIN-93G dijetom; # Srednja vrednost je zna ajno razli ita u odnosu na referentnu grupu, hranjenu 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> dijetom.

#### 4.4.3. Biomarkeri metabolizma kostiju

Tokom studije, za mužjake i ženke koji su hranjeni dijetama sa holekalciferolom, nisu na ene interakcije dijeta/vreme, niti uticaj dijeta na koncentraciju jona Ca (iCa) ili C-terminalnog peptida kolagena tipa I (CTX), ali je na CTX zapažen uticaj vremena u smislu pove anja njegove koncentracije sa vremenom (Tabela 22), što je o ekivano za životinje koje intenzivno rastu. Za mužjake i ženke, srednje vrednosti koncentracija PTH nisu se razlikovale na po etku, niti u toku studije, izme u grupa pacova hranjenih dijetama sa razli itim koncentracijama holekalciferola (Slika 22 a-b).

Izme u grupa hranjenih dijetama sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>, nije bilo zna ajne razlike na po etku studije za iCa ili CTX, dok je koncentracija CTX zna ajno porasla tokom vremena kod svih pacova, a porast u nivou iCa zabeležen je samo kod mužjaka (Tabela 21). Znan ajan uticaj dijete na koncentraciju PTH registrovan je kod mužjaka pacova (p=0.0134), za obe grupe, koje su bile na 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> dijete (0.5 IU i 1 IU) (Slike 23 c-d), uz prisutnu interakciju faktora dijete i vremena (p=0.0334). Koncentracije ukupnog kalcijuma, fosfata, RANKL i OPG merene su samo na kraju studije. Kod mužjaka i kod ženki, nisu prime ene razlike me u grupama pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom ili 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> za bilo koji analizirani biomarker metabolizma kostiju (Tabela 22).

#### 4.4.4. Gustina i masa kostiju

Kod mužjaka i ženki hranjenih dijetama sa holekalciferolom, snimanjem celog tela (WB) pomo u DXA ustanovljeno je da nije bilo razlika na po etku studije izme u grupa u pogledu WB BMC (raspon: 2.2-2.5 g) i dvodimenzionalnog aBMD (raspon: 0.084-0.087g/cm<sup>2</sup>), dok su njihove vrednosti zna ajno porasle tokom osam nedelja (p<0.0001) (Tabela 23). Sli na situacija bila je prisutna i kod pacova hranjenih dijetama sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>3</sub>, gde nije bilo razlike izme u grupa na po etku studije za WB BMD i WB aBMC ali su njihove vrednosti zna ajno (p <0.0001) porasle u toku trajanja studije kod pacova oba pola (Tabela 23).

Rezultati DXA merenja specifičnih regiona tela pacova za procenu gustine aBMD i mase BMC kostiju femura i prošljena L3 pokazali su značajan ( $p < 0.0001$ ) porast vrednosti ovih parametara tokom vremena, bez razlika na početku ili na kraju studije između grupa ženki pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom ili 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (Tabela 23). Mali porast vrednosti za L3 aBMD na kraju studije primećen je kod pacova hranjenih dijetom sa 2 IU holekalciferola, u poređenju sa grupom hranjenom dijetom sa 4 IU holekalciferola (Tabela 23). Mušjaci hranjeni dijetom sa 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> imali su manju gustinu L3 aBMD u odnosu na druge grupe na početku studije, dok dijeta sa vremenom nije negativno uticala na ovaj parametar (Tabela 23).

Međutim, mali porast u gustini kostiju L3 (aBMD) primećen je kod mužjaka pacova hranjenih dijetom sa 0.5 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na referentnu grupu (Tabela 23). Na ostale parametre merene pomoću DXA nije zabeležen značajan uticaj dijetete ili interakcije dijeta/vreme (Tabela 23).

#### 4.4.5. Struktura i gustina kostiju

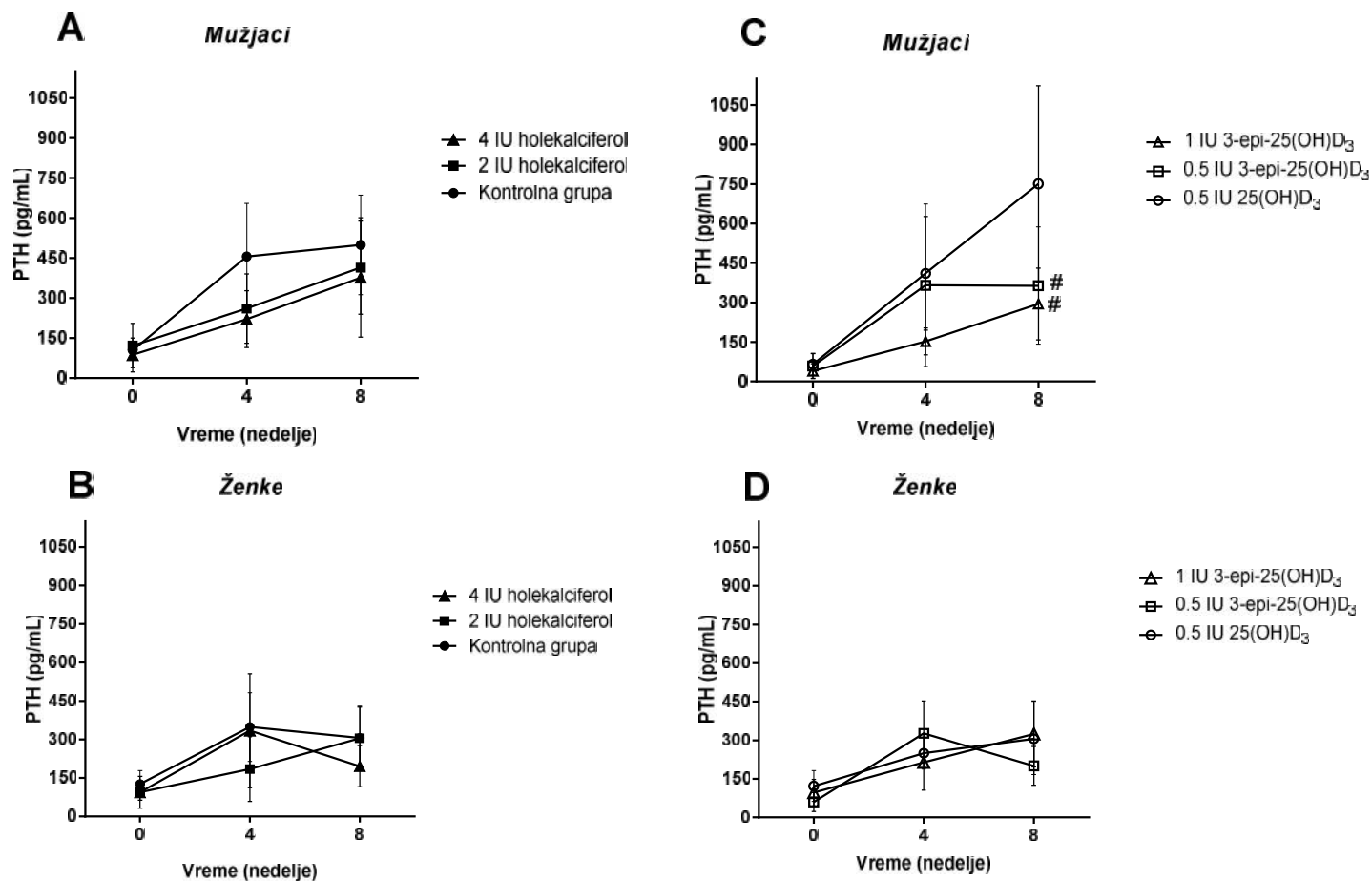
Na osnovu rezultata *in vivo*  $\mu$ CT analiza, utvrđeno je da je na kraju studije trabekularni BMC L3 bio niži kod ženki hranjenih dijetom sa 2 IU holekalciferola, dok je prisutan bio i uticaj dijetete ( $p = 0.0145$ ) i dijeta/vreme interakcija ( $p = 0.0213$ ) (Tabela 24). Kod mužjaka i ženki hranjenih dijetama sa holekalciferolom procena mikro-strukture (gustina i mineralnog sadržaja trabekularnog i kortikalnog tkiva) koštanog tkiva L3 *in vivo* pomoću  $\mu$ CT aparata, nije dala značajne razlike na početku ili tokom studije između grupa, dok su vrednosti za sve izmerene parametre u svakoj od grupa porasle tokom vremena ( $p < 0.0001$ ) (rezultati nisu prikazani).

Struktura L3 *in vivo* pomoću  $\mu$ CT, nije se značajno razlikovala između grupa ženki pacova hranjenih dijetama sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom vremena (Tabela 24). Međutim, značajan efekat dijetete ogledao se u povećanoj gustini L3, kortikalnoj ( $p = 0.0006$ ) i ukupnoj ( $p = 0.0035$ ) vBMD kod mužjaka hranjenih dijetom sa 0.5 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (Slika 23). Značajne razlike nisu primećene u vBMD vrednosti trabekularne kosti L3 (Tabela 24).

Dalje analize pomoću *ex vivo*  $\mu$ CT potvrdile su odsustvo razlika u vBMD ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) gustini trabekularne kosti u okviru L3 izmeđ u grupa hranjenih dijetama sa 3-epi-25(OH) $\text{D}_3$  ili holekalciferolom za oba pola (Tabela 25). Tako e prema *ex vivo*  $\mu$ CT analizama, nije bilo značajne razlike izmeđ u grupa pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom ili 3-epi-25(OH) $\text{D}_3$  za parametre dobijene analizom trabekularnog tkiva kosti femura i L3 (Tabela 25).

Analize kortikalnog tkiva femura na srednjoj dijafizi (mid-diaphysis) ukazale su na odsustvo razlika izmeđ u svih grupa pacova hranjenih različitim dijetama (Tabela 25). Tako e, prilikom lomljenja kostiju femura u srednjoj tački nije bilo razlika u biomehaničkim parametrima za snagu i elastičnost kostiju izmeđ u svih grupa pacova (Tabela 26).





**Slika 22:** Koncentracija paratiroidnog hormona (PTH) u plazmi mladih Sprague Dawley pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom (A i B) i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (C i D) tokom perioda od 8 nedelja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$ SD, n=6 pacova pol/dijeta osim za mužjake 2 IU-holekalciferolgrupe, u kojoj je n=5. Zna ajne razlike izme u srednjih vrednosti su utvr ene pomo u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama ( $p < 0.05$ ). \* Srednja vrednost je zna ajno razli ita u odnosu na kontrolnu grupu, hranjenu AIN-93G dijetom; # Srednja vrednost je zna ajno razli iti u odnosu na referentnu grupu, hranjenu 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> dijetom. Zna ajan porast vrednosti u periodu od 1-4 i od 1-8 nedelje ( $p < 0.001$ ).

**Tabela 22.** Biohemijski parametri Sprague Dawley pacova starih 12 nedelja koji su hranjeni dijetama sa holekalciferolom i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom 8 nedelja.

	Dijeta			Glavni efekat Dijeta	Dijeta			Glavni efekat Dijeta		
	Pol	Vreme	Kontrolna grupa		2 IU holekalciferol	4 IU holekalciferol	25(OH)D <sub>3</sub>		0.5 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	1 IU3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>
	M	(n=6)	(n=5)	(n=6)	p vred.	(n=6)	(n=6)	(n=6)	p vred.	
	Ž	(n=6)	(n=6)	(n=6)		(n=6)	(n=6)	(n=6)		
<b>Ponovljena merenja</b>										
CTX (ng/mL)	M	0	174.6 (156.9 - 207.1)	190.1 (152.7 - 322.8)	198.9 (181.1-278.9)	0.90*	193.8 (169.0-233.5)	183.0 (163.5-305.6)	204.5 (183.2-290.0)	0.97*
		4	106.4 (83.0 - 155.6)	102.3 (84.3 - 148.5)	91.1 (76.8 - 107.0)		110.9 (88.1-122.4)	96.4 (84.1-103.0)	83.5 (68.7 - 90.4)	
		8	61.9 (56.5 - 78.0)	69.8 (52.7 - 78.8)	62.5 (57.5 - 74.2)		77.6 (68.9 -82.6)	78.8 (55.9 - 83.3)	62.8 (51.0 - 76.1)	
	Ž	0	159.7 (141.0 - 177.3)	148.3 (111.0 - 185.8)	138.8 (121.5-206.1)	0.88*	192.8 (164.0- 283.0)	150.8 (131.5-184.1)	178.5 (144.1-278.4)	0.28*
		4	55.9 (43.4 - 60.0)	55.8 (48.8 - 75.7)	41.0 (35.2 - 56.2)		55.1 (43.2 - 58.6)	53.1 (45.2- 60.1)	64.7 (50.3 - 75.0)	
		8	27.3 (24.1 - 34.1)	27.9 (22.6 - 36.2)	23.4 (19.0 - 30.7)		21.3 (19.0 - 35.3)	24.6 (20.7 - 26.9)	29.8 (20.0 - 37.8)	
iCa (mmol/L)	M	4	1.27 (1.26 - 1.30)	1.27 (1.18 - 1.32)	1.29 (1.28 - 1.33)	0.18	1.29 (1.29 - 1.32)	1.33 (1.29 - 1.33)	1.29 (1.29 - 1.34)	0.54
		8	0.26 (0.23 - 0.29)	0.25 (0.23 - 0.28)	1.30 (1.24 - 1.31)		1.25 (1.23 - 1.31)*	1.25 (1.21 - 1.28)*	1.25 (1.04 - 1.29)*	
	Ž	4	1.29 (1.28 - 1.31)	1.32 (1.03 - 1.34)	1.31 (1.27 - 1.34)	0.32	1.29 (1.24 - 1.35)	1.28 (1.25 - 1.31)	1.27 (1.27 - 1.30)	0.26
		8	1.26 (1.24 - 1.31)	1.27 (1.25 - 1.29)	1.27 (1.27 - 1.27)		1.28 (1.24 - 1.32)	1.31 (1.30 - 1.33)	1.27 (1.16 - 1.28)	
<b>Određivanja na kraju studije</b>										
Kalcijum (mmol/L)	M	8	2.34 (2.29 - 2.38)	2.42 (2.37 - 2.53)	2.37 (2.25 - 2.43)	0.22	2.32 (2.24 - 2.36)	2.29 (2.25 - 2.45)	2.39 (2.28 - 2.43)	0.87
	Ž	8	2.41 (2.33 - 2.54)	2.49 (2.45 - 2.52)	2.40 (2.39 - 2.48)	0.33	2.44 (2.39 - 2.53)	2.46 (2.39 - 2.54)	2.39 (2.35 - 2.53)	0.99
Fosfat (mmol/L)	M	8	2.35 (2.08 - 2.66)	2.55 (2.46 - 2.63)	2.47 (2.32 - 2.55)	0.53	2.50 (2.40 - 2.65)	2.34 (2.27 - 2.35)	2.44 (2.19 - 2.57)	0.13
	Ž	8	2.42 (2.07 - 3.02)	2.19 (2.15 - 2.55)	2.70 (2.19 - 2.89)	0.51	2.44 (2.26 - 2.62)	2.39 (2.21 - 2.52)	2.26 (2.11 - 2.67)	0.48
RANKL (pg/mL)	M	8	43.0 (38.3 - 50.5)	40.2 (35.3 - 84.5)	42.6 (23.6 - 93.9)	0.82	33.8 (27.4 - 221.2)	41.6 (35.8 - 63.3)	24.7 (19.9 - 46.9)	0.40
	Ž	8	23.8 (17.0 - 47.0)	39.6 (25.1 - 103.6)	23.0 (14.0 -117.4)	0.60	31.3 (24.3 - 33.7)	72.2 (22.1- 494.3)	28.2 (21.4 - 33.9)	0.08
OPG (pg/mL)	M	8	981 (817 - 1756)	648 (372 - 2886)	1260 (876 - 2203)	0.98	786 (446 - 1152)	1116 (899 - 1318)	576 (421 - 1057)	0.13
	Ž	8	675 (180 - 1068)	720 (524 - 1050)	861.6 (261.1-1847)	0.52	1129 (683 - 1639)	1003 (421 - 3316)	846 (665 - 1225)	0.44
RANKL /OPG (odnos)	M	8	0.10 (0.08 - 0.13)	0.15 (0.09 - 0.25)	0.11 (0.04 - 0.14)	0.19	0.10 (0.09 - 0.25)	0.09 (0.06 - 0.16)	0.11 (0.07 - 0.18)	0.43
	Ž	8	0.10 (0.07 - 0.25)	0.15 (0.08 - 0.18)	0.15 (0.04 - 0.29)	0.89	0.06 (0.04 - 0.14)	0.15 (0.09 - 0.22)	0.07 (0.04 -0.14)	0.45

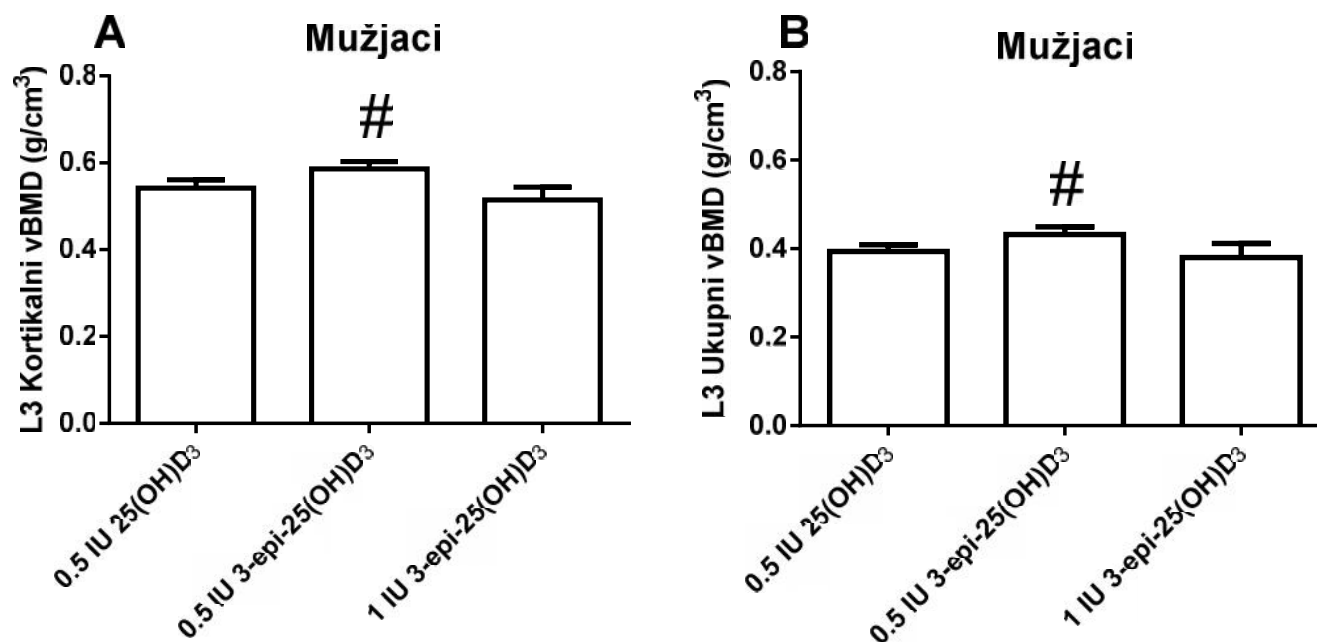
Rezultati su predstavljeni kao medijana, IQR. Uticaj glavnog efekta i interakcije su testirani na logaritmovanim podacima pomoću u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05) \* Efekat vremena p<0.05.

**Tabela 23.** Mineralni sadržaj i gustina kostiju celog tela (WB), femura i lumbarnog pršljena 3 (L3) mladih Sprague Dawley pacova, koji su hranjeni dijetama sa holekalciferolom i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom 8 nedelja.

	Pol	Dijeta			Glavni efekti		Dijeta			Glavni efekti		
		Vreme	Kontrolna grupa	2 IU holekalciferol	4 IU holekalciferol	Dijeta	Vreme*	25(OH)D <sub>3</sub>	0.5 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	1 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	Dijeta	Vreme**
	M		(n=6)	(n=5)	(n=6)	p vred.	p vred.	(n=6)	(n=6)	(n=6)	p vred.	p vred.
	Ž		(n=6)	(n=6)	(n=6)			(n=6)	(n=6)	(n=6)		
WB BMC (g)	M	0	2.43 ± 0.24	2.54 ± 0.65	2.52 ± 0.36	0.50	<0.0001	2.55 ± 0.17	2.21 ± 0.15	2.34 ± 0.46	0.22	<0.0001
		4	9.19 ± 0.60	9.31 ± 1.21	9.30 ± 0.54			9.47 ± 0.81	9.53 ± 0.48	9.12 ± 0.72		
		8	14.87 ± 0.99	14.69 ± 2.02	15.21 ± 0.82			15.23 ± 0.87	15.49 ± 0.68	14.44 ± 1.20		
	Ž	0	2.41 ± 0.32	2.23 ± 0.18	2.55 ± 0.23	0.25	<0.0001	2.29 ± 0.23	2.52 ± 10.26	2.26 ± 0.25	0.76	<0.0001
		4	7.36 ± 0.69	7.07 ± 0.73	7.46 ± 0.28			7.18 ± 0.28	7.37 ± 0.84	7.13 ± 0.46		
		8	10.34 ± 1.07	10.50 ± 0.79	10.82 ± 0.55			10.64 ± 0.55	10.28 ± 1.66	10.27 ± 0.73		
WB BMD (g/cm <sup>2</sup> )	M	0	0.086 ± 0.002	0.087 ± 0.007	0.084 ± 0.002	0.26	<0.0001	0.084 ± 0.002	0.083 ± 0.003	0.081 ± 0.004	0.37	0.371
		4	0.132 ± 0.004	0.131 ± 0.006	0.130 ± 0.004			0.132 ± 0.004	0.133 ± 0.002	0.129 ± 0.004		
		8	0.163 ± 0.004	0.162 ± 0.089	0.162 ± 0.006			0.163 ± 0.006	0.163 ± 0.003	0.165 ± 0.006		
	Ž	0	0.085 ± 0.004	0.084 ± 0.002	0.085 ± 0.002	0.14	<0.0001	0.086 ± 0.002	0.087 ± 0.004	0.084 ± 0.003	0.36	0.078
		4	0.132 ± 0.005	0.128 ± 0.004	0.130 ± 0.005			0.133 ± 0.005	0.129 ± 0.006	0.129 ± 0.006		
		8	0.158 ± 0.005	0.156 ± 0.003	0.155 ± 0.003			0.158 ± 0.003	0.155 ± 0.007	0.156 ± 0.003		
Femur BMC (g)	M	0	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.67	<0.0001	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.67	<0.0001
		4	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.34 ± 0.03			0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.03		
		8	0.65 ± 0.05	0.61 ± 0.09	0.62 ± 0.08			0.64 ± 0.08	0.63 ± 0.04	0.62 ± 0.06		
	Ž	0	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.50	<0.0001	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.35	<0.0001
		4	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03			0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.29 ± 0.02		
		8	0.43 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.05			0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.07	0.43 ± 0.04		
Femur BMD (g/cm <sup>2</sup> )	M	0	0.137 ± 0.033	0.142 ± 0.024	0.147 ± 0.021	0.13	<0.0001	0.146 ± 0.014	0.144 ± 0.011	0.134 ± 0.032	0.83	<0.0001
		4	0.330 ± 0.028	0.302 ± 0.027	0.309 ± 0.051			0.304 ± 0.051	0.300 ± 0.022	0.311 ± 0.019		
		8	0.455 ± 0.024	0.435 ± 0.058	0.422 ± 0.042			0.442 ± 0.042	0.433 ± 0.028	0.442 ± 0.026		
	Ž	0	0.139 ± 0.009	0.148 ± 0.021	0.149 ± 0.023	0.57	<0.0001	0.140 ± 0.025	0.148 ± 0.011	0.144 ± 0.023	0.85	<0.0001
		4	0.288 ± 0.016	0.276 ± 0.035	0.270 ± 0.034			0.282 ± 0.026	0.291 ± 0.049	0.272 ± 0.037		
		8	0.355 ± 0.028	0.376 ± 0.045	0.370 ± 0.024			0.382 ± 0.023	0.371 ± 0.045	0.368 ± 0.046		

L3 BMC (g)	M	0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.24	<0.0001	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.019	<0.0001
		4	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01			0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01		
		8	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02			0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01		
	Ž	0	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.74	<0.0001	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.74	<0.0001
		4	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01			0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01		
		8	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01			0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01		
L3 BMD (g/cm <sup>2</sup> )	M	0	0.111 ± 0.013	0.125 ± 0.010	0.120 ± 0.011	0.018*	<0.0001	0.118±0.012 <sup>a</sup>	0.123±0.005 <sup>a</sup>	0.112±0.010 <sup>b</sup>	0.003	<0.0001
		4	0.235 ± 0.045	0.206 ± 0.015	0.205 ± 0.018			0.207±0.020 <sup>a</sup>	0.218±0.016 <sup>b</sup>	0.215±0.015 <sup>a</sup>	*	
		8	0.286 ± 0.022 <sup>ab</sup>	0.303 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.263±0.022 <sup>a</sup>			0.285±0.018 <sup>a</sup>	0.302±0.013 <sup>b</sup>	0.273±0.013 <sup>a</sup>		
	Ž	0	0.120 ± 0.002	0.128 ± 0.015	0.121 ± 0.007	0.54	<0.0001	0.120 ± 0.008	0.123 ± 0.010	0.128 ± 0.011	0.91	<0.0001
		4	0.230 ± 0.015	0.220 ± 0.019	0.221 ± 0.015			0.227 ± 0.016	0.228 ± 0.024	0.225 ± 0.030		
		8	0.293 ± 0.014	0.292 ± 0.019	0.283 ± 0.025			0.287 ± 0.029	0.278 ± 0.013	0.275 ± 0.029		

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Uticaj glavnih efekata i interakcije su testirani pomoću u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama ( $p < 0.05$ ). Značajne razlike između grupa označene su sa malim slovima u superskriptu u istom redu (glavni efekat dijete ili razlike na početku studije). \*\* Značajan porast vrednosti u period od 1-4 nedelje i od 4-8 nedelje ( $p < 0.05$ ). \*Značajan uticaj dijete prisutan nakon post-hoc korekcija,  $p < 0.02$ .



**Slika 23.**  $\mu$ CT analiza (120  $\mu$ m) lumbalnog pršljena 3 (L3) kod pacova starih 12 nedelja (Sprague Dawley). Stubi i predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  SD, n = 6 pol/dijeta. Značajne razlike su identifikovane pomoću mix modela ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama ( $p < 0.05$ ). # Srednja vrednost značajno različit u odnosu na srednju vrednost 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> referentne grupe.

**Tabela 24.** Rezultati  $\mu$ CT snimanja lumbalnog pršljena (L3) mladih Sprague Dawley pacova, koji su hranjeni dijetama sa holekalciferolom i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom 8 nedelja.

	Dijeta			Glavni efekat		Dijeta			Glavni efekat	
	Pol	Vreme	Kontrolna grupa	2 IU holekalciferol	4 IU holekalciferol	Dijeta	25(OH)D <sub>3</sub>	0.5 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	1 IU3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	Dijeta
	M		(n=6)	(n=5)	(n=6)	P	(n=6)	(n=6)	(n=6)	P
	F		(n=6)	(n=6)	(n=6)	vred.	(n=6)	(n=6)	(n=6)	vred.
Cort. BMC (g)	M	8	69.1 ± 114.7	23.7 ± 2.1	22.0 ± 1.1	0.43	22.5 ± 2.2	23.9 ± 0.8	68.1 ± 115.2	0.41
	F	8	21.7 ± 1.4	20.6 ± 0.9	20.6 ± 2.1	0.27	20.9 ± 1.1	20.6 ± 2.2	23.6 ± 7.1	0.46
Cort. BMD (g/cm <sup>3</sup> )	M	8	0.55 ± 0.04	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.50	0.54 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.001
	F	8	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.30	0.63 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.20
Ukupni BMD (g/cm <sup>3</sup> )	M	8	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.98	0.39 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.004
	F	8	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.79	0.48 ± 0.01	0.46 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.41
Ct. Th mm	M	8	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.93	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.03	0.58
	F	8	0.52 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.70	0.52 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.82
Cort. Area odnos (%)	M	8	39.33 ± 4.54	41.83 ± 8.68	38.07 ± 1.52	0.68	37.79 ± 1.59	38.80 ± 1.19	39.48 ± 4.52	0.87
	F	8	40.62 ± 1.56	40.65 ± 1.31	41.08 ± 4.47	0.72	41.40 ± 2.38	40.61 ± 1.36	40.90 ± 1.86	0.63
Ukupni BMC (g)	M	8	126.6 ± 204.0	44.8 ± 4.2	43.0 ± 2.1	0.42	43.5 ± 6.4	45.6 ± 1.6	125.1 ± 204.7	0.40
	F	8	40.1 ± 2.8	37.4 ± 1.6	39.2 ± 2.2	0.10	38.5 ± 3.3	38.2 ± 5.1	43.9 ± 12.6	0.45
Trab BMC (g)	M	8	54.47 ± 84.90	19.99 ± 3.01	19.75 ± 1.09	0.42	19.62 ± 4.35	20.49 ± 1.49	53.84 ± 85.21	0.40
	F	8	17.15 ± 1.18 <sup>a</sup>	15.34 ± 0.75 <sup>b</sup>	17.41 ± 1.70 <sup>a</sup>	0.015	16.25 ± 2.43	16.49 ± 3.36	18.88 ± 5.28	0.48
Trab BMD (g/cm <sup>3</sup> )	M	8	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.89	0.41 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.06
	F	8	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.45	0.49 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.10
Trab Area odnos (%)	M	8	71.42 ± 5.60	74.06 ± 10.26	70.63 ± 2.55	0.97	69.02 ± 4.40	72.15 ± 3.35	69.55 ± 5.85	0.84
	F	8	72.21 ± 4.37	67.08 ± 3.09	73.09 ± 8.89	0.08	70.20 ± 3.75	72.47 ± 6.89	70.88 ± 2.66	0.13

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Uticaj glavnih efekata i interakcije su testirani pomoću mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05). Značajne razlike između grupa označene su malim slovima u superskriptu u istom redu (glavni efekat dijetete).

**Tabela 25.** Rezultati snimanja strukture dugih kostiju i lumbalnog pršljenja (L3) mladih Sprague Dawley pacova, koji su hranjeni dijetama sa holekalciferolom i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom 8 nedelja.

		Dijeta			Glavni efekat		Dijeta			Glavni efekat	
		Pol	Kontrolna grupa	2 IU holekalciferol	4 IU holekalciferol	Dijeta	25(OH)D <sub>3</sub>	0.5 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	1 IU3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	Dijeta	
		M	(n=6)	(n=5)	(n=6)	p vred.	(n=6)	(n=6)	(n=6)	p vred.	
		Ž	(n=6)	(n=6)	(n=6)		(n=6)	(n=6)	(n=6)		
<b>L3 Trabekularni region</b>											
BMD (g/cm <sup>3</sup> )	M	0.72 ± 0.07	0.69 ± 0.09	0.75 ± 0.10	0.46	0.74 ± 0.17	0.85 ± 0.10	0.76 ± 0.14	0.37		
	Ž	0.91 ± 0.10	0.93 ± 0.11	0.95 ± 0.68	0.13	1.08 ± 0.12	0.97 ± 0.09	0.99 ± 0.07	0.15		
BV/TV (%)	M	24.67 ± 1.85	23.99 ± 2.57	25.82 ± 2.75	0.46	26.00 ± 4.12	28.98 ± 3.47	24.09 ± 4.60	0.16		
	Ž	30.22 ± 2.81	33.37 ± 2.97	31.18 ± 1.90	0.14	33.85 ± 1.64	30.99 ± 3.20	32.37 ± 1.92	0.13		
Tb. N. (1/mm)	M	2.60 ± 0.17	2.48 ± 0.25	2.75 ± 0.22	0.24	2.68 ± 0.36	2.86 ± 0.35	2.55 ± 0.39	0.36		
	Ž	3.30 ± 0.25	3.45 ± 0.17	3.25 ± 0.14	0.21	3.54 ± 0.38	3.20 ± 0.43	3.40 ± 0.13	0.24		
Tb. Th. (mm)	M	0.094 ± 0.003	0.096 ± 0.003	0.094 ± 0.007	0.80	0.097 ± 0.005	0.099 ± 0.003	0.095 ± 0.003	0.17		
	Ž	0.092 ± 0.008	0.096 ± 0.004	0.096 ± 0.003	0.28	0.102 ± 0.006	0.094 ± 0.007	0.095 ± 0.004	0.15		
Tb. Sp. (mm)	M	0.292 ± 0.020	0.297 ± 0.033	0.276 ± 0.021	0.57	0.285 ± 0.035	0.276 ± 0.045	0.277 ± 0.022	0.89		
	Ž	0.231 ± 0.013	0.227 ± 0.016	0.237 ± 0.010	0.46	0.211 ± 0.023	0.234 ± 0.021	0.230 ± 0.009	0.11		
<b>Trabekularni region metafize femura</b>											
Trab. BMD (g/cm <sup>3</sup> )	M	0.52 ± 0.09	0.43 ± 0.09	0.43 ± 0.11	0.56	0.48 ± 0.09	0.47 ± 0.08	0.45 ± 0.09	0.79		
	Ž	0.59 ± 0.12	0.67 ± 0.07	0.65 ± 0.04	0.14	0.73 ± 0.14	0.67 ± 0.20	0.62 ± 0.05	0.39		
BV/TV (%)	M	23.96 ± 3.33	20.89 ± 2.98	20.84 ± 3.89	0.55	22.64 ± 3.17	22.18 ± 2.72	21.49 ± 3.14	0.79		
	Ž	26.55 ± 4.23	29.39 ± 2.57	28.56 ± 1.56	0.14	31.42 ± 4.88	29.33 ± 6.90	27.58 ± 1.64	0.39		
Tb. N. (1/mm)	M	2.89 ± 0.14	2.54 ± 0.35	2.62 ± 0.34	0.33	2.77 ± 0.26	2.75 ± 0.32	2.57 ± 0.22	0.32		
	Ž	3.15 ± 0.50	3.45 ± 0.14	3.35 ± 0.19	0.13	3.59 ± 0.46	3.39 ± 0.59	3.25 ± 0.14	0.37		
Tb. Th. (mm)	M	0.083 ± 0.008	0.082 ± 0.005	0.079 ± 0.007	0.60	0.081 ± 0.005	0.081 ± 0.002	0.083 ± 0.006	0.60		
	Ž	0.084 ± 0.004	0.085 ± 0.004	0.085 ± 0.003	0.89	0.087 ± 0.003	0.086 ± 0.006	0.085 ± 0.003	0.66		
Tb. Sp. (mm)	M	0.181 ± 0.008	0.228 ± 0.101	0.193 ± 0.015	0.49	0.188 ± 0.009	0.191 ± 0.020	0.195 ± 0.009	0.67		
	Ž	0.189 ± 0.024	0.172 ± 0.003	0.176 ± 0.008	0.07	0.170 ± 0.009	0.176 ± 0.017	0.178 ± 0.006	0.46		
<b>Kortikalni region dijafize femura</b>											
Cort. BMD (g/cm <sup>3</sup> )	M	2.63 ± 0.04	2.63 ± 0.03	2.64 ± 0.01	0.68	2.66 ± 0.05	2.64 ± 0.03	2.63 ± 0.03	0.42		
	Ž	2.61 ± 0.06	2.59 ± 0.04	2.63 ± 0.12	0.73	2.59 ± 0.05	2.58 ± 0.06	2.61 ± 0.03	0.62		
Tt. Ar. (mm <sup>2</sup> ) <sub>6</sub>	M	8.407 ± 0.554	8.520 ± 0.679	7.900 ± 0.396	0.09	7.685 ± 1.068	7.995 ± 0.231	8.175 ± 0.610	0.51		
	Ž	6.343 ± 0.889	5.879 ± 0.320	6.048 ± 0.293	0.39	6.129 ± 0.506	5.951 ± 0.652	5.948 ± 0.346	0.79		

Ct. Ar. (mm <sup>2</sup> )	M	8.179 ± 0.463	8.268 ± 0.629	7.734 ± 0.411	0.10	7.481 ± 1.105	7.826 ± 0.268	7.968 ± 0.600	0.52
	Ž	6.136 ± 0.932	5.648 ± 0.259	5.803 ± 0.28	0.36	5.875 ± 0.417	5.682 ± 0.606	5.739 ± 0.276	0.76
Ct. Ar. / Tt. Ar. (%)	M	97.340±1.411	97.065±1.214	97.890±0.533	0.69	97.219±1.208	97.880±1.200	97.460±1.049	0.61
	Ž	96.630±2.183	96.119±1.506	95.950±0.781	0.75	95.928±1.859	95.520±2.165	96.530±1.113	0.62
Ct. Th. (mm)	M	0.596 ± 0.036	0.628 ± 0.063	0.604 ± 0.024	0.42	0.552 ± 0.070	0.596 ± 0.035	0.598 ± 0.031	0.20
	Ž	0.517 ± 0.034	0.515 ± 0.019	0.531 ± 0.009	0.35	0.522 ± 0.018	0.519 ± 0.035	0.523 ± 0.021	0.96

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Uticaj glavnih efekata i interakcije su testirani pomo u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05).

**Tabela 26.** Rezultati merenja snage i elasti nosti kostiju femura mladih pacova starih 12 nedelja (Sprague Dawley) koji su hranjeni 8 nedelja dijetama sa holekalciferolom i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> pomo u testa ja ine kostiju u tri ta ke.

		Dijete						
Test ja ine kosti femura u tri ta ke	Pol	Kontrolna grupa	2 IU holekalciferol	4 IU holekalciferol	0.5 IU 25(OH)D <sub>3</sub>	0.5 IU 3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	1 IU3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	
	M	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	
	Ž	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	
Maks. optere enja savijanja- Fmax (N)	M	123.1 ± 19.7	117.5 ± 24.3	110.3 ± 22.2	105.5 ± 15.9	111.9 ± 16.8	120.5 ± 9.6	
	Ž	98.6 ± 16.1	98.5 ± 6.8	100.5 ± 6.6	103.9 ± 13.4	94.7 ± 11.3	100.7 ± 9.1	
Maks. istezanja - dmax (mm)	M	1.63 ± 0.11	1.71 ± 0.38	1.58 ± 0.30	1.50 ± 0.44	1.69 ± 0.46	1.84 ± 0.56	
	Ž	2.04 ± 0.57	1.69 ± 0.49	1.82 ± 0.73	2.23 ± 0.40	1.81 ± 0.54	1.72 ± 0.42	
Energija preloma - Wbreak (mJ)	M	104.8 ± 16.0	103.3 ± 26.5	95.1 ± 24.9	84.0 ± 33.1	93.0 ± 17.2	103.6 ± 28.8	
	Ž	68.3 ± 21.5	61.3 ± 15.8	71.0 ± 29.6	72.6 ± 21.3	59.2 ± 8.7	79.9 ± 19.2	
Stres - max (MPa)	M	64.6 ± 9.0	63.6 ± 13.7	66.2 ± 18.5	62.4 ± 10.6	63.4 ± 16.0	67.2 ± 3.6	
	Ž	80.5 ± 18.9	89.5 ± 9.4	90.6 ± 15.3	93.1 ± 13.5	89.3 ± 15.5	89.5 ± 7.7	
Istezanje - max (%)	M	6.74 ± 0.72	7.25 ± 2.01	6.23 ± 1.27	5.88 ± 1.94	6.76 ± 2.19	7.87 ± 3.18	
	Ž	8.89 ± 3.12	6.66 ± 1.87	7.20 ± 3.01	8.98 ± 1.87	7.01 ± 2.08	6.85 ± 1.74	
Jangov elasti ni modul (MPa)	M	1107.1 ± 353.1	1018.0 ± 408.3	1666.2 ± 650.1	1444.2 ± 689.6	1355.2 ± 394.8	979.2 ± 577.5	
	Ž	2461.8±1064.3	1951.5±1505.4	2715.7±2624.1	1012.7 ± 1275.1	2244.5 ± 903.1	3131.3 ± 1701.0	

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Razlike izme u grupa su testirane pomo u mix model ANOVA sa Bonferroni post-hoc korekcijama (p<0.05).



## **5. DISKUSIJA**

## **5.1. Diskusija rezultata validacije upitnika o uсталosti konzumiranja namirnica za procenu unosa vitamina D kod mladih žena u Srbiji (WRH-FFQ)**

Održavanje adekvatnog nutritivnog statusa žena u reproduktivnom dobu važan je faktor u zaštiti zdravlja budu ih majki i njihovih novoro enadi <sup>(393)</sup>. Pokazano je da vitamin D utiče na normalan rast i razvoj tokom fetalnog i neonatalnog perioda <sup>(4)</sup>. Vitamin D i njegove funkcije predhodno su detaljno opisani u poglavlju 2.1 ove doktorske teze. Ukratko rečeno, vitamin D je liposolubilni vitamin koji može biti apsorbovan iz namirnica i suplemenata ili sintetisan endogeno u koži. Pored uloge u prevenciji bolesti kostiju, najvažnija uloga vitamina D je pomoć u apsorpciji jona kalcijuma iz tankog creva i održavanje homeostaze kalcijuma u organizmu <sup>(4)</sup>. Adekvatan status vitamina D pre i u toku trudnoće važan je za normalan razvoj <sup>(394)</sup> i povezuje se sa prevencijom loših ishoda u trudnoći kao što su preeklampsija, gestacioni dijabetes i prevremenog rođenja novoro enadi <sup>(5, 6, 8)</sup>. Zato je važno da žene u reproduktivnom dobu uzimaju adekvatne količine svih vitamina i minerala, uključujući i vitamin D. Detaljne preporuke za unos vitamina D date su u poglavlju 2.5.1 prema kojima preporučeni dnevni unos (RDA) iznosi 15 µg/dan vitamina D za sve osobe od 1-70 godina starosti, uključujući i trudnice i žene u laktaciji <sup>(179, 182)</sup>. Prema dostupnim podacima čak 41% svih trudnica u svetu nisu planirane <sup>(395)</sup>. Kako bi se osiguralo da opšta populacija a posebno žene u reproduktivnom dobu konzumiraju dovoljne količine vitamina D, mnoge zemlje su uvele obavezno obogaćivanje namirnica vitaminom D.

Iz svega navedenog proistekao je prvi cilj ove disertacije-validacija WRH-FFQ upitnika za procenu unosa vitamina D kod žena u reproduktivnom dobu u Srbiji, u kojoj nema obaveznog obogaćivanja namirnica vitaminom D. Trenutno se na tržištu Srbije može naći samo nekoliko mlečnih proizvoda obogaćenih vitaminom D na volonterskoj bazi (npr. Imlek AD mleko), kao i nekoliko uvoznih obogaćenih namirnica. Proces validacije obuhvatao je procenu unosa vitamina D pomoću tri metode: dva upitnika WRH-FFQ i 24h-AI (popunjavanja tri puta) i uz određivanje koncentracije biomarkera, sadržaja ukupnog vitamina D(25(OH)D) u krvi, nakon čega je primenjena metoda trijada. Vrednosti koeficijenta validnosti (VC: QI, BI, RI) izmerene u takozvanog 'stvarnog'

unosa (I) i unosa prema upitnicima WRH-FFQ (0.847) i 24h-AI (0.810) bile su visoke (Slika 15), dok je vrednost koeficijenta za biomarker 25(OH)D bila dobra (0.499). Ovi rezultati su u saglasnosti sa koeficijentima validacije, koji su dobijeni pri ispitivanju unosa različitih vitamina kao što su: vitamin B<sub>12</sub> (0.850), karotenoidi (0.850), ukupni karotenoidi (0.550) i folati iz eritrocita (0.750)<sup>(396-398)</sup>. Intervali pouzdanosti (95 % CI) za koeficijente validnosti su uski, sa gornjom granicom intervala manjom od jedan, što je pokazatelj odsustva slučajnih grešaka pri primeni i obradi oba upitnika. Dodatno je na ovaj način pokazan kvalitet same studije i odsustvo pogrešnih pretpostavki u osnovi primenjenog modela trijada<sup>(155, 399)</sup>.

U ovoj studiji su 422 mlade žene, u reproduktivnom dobu, popunile WRH-FFQ, na osnovu koga je procenjeni prosečan unos vitamina D iznosio 4 µg/dan. Dobijeni rezultati su upoređeni sa podacima o unosu vitamina D u Srbiji kod odraslih žena (5 µg/dan), dobijenim pomoću dnevnika ishrane u toku sedam dana<sup>(400)</sup>. Relativna razlika u procenjenom unosu vitamina D mogla bi se objasniti razlikom u različenju unosa vitamina D, zbog korišćenja starije verzije tablica o sastavu namirnica, koja je više oslonjena na prerađevane nego na kvantitativno određene podatke o sastavu namirnica. Takođe, u studiji Gurinovi i saradnika, učesnice su u proseku bile starije u odnosu na žene u našoj studiji i sa većim rasponom starosne dobi. Dodatno, rezultati studije, dobijeni pomoću WRH-FFQ i 24h-AI upitnika su slični rezultatima studija sprovednim u regionu, koje su unos vitamina D procenjivale koristeći alternativni FFQ (Portugal: 4 µg/dan)<sup>(401)</sup> ili 24h-AI upitnike (Poljska: 4 µg/dan; Mađarska: 2 µg/dan)<sup>(402, 403)</sup>. Od 422 ispitanice, manje od 5 % je uzimalo suplemente sa vitaminom D, ali nijedna žena nije konzumirala neke od retkih namirnica bogatih vitaminom D, koje su dostupne na našem tržištu (npr. dugotrajno mleko Imlek AD) i obuhvaćene su upitnikom.

Prema zvaničnim kriterijumima IOM, koncentracija 25(OH)D u plazmi ispod 30 nmol/L povezuje se sa deficijencijom, dok se koncentracija između 30 i 50 nmol/L generalno smatra neadekvatnom za zdravlje kostiju i opšte zdravlje ljudi<sup>(181)</sup>. Prema ovim kriterijumima u našoj studiji 90 % (n=18) žena imalo je koncentraciju 25(OH)D u plazmi ispod 50 nmol/L, a njih 70 % (n=16) status niži od 30 nmol/L, koji se povezuje sa deficijencijom. Jedan od razloga za ovako nizak status vitamina D može se pripisati vremenu sakupljanja uzoraka krvi (kraj zimskog perioda, mart 2011.). Prema studijama

ura enim u drugim evropskim državama, deficijencija vitamina D je najviše rasprostranjena u zimskom periodu (januar-mart). U studiji sprovedenoj u Finskoj, u februaru i martu, koncentracija 25(OH)D u krvi bila je u proseku 47 nmol/L <sup>(404)</sup>. Tako e, u populaciji odraslih ljudi u Irskoj koncentracija 25(OH)D < 30 nmol/L, odosno < 50 nmol/L, bila je prisutna kod 11%, odnosno 55% ispitanika u zimskom periodu <sup>(405)</sup>. U pore enju sa skandinavskim zemljama, kupovina ribe i plodova mora, kao glavnih prirodnih izvora vitamina D, u Srbiji je ekstremno niska (3.1% od ukupnog budžeta za hranu) <sup>(406)</sup>, ime se dodatno može objasniti ovako nizak unos vitamina D iz osnovnih namirnica, odnosno status vitamina D.

Prema predhodnim studijama, za ve inu namirnica, koeficijenti korelacije izme u podataka dobijenih primenom upitnika i odre ivanjem koncentracije biomarkera kre u se od 0.3 do 0.5 <sup>(407)</sup>. Ovakve korelacije pružaju korisne i objektivne dokaze o validnoj proceni unosa odre enih namirnica pomo u primenjenih upitnika. U našoj studiji, vrednost Spearman-ovog koeficijenta korelacije ( $r=0.422$ ,  $p = 0.032$ ) izme u odre enog biomarkera i procenjenog ukupnog nekorigovanog unosa vitamina D (pomo u WRH-FFQ) pokazao je umereno slaganje. Vrednost koeficijenta, izra unata sa podacima unosa vitamina D, koji su korigovani za energetske unos (korigovani unos), je bila gotovo jednaka ( $r=0.415$ ,  $p = 0.001$ ), ali je statisti ka zna ajnost bila znatno ve a. Jedno od potencijalnih objašnjenja za umereno slaganje biomarkera i nekorigovanog unosa vitamina D procenjenog sa WRH-FFQ može biti vremenski period u kome su uzorci sakupljeni (kraj zimskog perioda). U toku zimskih meseci, kada je endogena sinteza vitamina D minimalna, naše telo se pored unosa namirnicama i suplementima, oslanja na depoe vitamina D u masnom tkivu. Depoi vitamina D mogu biti izvor potrebnog vitamin D u proseku od 30 do 60 dana u toku zime, uz pretpostavku da je status vitamina D pre zime bio adekvatan <sup>(408)</sup>. Me utim, u zimskom periodu koji je duži od dva meseca, tokom koga unos vitamina D nije adekvatan, depoi u organizmu su iscrpljeni, posebno na kraju zimskog perioda. Kao što je prikazano u tabeli 6, žene koje su u estvovala u našoj studiji su bile mlade i zdrave. Procenat masno a i masnog tkiva u njihovom organizmu bio je u preporu enom opsegu (tabela 6), pa uzrok neadekvatnog statusa vitamina D ne može biti deponovanje vitamina D u masnom tkivu, kao što je slu aj kod gojaznih osoba <sup>(409)</sup>.

Za izvođenje ove studije validacije izabran je zimski period, kada je endogena sinteza vitamina D minimalna zbog smanjenog UVB zračenja. Procena u zimskom periodu, u kombinaciji sa izborom ispitanika normalne telesne mase, ini idealan vremenski okvir za procenjivanje unosa vitamina D pomoću anketa ishrane bez uticaja faktora gojaznosti kod ispitanika. Vodeći se preporukama IOM, rezultati studije dobijeni primenom oba upitnika ukazuju da nijedna žena nije dostigla preporučeni dnevni unos (RDA od 15 µg/dan) vitamina D, a 96% ispitanih žena nisu dostigle procenjene prosečne potrebe (EAR od 10µg/dan) za unos vitamina D. Od 20 žena kojima je određen status vitamina D u krvi, kod 90% je koncentracija 25(OH)D bila ispod 50 nmol/L, što je bilo ekvivalentno jer je unos vitamina D iz namirnica kod svih žena u pod-grupi bio ispod preporučeni 15 µg/dan (RDA). U ovoj pod-grupi žena procenjeni unosi vitamina D pomoću WRH-FFQ i 24h-AI bili su vrlo slični, i ujednačeni u proceni da nijedna od žena nije koristila suplemente vitamina D. Međutim, primenom WRH-FFQ upitnika na grupi od 422 žene, utvrđeno je da je 4.7% žena koristilo suplemente vitamina D. Rezultati o unosu vitamina D, dobijeni u ovoj studiji, evidentno ukazuju na neophodnost razmatranja obogaćivanja namirnica vitaminom D u Srbiji, zatim edukacije mladih žena, kao i povećanja broja pristupa njihovim multivitaminским i jednokomponentnim suplemenatima vitamina D za sve uzraste na tržištu Srbije.

Pošto u Srbiji obavezno obogaćivanje namirnica vitaminom D ne postoji i nije zakonom regulisano, to je jedan od razloga zašto primenom upitnika mleko nije registrovano u grupu od 6 namirnica - najboljih izvora vitamina D. U zemljama, koje obogaćuju namirnice vitaminom D, najčešće se obogaćuju sokovi, mleko i mlečni proizvodi. Prema podacima iz 24h-AI upitnika, procenjeni unos mleka od strane učesnica studije je  $116.5 \pm 90.1$  ml/dan, a jogurta  $109.2 \pm 93.6$  ml/dan. Ako bi hipotetički samo mleko bilo obogaćeno vitaminom D, kao što je slučaj u svim zemljama Severne Amerike <sup>(25)</sup> ( $0.87-1\mu\text{g}/100\text{ mL}$  mleka), unos vitamina D bi na dnevnom nivou bio viši za  $1.5 \pm 1.1$  µg. Ovo bi dovelo do povećanja unosa vitamina D kod žena u reproduktivnom periodu, ali nedovoljnog da se poboljša status vitamina tokom zimskih meseci. Kako je vitamin D prepoznat kao jedan od „dva velika“ vitamina sa kojima je preko potrebno povećati obogaćivanje namirnica u celoj Evropi <sup>(26)</sup>, bilo bi mudro i u Srbiji razmotriti mogućnost obaveznog obogaćivanja namirnica vitaminom D. Ukoliko se ponašanje sa obogaćivanjem

namirnica vitaminom D u Srbiji u budućnosti, WRH-FFQ treba prilagoditi i osigurati da obuhvata sve nove izvore vitamina D i da omogućava adekvatno procenjivanje povećanog unosa vitamina D.

Prednosti prezentovane studije validacije upitnika WRH-FFQ obuhvataju:

- J na in sakupljanja podataka (popunjavanje WRH-FFQ u prisustvu stručnog lica u oblasti ishrane, sprovođenje studije tokom zimskog perioda);
- J izbor zdravih mladih žena koje nisu gojazne za učesnike u studiji;
- J u okviru WRH-FFQ upitnika data je detaljna lista namirnica sa uključenim fotografijama različitih porcija, kao i detaljna pitanja o unosu suplemenata.
- J analiza metabolita vitamina D u referentnoj laboratoriji u Kanadi uz NIST i DEQAS, uzorkovanje je osigurana kontrola kvaliteta analiza.

Iako je studija imala zadovoljavajući broj učesnika koji su popunili WRH-FFQ (n=422)<sup>(410, 411)</sup>, samo uzorci plazme 23 žene bili su na raspolaganju za određivanje koncentracije ukupnog sadržaja vitamina D u studiji validacije, što predstavlja mali uzorak. U drugim publikovanim studijama validacije, u kojima je primenjivana metoda trijada, uključen je sličan broj učesnika (n=29)<sup>(396)</sup>. Uzak interval pouzdanosti od 95% za koeficijente validacije dodatno ukazuje da je broj učesnika uključen u studiju validacije biomarkerom adekvatan. Potencijalno ograničene primenjene metode trijada može biti zbog određivanja koncentracije 25(OH)D u jednoj probi, čime nisu uzete u obzir potencijalne slučajne greške pri određivanju ovog biomarkera<sup>(412)</sup>. Dodatno ograničene, koje može imati uticaja na procenjenju validnost WRH-FFQ i rezultate ove studije, je samostalna procena učesnika količine unetih namirnica zabeleženih sa dva primenjena upitnika (eng. self-report instruments)<sup>(413, 414)</sup>. Glavni razlog zašto je tokom unakrsne klasifikacije 20 % učesnika klasifikovano u suprotni kvartil bio je unos ribe (tuna, sardine ili pastrmke), koji je zabeležen WRH-FFQ upitnikom, u okviru konzumiranja namirnica tokom 30 dana, ali ne i u nekom od tri 24h-AI. Iako se primenjeni 24h-AI upitnik oslanja na memoriju učesnika studije i sposobnost da procene veličinu porcije, to se ne smatra nedostatkom, jer su učesnice bile mlade žene koje su veličinu porcija procenjivale pomoću albuma sa fotografijama<sup>(415)</sup>.

Glavne prednosti WRH-FFQ upitnika su što uključuje tradicionalne namirnice Srbije i celog CEE regiona, jednostavna primena koja je dodatno olakšana sa fotografijama porcija različitih veličina, time je ukupno vreme potrebno za popunjavanje ovog upitnika smanjeno na ispod 30 minuta <sup>(415)</sup>. Pored toga, WRH-FFQ upitnik ima potencijalnu primenu u proceni unosa vitamina D i hranljivih supstanci u nutritivnim kliničkim istraživanjima zbog niskih troškova njegove primene i obrade. Potrebno je da se validnost WRH-FFQ upitnika dodatno proveriti i na drugim populacijama žena svih stepena obrazovanja, jer su u ovoj studiji sve učesnice bile sa visokim obrazovanjem.

## **5.2. Unos i status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i kod novorođenadi**

Cilj ove studije bio je da se ispita unos i status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje u Srbiji, zemlji u kojoj namirnice nisu obogaćene vitaminom D, kao i da se odredi udeo C-3-epimera 25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom 25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na zdravstvene ishode majki i novorođenadi.

Koliko je velika potreba za novim studijama koje razmatraju povezanost preeklampsije i statusa vitamina D trudnica, i na koji način su ovakva istraživanja naučno opravdana, detaljno je objašnjeno u poglavlju 2.9 ove doktorske teze. Ukratko, preeklampsija čini 2–8 % svih komplikacija u trudnoći i uzrok je smrti majki u 16 % slučajeva <sup>(269)</sup>. Na osnovu objedinjenih rezultata iz 24 zemlje u razvoju, WHO je ukazala na učestalost preeklampsije i eklampsije od 4 % <sup>(271)</sup>. Kada je prisutna preeklampsija, kao poremećaj povezan sa placentom, može doći do zastoja u intrauterinom razvoju i do prevremenog porođaja, što dalje može ugroziti zdravlje novorođenadi <sup>(271)</sup>. I pored svih ovih činjenica, etiologija preeklampsije je i dalje nepoznata, dok patofiziologija uključuje razvoj hipertenzije. U patogenezu preeklampsije uključeni su brojni fiziološki procesi na koje može uticati status vitamina D i dostupnost prekursora, 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>), za sintezu aktivnog metabolita 1,25-dihidroksivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) <sup>(416)</sup>. Zaključak najnovijeg izveštaja <sup>(417)</sup> i dva rada sistematskog pregleda literature, koja uključuju 25 studija, je da neadekvatan status vitamina D (definisan kao sadržaj 25(OH)D < 20 ng/mL) tokom trudnoće povećava rizik za nastanak preeklampsije <sup>(265, 266)</sup>. Nedavna

meta-analiza je tako e potvrdila da žene u trudno i, iji je nivo 25(OH)D<sub>3</sub> u serumu manji od 20 ng/mL (50 nmol/L), imaju pove an rizik za razvoj preeklampsije, za prevremeni poro aj i novoro en ad malu za gestacionu starost <sup>(5, 267)</sup>, što je u saglasnosti sa predhodnim publikacijama <sup>(418-420)</sup>. Me utim, kako su skoro sve studije, uklju ene u meta-analizu, bile sprovedene u zemaljama koje oboga uju namirnice vitaminom D, pitanje je da li je isti slu aj kod trudnica u zemljama u kojima se hrana ne oboga uje ovim vitaminom. Zanimljivo je da su nedavno objavljen rezultati kohort-studije, sprovedene u SAD (1959-1966.) pre programa oboga enja namirnica vitaminom D, gde su trudnice ija je koncentracija 25(OH)D u krvi bila iznad 20 ng/mL imale 40 % manji rizik za razvoj preeklampsije u odnosu na trudnice ija je koncentracija 25(OH)D u krvi bila niža od 20 ng/mL <sup>(421)</sup>.

U Srbiji, gde hrana nije oboga ena vitaminom D, stopa preeklampsije je ve a u zimskom periodu <sup>(388)</sup>. Tako e, u zimskom periodu endogena sinteza vitamina D je minimalna usled smanjenog intenziteta UVB zra enja. Pored toga, namirnice oboga ene ili prirodno bogate vitaminom D su u Srbiji slabo prisutne u prodaji, a i upotreba suplemenata vitamina D je retka me u odraslim osobama. Odgovor na suplemenatciju vitaminom D dodatno komplikuje prisustvo C-3 -epimera 25(OH)D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>), iji udeo u ukupnom sadržaju 25(OH)D može biti i do 60 % kod beba, a kod odraslih do 17 % <sup>(50, 100, 105, 106)</sup>. Prisustvo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pup ane vrpce ukazuje da postoji prenos sa majke na novoro en e. Me utim, funkcija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> do danas nije poznata, iako je prošlo nekoliko godina od njegovog otkri a. Tako e, ne postoje smernice u pogledu tuma enja koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> prisutnog u krvi od strane zvani nih institucija. Važe e preporuke IOM se odnose samo na koncentracije ukupnog 25(OH)D od 20 ng/mL (50 nmol/L) potrebne za o uvanje zdravlja kostiju, dok se koncentracije ispod 12 ng/mL (30 nmol/L) povezuju sa nedostatkom ovog vitamina <sup>(179)</sup>.

Da bi se postiglo optimalno zdravlje, važno je da žene u reproduktivnom dobu, trudnice i njihova deca uzimaju preporu ene koli ine vitamin D (RDA) od 600 IU/dan (15 µg/d) za osobe od 1–70 godina starosti i 400 IU/dan (10 µg/d) za novoro en ad (0-12 meseci) <sup>(182)</sup> što je detaljno opisano u poglavlju 2.6. Me utim, postoje situacije u kojima i pored redovnog uzimanja prenatalnih multivitaminских preparata sa vitaminom D, trudnice nisu



u stanju da dostignu preporu ene koncentracije vitamina D u krvi <sup>(24, 236, 296)</sup>. Podaci dostupni za opštu populaciju u Srbiji ukazuju da je unos vitamina D znatno ispod preporu enog nivoa od 15 µg/dan <sup>(391, 403)</sup>.

Detaljnim uvidom u na in ishrane i navike u ishrani trudnica prime eno je da su trudnice u kontrolnoj grupi uzimale više suplemenata sa vitaminom D u odnosu na trudnice sa preeklampsijom, iako nije bilo statisti ki zna ajne razlike u unosu suplemenata niti u ukupnom unosu vitamina D iz svih egzogenih izvora. Razli ite navike u ishrani trudnica sa preeklampsijom ogledale su se u ve em unosu proizvoda od belog brašna, mesa i prera evina, dok unos vo a, povr a, mleka i mle nih proizvoda nije dostigao preporu eni nivo porcija na dan. Prema preporukama vodi a za potrebne dnevne porcije hrane (eng. Food Guide Servings), u trudno i treba uklju iti 2 do 3 dodatne porcije bilo koje od etiri grupe namirnica na dnevnom nivou <sup>(368)</sup>. Trudnice sa preeklampsijom su uzimale 12 porcija (10 porcija proizvoda od brasna i 2 porcije mesa) više u odnosu na broj preporu en u trudno i, dok unos porcija mleka, vo a i povr a nije bio dovoljan. Sa druge strane, trudnice u kontrolnoj grupi su prekora ile preporu eni unos porcija za vo e i povr e, kao i porcija žitarica i mesa (Tabela 12). Zaklju ci nekoliko studija, u kojima su u estvovala majke sa preeklampsijom i bez nje, ukazuju na mogu i korisni efekat pove anog unosa vo a i/ili povr a (dijetarnih vlakana i polifenola) na preeklampsiju <sup>(422, 423)</sup>.

Trudnice sa preeklampsijom imale su ve i BMI pre trudno e i na samom poro aju u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 10). Ve em BMI na poro aju kod trudnica sa preeklampsijom verovatno je doprineo pove an broj unetih porcija prostih ugljenih hidrata, mesa i ulja na dnevnom nivou, a samim tim ve i unos proteina i ve i ukupni energetski unos. Ve i BMI na poro aju kod trudnica sa preeklampsijom potencijalno je mogao da uti e na njihovu smanjenu koncentraciju 25(OH)D u krvi, jer je ranije utvr eno daje pove anje udela masnog tkiva i BMI u negativnoj korelaciji sa statusom vitamina D <sup>(424)</sup>. Iako je procenjeni dnevni unos bio sli an kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje, trudnice sa ve im BMI mogle su tokom vremena deponovati više cirkulišu eg 25(OH)D u masno tkivo <sup>(424, 425)</sup> i u initi ga nedostupnim, što je moglo doprineti nižem statusu vitamina D koji je registrovan u PE grupi.

Rezultat ove studije, koji treba posebno ista i, je visoka zastupljenost nedovoljnog i neadekvatnog statusa vitamina D kod trudnica i novoro enadi (Slika 16 i Slika 17). Sli ni rezultati za status vitamina D su dobijeni kod trudnica sa preeklampsijom u Indiji (PE grupa:  $9.7 \pm 4.95$ ; kontrolna grupa:  $14.8 \pm 6.68$  ng/mL vitamina D) koje nisu uzimale suplemente vitamina D<sup>(426)</sup>. U studiji sprovedenoj u Iranu tokom zimskih meseci trudnoce su imale nešto ve e koncentracije 25(OH)D u krvi (PE grupa:  $15.3 \pm 13.6$ ; kontrolna grupa:  $23.3 \pm 15.3$  ng/ml)<sup>(110)</sup>, najverovatnije zbog pove ane endogene sinteze vitamina D usled južnijeg geografskog položaja Irana, a time i pove anog UVB zra enja u odnosu na Srbiju. U kriti kom osvrtu na deficijenciju vitamina D kod majki i novoro enadi u zemljama koje se nalaze na sli noj geografskoj širini kao i Srbija, u estalost deficijencije se kretala od 36 do 72 %<sup>(22, 236)</sup>. Nedavno objavljena studija pokazala je prisustvo teške deficijencije kod 55.7 % zdravih majki i novoro enadi iz Turske<sup>(111)</sup>. Me utim, ak i sa suplementacijom od 400 IU/dan vitamina D, u estalost teške deficijencije može biti i do 50 %<sup>(236)</sup>. To je vrlo sli no rezultatima dobijenim u našoj studiji gde je više od 50 % trudnica sa preeklampsijom bilo u teškoj deficijenciji vitamina D i pored suplementacije od u proseku 250 IU na dan.

Porede i majke i njihovu novoro enad, nivo 25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pup ane vrpce iznosio je 70.4 % od vrednosti nivoa majki iz kontrolne grupe i 81.1 % PE grupe. Ovi rezultati su u saglasnosti sa tipičnih 75% vrednosti detektovanih kod novoro enadi u odnosu na vrednosti 25(OH)D<sub>3</sub> u krvi njihovih majki<sup>(427)</sup>. Deficijencija vitamina D (ukupan 25(OH)<12 ng/mL) bila je rasprostranjena ne samo me u ispitivanim trudnicama ve i kod 80 % novoro enadi, dok je 74 % novoro enadi majki sa preeklampsijom (PE grupa) i 46 % novoro enadi kontrolne grupe bilo u teškoj deficijenciji (<10 ng/mL). Sli na situacija zabeležena je u studiji u Tunisu gde je u teškoj deficijenciji bilo 84 % ispitanih novoro enadi ije su majke imale preeklampsiju<sup>(428)</sup>. Nedavno objavljeni rezultati kohort studije sprovedene u SAD (1959-1966) pokazuju da je bila prisutna velika u estalost deficijencije vitamina D majki i novoro enadi pre programa oboga enja namirnica vitaminom D<sup>(429)</sup>. Time je pokazano da je ovaj problem bio prisutan u razli itim regionima, ali da se on može ublažiti oboga ivanjem namirnica vitaminom D i adekvatnom suplementacijom. Velika u estalost nedostatka vitamina D me u ispitanim trudnicama/majkama i novoro enadima, utvr ena u našoj studiji, ukazuje da je ova

populacija u povećanom riziku za nastanak bolesti kostiju <sup>(430, 431)</sup> i da je potrebno uvesti suplementaciju vitaminom D da bi se korigovalo ovo stanje.

Međutim, potrebno je oprezno pristupiti klasifikaciji u kategorije (nedostatak, nedovoljan i adekvatan) na osnovu statusa vitamina D. Naime, relativno visoke vrednosti procentnog udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom sadržaju 25(OH)D, dobijene pomoću LC MS/MS, pokrenule su pitanje da li treba sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata za određivanje statusa vitamina D. Ovo pitanje je važno zbog daljeg određivanja adekvatnog tretmana u zavisnosti od kategorije statusa vitamina D, ali do sada se malo zna o ulozi 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Dakle, neophodno je bolje razumeti ulogu 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u organizmu da bi se postigao dogovor o odgovarajućim granicama vrednostima za određivanje koncentracija metabolita vitamina D u krvi. Granice vrednosti mogu biti uspostavljene i potvrđene u novim studijama sa jačim dokazima o zdravstvenim ishodima, o funkcijama i značenju metabolita vitamina D. Iako je većina novorođenadi imala nedostatak vitamina D, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> je bio prisutan u svim uzorcima, njegova koncentracija određena je pomoću LC MS/MS u krvi iz pupčane vrpce. Procentni udeo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u sadržaju ukupnog 25(OH)D<sub>3</sub> bio je 7.1 % u kontrolnoj grupi i 8.1 % u PE grupi novorođenadi, u poređenju sa 10 % dobijenih za zdravu novorođenadu u Kanadi koje su majke uzimale suplemente vitamina D <sup>(432)</sup>. Veći udeo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (43 %) detektovan je kod novorođenadi mlađih od mesec dana, koja su rođena u zimskom periodu u Španiji <sup>(109)</sup>. Međutim, koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub> kod španskih (30.4 ng/mL) i kanadskih (26.1 ng/mL) novorođenadi bila je skoro tri puta veća nego kod novorođenadi u našoj studiji (kontrolna grupa: 9.88 ng/mL; PE grupa: 8.11 ng/mL) ukazujući da udeo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> može biti povezan sa ukupnom koncentracijom 25(OH)D<sub>3</sub> i/ili suplementacijom vitaminom D. Kao što je navedeno ranije, nije nađena značajna razlika u koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> između novorođenadi PE i kontrolne grupe, ali je prisutna mala razlika u udelu 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u koncentraciji ukupnog 25(OH)D<sub>3</sub>, koja bi se mogla objasniti manjom gestacionom starošću novorođenadi u PE grupi, jer je ranije zapaženo da su procentna zastupljenost 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom 25(OH)D<sub>3</sub> i godine starosti obrnuto proporcionalni <sup>(49, 112)</sup>. Naime, novorođenad majki sa preeklampsijom rođena su nedelju dana ranije u odnosu na kontrolnu grupu (manja

gestaciona starost), zbog čega bi mogli imati niži procentni udeo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnom 25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na kontrolnu grupu.

Samo poreklo i uloga 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nisu do sada poznati. Postoji svega nekoliko studija sa novorođenadima koje ukazuju da do povećanja koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi dolazi nakon suplementacije vitaminom D i da je prisutan dozno-zavisni odgovor kod novorođenadi tokom prve godine života<sup>(106, 432)</sup>. Zanimljivo je da u studiji na odraslim pacovima endogena sinteza 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> zavisila od unosa holekalciferola, gde je na suplementaciju holekalciferom veći odgovor zabeležen kod ženki u odnosu na mužjake<sup>(117)</sup>. To je otvorilo pitanje da li postoje i na humanom nivou razlike u odgovoru na suplementaciju kod muških i ženskih osoba. Da bi se bolje razumeo značaj, uloga i funkcija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u trudnoći i kod novorođenadi, neophodne su nove studije na humanom i animalnom modelu u budućnosti.

Kada se u trudnoći razvije *diabetes mellitus* tip 1 dodatno je povećan rizik za nastanak preeklampsije<sup>(433)</sup>. Nedavno je kod trudnica sa dijabetesom tip 1 pronađena povezanost 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i HbA1c, ključnog markera kontrole glikemije<sup>(434)</sup>. Ne postoje podaci o povezanosti 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i preeklampsije, ali je povezanost vitamina D i preeklampsije proučavana, o čemu je detaljno pisano u poglavlju 2 ove doktorske teze. Bodnar i saradnici su pronašli da nedostatak vitamina D kod trudnica može biti jedan od faktora rizika za razvoj teškog oblika preeklampsije, ali ne i blažih oblika bolesti. Preeklampsija se smatra teškom, kada je krvni pritisak viši od 160/110 mmHg ili su prisutni proteinurija (5 g/24 sata), edem pluća ili konvulzije<sup>(421)</sup>. Na osnovu ovih kriterijuma, 97 % trudnica sa preeklampsijom, ispitivanih u našoj studiji, imalo je krvni pritisak viši od 160/110 mmHg dok im je koncentracija u krvi ukupnog 25(OH)D bila ispod 20 ng/mL. Smatra se da je ispod granice od 20 ng/mL za 25(OH)D ugrožena produkcija 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, aktivnog oblika vitamina D. I zaista, kod 43 % trudnica (n=12/28) testiranih u našoj studiji i kod 76 % trudnica sa utvrđenim nedostatkom vitamina D (n=13/17), koncentracija 1,25-(OH)<sub>2</sub>D bila je ispod 60 pg/mL (156 pmol/L), što je preporučeni minimum u trećem trimestru trudnoće. Međutim, kod trudnica, čija je koncentracija ukupnog 25(OH)D u plazmi bila iznad 12 ng/mL (11/11), sadržaj 1,25-(OH)<sub>2</sub>D bio je u preporučanim granicama za treći trimester trudnoće od 60-119 pg/mL

(156-309 pmol/L) <sup>(435)</sup>, sugerišu i adekvatnu sintezu 1,25-(OH)<sub>2</sub>D. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da ugrožena produkcija 1,25-(OH)<sub>2</sub>D može biti otkrivana kod 78 % novorođenadi sa nedostatkom vitamina D koji su učestvovali u našoj studiji (PE grupa: 87 %; kontrolna grupa: 59 %), ali zapremina uzoraka krvi novorođenadi nije bila dovoljna da bi se to i analitički potvrdilo.

Poznato je iz ranijih istraživanja (opisanih u poglavlju 2) da je teška preeklampsija povezana sa velikim rizikom za neželjene perinatalne ishode, kao što su zastoj u razvoju novorođeneta i preveremeno rođenje <sup>(419, 436-438)</sup>. Takođe je nedostatak vitamina D u trudnoći doveden u vezu sa povećanim rizikom od porođajca carskim rezom i bakterijskim vaginalnim infekcijama (*bacterium vaginosis*) <sup>(417, 418, 439)</sup>. U našoj studiji 52 % novorođenadi PE grupe i 8 % kontrolne grupe rođeno je pre vremena, pre 37 nedelje gestacije, dok je njih 20 % bilo malo za gestacioni uzrast (eng. small for gestational age –SGA). U isto vreme, 70 % trudnica sa preeklampsijom porodilo se carskim rezom, u poređenju sa svega 3.3 % u kontrolnoj grupi. Pored toga, koncentracija kalcijuma u krvi, kao i ukupni z-skor bili su niži kod novorođenadi majki sa preeklampsijom.

Rezultati ove studije pokazali su da je potreba za nutritivnim intervencijama neminovna, kako bi se poboljšali zdravstveni ishodi trudnica i novorođenadi u Srbiji. Prednost ove studije je što je omogućila sagledavanje različitih navika u ishrani i načinu života trudnica sa preeklampsijom i bez nje i sakupljanje detaljnih informacija o unosu vitamina D iz egzogenih izvora (namirnica i suplemenata) tokom zimskog perioda. Iz dobijenih rezultata proistiće potreba za prenatalnom edukacijom budućih trudnica i majki da bi se smanjili rizici po zdravlje usled nezdravih navika u ishrani i načinu života u trudnoći. Svakako, ova studija nije bez ograničenja od kojih su neka: nedostatak kontrolnih mehanizama za proveru stvarne konzumacije suplemenata vitamina D, jednokratno sakupljanje uzoraka, kao i ograničen broj trudnica sa preeklampsijom za uključivanje u studiju. Ova studija je sprovedena u Kliničkom Centru Srbije, koji je najveći centar za lečenje trudnica sa preeklampsijom u Srbiji, ali je za potrebe sagledavanja situacije preeklampsije na nivou cele zemlje ipak potrebno sakupiti uzorke i iz drugih zdravstvenih centara širom Srbije.

### **5.3 Preliminarno ispitivanje statusa vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i njihovih novorođenadi rođenih pretermeno**

Cilj ove studije bio je da se ispita status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje u Kanadi, zemlji u kojoj su namirnice obogaćene vitaminom D, kao i da se sagleda promena koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod novorođenadi tokom prvih nekoliko nedelja života. Pored toga, analiza sadržaja ukupnog 25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub> i udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod pretermeno rođenih beba imala je za cilj sagledavanje uloge 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, u smislu da li se razlike u njegovom sadržaju mogu primenjivati za predviđanje rasta koštane mase u vremenu punog termina trudnoće.

#### **5.3.1. Vitamin D kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje**

U ovoj preliminarnoj studiji sa malim brojem trudnica utvrđeno je da u esnice nisu koristile suplemente i da je kod trudnica sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice primećen trend nižeg statusa vitamina D, određenog preko ukupnog sadržaja 25(OH)D (PE:13.10 ± 6.58 ng/mL; kontrolna grupa: 16.03 ± 8.83 ng/mL, p=0.514), ali razlika između grupa nije bila statistički značajna (Tabela 15). U Kanadi je u nedavnoj studiji sa velikim brojem uesnica, koju su sproveli Achkar i saradnici, zabeležen nešto veći status vitamina D (ukupan 25(OH)D u PE:18.88 ± 7.08 ng/mL; u kontrolnoj grupi: 20.92 ± 6.88 ng/mL, p<0.0001). Ova studija je sprovedena tokom cele godine, a ne samo u zimskom periodu kada je zbog minimalne endogene sinteza vitamina D očekivan niži sadržaj ukupnog 25(OH)D u krvi<sup>(284)</sup>. U poređenju sa trudnicama iz Srbije koncentracije ukupnog 25(OH)D bile su slične, ali se primećuje niža koncentracija prisutna kod trudnica sa preeklampsijom u Srbiji (PE:11.24 ± 5.12 ng/mL; kontrolna grupa: 16.10 ± 5.54 ng/mL, p=0.0001). Takođe su utvrđene razlike u BMI trudnica sa preeklampsijom u Srbiji (BMI=30.5 ± 6.8) u odnosu na trudnice sa preeklampsijom iz Kanade (BMI=28.9 ± 4.1). Ovo je moglo dodatno uticati na njihovu smanjenu koncentraciju 25(OH)D u krvi, i time smanjenu bioraspoloživost usled većeg taloženja vitamina D u masnom tkivu.

Zabeležena veća koncentracija 25(OH)D<sub>2</sub> u krvi kontrolne grupe ispitanih trudnica najverovatnije je rezultat povećanog unosa vitamina D<sub>2</sub> iz namirnica biljnog porekla prirodno bogatih ovim vitaminom (kvasac, pečurke itd.), jer se u Kanadi namirnice

najviše oboga uju vitaminom D<sub>3</sub> zbog njegove bolje bioraspoloživosti. Smanjen odnos 25(OH)D<sub>3</sub>:24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u grupi trudnica sa preeklampsijom (u odnosu na kontrolnu grupu) reflektuje manju koncentraciju 25(OH)D<sub>3</sub> prisutnu kod ovih trudnica, iako razlika u sadržaju 25(OH)D<sub>3</sub> između u dve grupe trudnica nije bila statistički značajna, na šta je svakako uticao mali broj uesnica u svakoj od ispitivanih grupa i ispitivanje značajnosti razlike između u grupama primenom neparametrijskih testova (Man-Whitney). Povećanje srednje vrednosti procentnog udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u ukupnoj koncentraciji 25(OH)D<sub>3</sub> kod trudnica sa preeklampsijom, u odnosu na kontrolnu grupu, najviše je doprinela velika koncentracija ovog metabolita kod dve trudnice. Ove trudnice nisu prijavile korišćenje suplemenata vitamina D. Kako nije bilo detaljnog uvida u unos namirnica i navike u ishrani trudnica, pretpostavlja se da je unos namirnica obogaenih vitaminom D kod njih bio povećan.

Nedostatak vitamina D (ukupan 25(OH)D < 12 ng/mL) bio je prisutan kod 57% trudnica sa preeklampsijom iz Kanade, koje su se porodile prevremeno u odnosu na 35% trudnica registrovanih u kontrolnoj grupi, dok je nešto veći broj (67%) registrovan kod trudnica u Srbiji<sup>(440)</sup>. Međutim, u ovoj studiji detalji o unosu vitamina D kod trudnica u Kanadi nisu bili dostupni, tako da se njihov unos ne može direktno uporediti sa unosom vitamina D kod trudnica iz Srbije, u koji imamo uvid. Evidentno je da su trudnice u Srbiji konzumirale suplemente vitamina D (u proseku 250 IU), dok je kod njih registrovan jako mali unos vitamina D iz namirnica. Sa druge strane, trudnice iz Kanade nisu uzimale suplemente, ali su im bile dostupne namirnice obogaene vitaminom D, široko rasprostranjene na tržištu. Međutim, prethodne studije pokazuju da i sa suplementacijom od 400 IU/dan vitamina D, uestalost deficijencije može biti i do 50%<sup>(236)</sup>. Iz toga proizilazi pitanje: koja je to doza suplemenata vitamina D dovoljna da zadovolji potrebe trudnica u uslovima kada namirnice jesu/nisu obogaene vitaminom D? Haugen i saradnici ispituju i povezanost unosa vitamina D iz namirnica i suplemenata u zimskim uslovima sa razvojem preeklampsije u Kanadi, gde se sprovodi program obogaenja namirnica vitaminom D, pronašli su da dnevni unos od 400-600 IU vitamina D smanjuje rizik za nastanak preeklampsije za 27%<sup>(416)</sup>. Achkar i saradnici sugerišu da, bez obzira na unos obogaenih namirnica, potrebna je doza od 600 IU/dan vitamina D, kako bi se postigao preporučen status vitamina D u krvi (25(OH)D > 20 ng/mL)<sup>(284)</sup>. Upravo koncentracije ukupnog 25(OH)D niže od 20 ng/mL odgovaraju neadekvatnom statusu i

deficijenciji vitamina D, što se u trudno i povezuje sa rizikom za preveremeni poro aj<sup>(441, 442)</sup> i za razvoj teške preeklampsije<sup>(421)</sup>, koja se naj eš e razvija pre 34 nedelje trudno e<sup>(443)</sup>. Trudnice sa preeklampsijom u Kanadi i u Srbiji, ispitivane u okviru ove doktorke teze, imale su teški oblik preeklampsije, koji je dijagnostikovao ve u drugom trimestru trudno e, sa istovremeno utvr enim neadekvatnim statusom vitamina D (ukupan 25(OH)D<20ng/mL) kod skoro svih ispitanih trudnica. Trudnice sa preeklampsijom u Kanadi porodile su se prevremeno, što je u skladu sa prethodnim saznanjima<sup>(441, 442)</sup>.

Sumiranje rezultata dobijenih iz studija sa majkama sa preeklampsijom i bez nje, u Srbiji i Kanadi, dovodi do zaklju ka da je u cilju smanjenja rizika za nastanak preeklampsije, ali i preveremenog poro aja kod trudnica, potreban adekvatan unos vitamina D. U nekim studijama sugerisano je da je u trudno i potrebno uzimati dozu od 600 IU/dan vitamina D u vidu suplemenata, kako bi se postigao preporu en status vitamina D u krvi (25(OH)D >20 ng/mL). Ova doza bi mogla biti korigovana ukoliko na tržištu postoje namirnice oboga ene vitaminom D. Preporuke Ministarstva javnog zdravlja u Srbiji trebalo bi ažurirati i ukazati na potrebe za posebnom strategijom kako bi se pojava preeklampsije kontrolisala. Takva strategija zahtevala bi najpre edukaciju mladih budu ih majki o važnosti vitamina D i njegovim izvorima, i stimulaciju za pove an unos ovog vitamina kao i kontrolisano izlaganje UVB zra enju (kada je mogu a endogena sinteza vitamina D). Dodatno bi trebalo razmotriti oboga ivanje namirnica vitaminom D na nivou cele Srbije i/ili propisati preporuke za suplementaciju obaveznu u zimskom periodu.

### **5.3.2. Status vitamina D kod novoro eni ad ro enih prevremeno**

Kao što je prikazano u tabeli 16 rezultati novoro eni ad ro enih pre termina, ije su majke imale preeklampsiju nisu se zna ajno razlikovali od kontrolne grupe u pogledu gestacione starosti, vrednostima za apgar skor u prvom i petom minutu, kao ni u antropometrijskim parametrima na ro enju (dužina, telesna masa i obim glave). Tako e, izme u grupa novoro eni ad ro enih, nije bilo zna ajne razlike u koncentraciji analiziranih metabolita vitamina D u prvoj nedelji života. Uo eno je da obe grupe novoro ena ad ro enih imaju ve e koncentracije ukupnog 25(OH)D u odnosu na svoje majke. Razlog tome je suplementacija vitaminom D, kojom su novoro ena ad ro ena bila izložena odmah nakon



ro enja, a uzorak krvi uzet je krajem prve nedelje života. Dakle, efekat suplementacije uoava se ve nakon nekoliko dana.

Kako na početku praenja statusa vitamina D kod prevremeno roenih beba (majki sa PE i bez nje) nije bilo značajne razlike između grupa ni u jednom od posmatranih parametara (Tabela 16), i kako su sva novorođenad (n=19) bila podvrgnuta istom tretmanu u procesu suplementacije vitaminom D, grupe su objedinjene. Kod novorođenadi je praenos vitamina D i promene u koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, kao i povezanost sadržaja metabolita vitamina D i parametara kostiju (mineralnog sadržaja i mineralne gustine kostiju po jedinici površine, procenjenih na osnovu DXA snimaka) u toku prvih pet nedelja života.

Značajan porast unosa vitamina D primeen je nakon treće nedelje života u odnosu na roenje, a zatim i porast u petoj i šetoj nedelji života (Tabela 17). Porast u unosu vitamina D odgovara povećanom unosu mleka, i to ispumpanog majinog mleka, humanog obogaenog mleka i ukupne parenteralne ishrane, gde nije striktno bilo unapred određeno koliko e novorođenad uzeti vitamina D, ve je to zavisilo od njihove ukupne ishrane i telesne mase. U prve četiri nedelje nije u proseku postignut preporučeni dnevni unos za vitamin D od 10 µg (400 IU), ali je status vitamina D ve krajem prve nedelje života ( $19.71 \pm 7.38$  ng/mL) bio vrlo blizak preporukama od 20 ng/mL ukupnog 25(OH)D. Treba napomenuti da se radi o bebama vrlo male telesne mase na osnovu koje je preraunata potrebna količina vitamina D, koja se na osnovu skoro adekvatnog prosečnog statusa vitamina D ispostavila dovoljnom.

Odgovor na kontinuiranu suplementaciju vitaminom D, prikazanu u Tabeli 17, tokom 5 nedelja ispoljen je značajnim povećanjem sadržaja svih analiziranih metabolita vitamina D (25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi(25-OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>2</sub>) u plazmi, osim 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Tabela 18). Slično rezultatima naše studije, studija sa preveremno roenom novorođenadi u Irskoj, nakon 6 nedelja kontinuirane suplementacije od 10 µg (400 IU) vitamina D na dan, pored unošenja vitamina D iz mleka, utvrdila je povećanje koncentracije ukupnog 25(OH)D preko 30 µg/mL, dok drugi metaboliti vitamina D nisu određivani<sup>(444)</sup>. Ispitujući odgovor na suplementaciju vitaminom D tokom prve godine života novorođenadi uoen je porast sadržaja ukupnog 25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi(25-OH)D<sub>3</sub> u prva tri meseca. Koncentracija 3-epi(25-OH)D<sub>3</sub> je zatim opadala kontinuirano u periodu od 3. do 12-og meseca života novorođenadi, bez obzira na davanu dozu vitamina D<sup>(106)</sup>. U interventnoj studiji Jones-

a i saradnika, privremeno ro enim novoro en adima davano je 10 µg -20 µg (400 IU - 800 IU) vitamina D na dan tokom perioda od 8 nedelja. Kao i u našoj studiji uo en je zna ajan porast koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i odnosa 25(OH)D<sub>3</sub>: 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(445)</sup>.

U našoj studiji koncentracija 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nije se zna ano menjala tokom prvih pet nedelja života novoro en adi i pored porasta u koncentraciji ukupnog 25(OH)D, što je tako e prime eno u studiji Jones i saradnika, u toku 4 nedelje <sup>(445)</sup>. Ovaj “zastoj” u C-24-hidroksilaciji ukazuje na nemogu nost novoro en adi da izvrše hidroksilaciju 25(OH)D<sub>3</sub> molekula na položaju C-24 kada je pove an unos vitamina D u organizam, pa je mogu e da je proces epimerizacije na C-3 atomu neka vrsta kompenzacije. “Zastoj” u C-24-hidroksilaciji prime en je nedavno u studijama sprovedenim na deci i odrasima <sup>(445, 446)</sup>, u kojima se sugeriše da se aktivnost CYP24A1 enzima, klju nog za hidroksilaciju, može proceniti sagledavanjem odnosa 25(OH)D<sub>3</sub>: 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Pove anje odnosa 25(OH)D<sub>3</sub>: 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tokom naše studije, kao i zabeležene ve e vrednosti u odnosu na stariju decu i odrasle <sup>(141, 445)</sup>, govore u prilog teoriji da postoji neka vrsta “zastoja” u ekspresija enzima CYP24A1 kod privremeno ro ene novoro en adi dok organizam ne postigne punu zrelost. “Zastoj” u ekspresiji utvr en je, tako e, za neke druge enzime kod preveremeno ro ene novoro en adi <sup>(447)</sup>. Zhou i saradnici obrazlažu da najverovatnije autoregulatorna petlja koja uklju uje i CYP24A1 zahteva odre eno vreme prilago avanja i potpunog sazrevanja nakon ro enja, ali ostavlja se mogu nost da i neki drugi faktori mogu uticati na ekspresiju CYP24A1 i da su nephodna dalja istraživanja na ovom polju<sup>(448)</sup>.

Dodatno, postoji mogu nost da pove ane vrednosti 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i odnosa 25(OH)D<sub>3</sub>: 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> daju neku vrstu fiziološke prednosti privremeno ro enoj deci, ali i dalje ne postoje dokazi za to <sup>(445)</sup>. Prethodno je pokazano da odnos 25(OH)D<sub>3</sub>: 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> linearno raste sa pove anjem koncentracije 1,25(OH)<sub>2</sub>D u periodu velikog zahteva za kalcijumom i fosforom, što je slu aj u trudno i <sup>(449)</sup> i periodu intenzivnog rasta <sup>(450)</sup>. Samim tim mogu e je da pove ane vrednosti odnosa 25(OH)D<sub>3</sub>: 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ukazuju da je omogu ena pove ana koncentracija dostupnog supstrata 25(OH)D<sub>3</sub> za nastanak 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na ra un smanjene koncentracije 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, mada u ovoj studiji nije

bilo uvida u koncentraciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u plazmi novorođenadi. Koja količina osnovnog supstrata  $25(\text{OH})\text{D}_3$  je potrebna za adekvatnu produkciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i oba metabolita  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ostaje da se ispita u budućnosti, kao i da li  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  imaju ulogu u razvoju i metabolizmu kostiju. Neki autori pretpostavljaju da bi  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mogao da ima uticaj na kosti, posebno u zarastanju preloma, ali još uvek ne postoje vrsti dokazi za to<sup>(83, 94)</sup>.

Sa druge strane povećana koncentracija  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  u plazmi odraslih životinja tretiranih dijetama sa  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  nije imala negativan uticaj na kosti u poređenju sa regularnim oblikom  $25(\text{OH})\text{D}_3$ <sup>(116)</sup>. Interesantno je da je kod novorođenadi u našoj studiji povećana koncentracija  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  u plazmi nakon pet nedelja suplementacije vitaminom D bila u korelaciji sa povećanim mineralnim sadržajem (BMC) i mineralnom gustinom (BMD) kičmenih pršljenova L1-4 (Tabela 19). Ipak treba uzeti u obzir da je ova studija sprovedena na jako malom uzorku i da je neophodan dalji rad da bi se odredilo da li zaista ima prednosti na rast i razvoj ovaj jedinstveni metabolizam vitamina D kod novorođenadi. Direktni uticaj  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  na rast i razvoj kostiju najadekvatnije bi bilo ispitati na animalnom modelu u fazi intenzivnog rasta, kao što su mladi pacovi, prasi ili zečevi. Preliminarnim istraživanjem u laboratoriji na McGill zaključeno je da bi merenje promena u BMC i BMD i koncentraciji  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  u plazmi u odnosu na ukupni  $25(\text{OH})\text{D}$  najoiglednije bilo na modelu mladih pacova u odnosu na mlade prasiće, miševe, zečeve i zamorice<sup>(116)</sup>. Dodatno, L3 pacova je najslabije humanom L3 pršljenu pa je moguće sagledati da li zaista povećana koncentracija  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  ima efekat na BMC i BMD kičmenih pršljenova.

Predhodno je pokazano da su novorođenad rođena prevremeno, i mala za svoj uzrast, u riziku za suboptimalni rast i smanjenu mineralizaciju kostiju merenu preko BMC u odnosu na novorođenadu u punom terminu. Ovaj rizik se povećava u trudnoćama sa komplikacijama<sup>(387, 451)</sup>. Posebno se ističe efekat rasta i razvoja koštane mase u najranijem dobu na predviđanja i ostvarivanja rasta koštane mase kod odraslih ljudi<sup>(451, 452)</sup>. Takođe, se ističe važnost majinog mleka i adekvatne ishrane, koja uključuje vitamin D i kalcijum, u prvim danima života za rast i razvoj kostiju i celog tela<sup>(453)</sup> kod prevremeno i u terminu rođene novorođenadi<sup>(454-456)</sup>. Prethodna istraživanja o

povezanosti ishrane i rasta kostiju kod prevremeno rođene novorođenadi pokazala su da dopunska minimalna enteralna ishrana utiče na povećanje mineralnog sadržaja kostiju femura i kicmenih pršljenova<sup>(457)</sup>. Kod prevremeno rođene novorođenadi, koja nisu bila izložena nikakvom dopunskom tretmanu osim majčinog mleka ili humane formule, zabeležene su niže vrednosti BMC i BMD kicmenih pršljenova u odnosu na decu rođenu u terminu iz trudnoća bez komplikacija<sup>(458)</sup>.

Prema našim saznanjima do sada nije poznato da li i na koji način 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> može uticati na rast i razvoj kostiju kod prevremeno rođene beba. Ovo je jedna od prvih studija koja posmatra 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod prevremeno rođene beba. Takođe, ovo je prva studija kojom se skreće pažnja na potencijalno predviđanje mineralizacije kostiju novorođenadi na osnovu koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i ukupnog 25(OH)D, jer je pokazano da su koncentracije ukupnog 25(OH)D i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem minerala i mineralnom gustinom kicmenih pršljenova, u vreme punog termina prevremeno rođene novorođenadi.

## 5.4 Uticaj C-3 -epimera 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> iz endogenih i egzogenih izvora na rast kostiju kod mladih Sprague Dawley pacova

Studija na mladim Sprague Dawley pacovima sprovedena je u cilju razumevanja biološkog odgovora kostiju na izloženost C-3 - epimeru 25-hidroksivitamina D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>), iz endogenih i egzogenih izvora, prat enjem zavisnost telesne mase, mineralizacije i gustine kostiju kod izloženih životinja. Pregled literaturnih podataka o 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, koji ukazuju na zna aj ovakvih istraživanja, dat je u poglavlju 2.3. Ukratko, koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod novoro en adi je zna ajno pove ana u odnosu na odrasle ljude, ine i i do 60% od ukupnog 25(OH)D u pore enju sa 17% kod odraslih osoba <sup>(50, 100, 105, 106)</sup>. Prisutnost 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u tako velikom procentu kod novoro en adi name e pitanja o njegovom poreklu, izvorima i funkcijama, koje su trenutno nepoznate. Po eci istraživanja reakcije epimerizacije 25(OH)D<sub>3</sub>, u okviru metabolizma vitamina D, poklapaju se sa nedavnim otkri em 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> metabolita. Svi glavni metaboliti vitamina D mogu podle i reakciji epimerizacije, koja je fiziološki proces u regulaciji pojedinih steroidnih hormona <sup>(118)</sup>. Epimeri 25(OH)D<sub>3</sub>, C-3 i C-3 , imaju identi nu hemijsku strukturu, dok je osnovna razlika me u njima prisutna asimetrija hidroksilne grupe na poziciji C-3 <sup>(98)</sup>.

Prethodne *in vitro* studije pokazale su da 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> prati sli an metaboli ki put kao i 3 -oblik 25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(47)</sup>. Me utim, 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> imaju manji afinitet vezivanja za vitamin D-vezuju i protein (~36–46%) i za vitamin D-receptor (~2–3%) u pore enju sa 3 - oblicima 25(OH)D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> <sup>(47)</sup>. I pored smanjenog afiniteta vezivanja za receptor vitamina D, 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D ima skoro identi an efekat kao 1,25(OH)<sub>2</sub>D na sekreciju PTH u paratiroidnim elijama gove eta <sup>(115)</sup> i sintezu surfaktanta u alveolarnim elijama <sup>(459)</sup>. Sa druge strane, odgovor kalcijuma zabeležen u Caco-2 elijama u prisustvu 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D je smanjen <sup>(48, 459)</sup>. U *in vivo* studiji na odraslim glodarima zabeležen je dozno-zavisni odgovor endogene konverzije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nakon izlaganja holekalciferolu, bez uticaja na zadržavlje kostiju glodara <sup>(117)</sup>. Me utim, model sa mla im životinjama, koje intenzivno rastu, odražava na adekvatniji na in period rasta i pogodniji je za istraživanja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, jer je prime ena obrnuta zavisnost izme u uzrasta, godina starosti i udela 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u koncentraciji ukupnog

25(OH)D<sup>(112)</sup>. Dodatno je, u randomiziranoj interventnoj studiji, u toku prve godine života novorođenadi zabeležen dozno-zavisni odgovor na suplementaciju holekalciferolom bez uticaja na rast kostiju i sveukupni rast novorođenadi<sup>(106)</sup>. Pitanje, koje se nametnulo, je da li sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> treba određivati u redovnoj kliničkoj praksi ili ne. Nedavno objavljen pregledni rad svih dostupnih informacija o metabolizmu i funkciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> podstakao je diskusiju o potencijalnim posledicama određivanja koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i prikazivanja rezultata zasebno ili u okviru koncentracije ukupnog 25(OH)D<sup>(101)</sup>. Međutim, neophodna su dalja istraživanja kako bi se bolje razumelo da li 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> zaista ima biološki efekat koji se razlikuje od 25(OH)D<sub>3</sub> *in vivo*. Teško je ispitivati da li ove razlike u biološkom efektu postoje kod novorođenadi u humanim studijama, jer 25(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> koegzistiraju u krvi novorođenadi, pa se pribegava animalnim modelima. Stoga je u *in vivo* studijama mladim životinjama pogodan za traženje odgovora na pitanje da li endogeno može nastati 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i kakva je priroda odgovora rasta kostiju na njega, kao i da li 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> iz egzogenih izvora utiče na normalan rast i mineralizaciju kostiju.

Zbog svega navedenog, u okviru ove disertacije urađena je studija, na mladim Sprague Dawley pacovima koji intenzivno rastu, u kojoj je *in vivo* ispitivan biološki odgovor kostiju na izloženost različitim koncentracijama endogenih i egzogenih izvora 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Kod ispitivanih životinja, koje su hranjene dijetama sa različitim sadržajem holekalciferola i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, u periodu od četvrte do dvanaeste nedelje starosti, registrovan je dozno-zavisni odgovor u koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi. U 85.5 % analiziranih uzoraka plazme (n=213) detektovan je 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, donja granica kvantifikacije bila je 2.5 ng/mL (6.25 nmol/L). Kod pacova hranjenih dijetama sa holekalciferolom (kontrola, 2 IU i 4 IU) koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi bila je u rasponu od 2.7- 36.9 ng/mL za mužjake i 2.5 - 58.7 ng/mL za ženke. Ovi rezultati su viši u odnosu na dobijene u studiji sa identičnim protokolom, ali urađenom na odraslim pacovima<sup>(116)</sup>, u kojoj je 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> detektovan u 77% uzoraka, sa koncentracijama u rasponu od 2.5-33.8 ng/mL. Povećana koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod mladih u odnosu na odrasle pacove je u skladu sa zapaženom obrnutim proporcionalnim odnosom između koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i godina starosti kod ljudi<sup>(101, 107, 112, 432)</sup>. Dodatno, kod mladih pacova u našoj studiji, endogena konverzija do 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> zavisila je od

koli ine dijetama unetog holekalciferola (1 IU, 2 IU i 4 IU), sa uo lživijim efektom kod ženki u odnosu na mužjake pacova. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem na odraslim pacovima <sup>(116)</sup>, kao i rezultatima humane studije sa novoro en adima, gde je sa pove anjem doze suplemenata holikalciferola (400, 800, 1200, 1600 IU) rasla koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi <sup>(106)</sup>. Ove studije sugerišu da se sa pove anim unosom holekalciferola pove ava i koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u mladim sisarima usled endogene konverzije.

Kod mladih pacova izloženih egzogenim izvorima 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, unos 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kroz dijete brzo se odrazio na porast njegove koncentracije u plazmi do 95.4 ± 54.7 ng/mL kod mužjaka i 99.7 ± 50.8 ng/mL kod ženki, što je u saglasnosti sa rezulatatima istraživanja na odraslim pacovima (116.5 ± 24.4 ng/mL) <sup>(116)</sup>. Pacovi sa pove anom koncentracijom 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi imali su smanjene koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u pore enju sa referentnom grupom (0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub>) (Slike 20 i 21, C i D). Pad u koncentraciji 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi sa pove anim unosom 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> dijetama mogao bi se objasniti smanjenim afinitetom 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> za CYP24A1 enzim u mitohondrijama u pore enju sa osnovnim oblikom 25(OH)D<sub>3</sub> <sup>(124)</sup>. CYP24A1 katalizuje reakciju hidroksilacije u položaju C-24, odnosno pretvaranje 25(OH)D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> metabolite, koji se eliminišu iz organizma na poznat na in <sup>(460)</sup>. Pored navedenog, kod pacova hranjenih dijetama sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (0.5 IU i 1 IU) na eno je smanjene koncetracije 25(OH)D<sub>3</sub> za 50-60 % u odnosu na koncentracije pacova u AIN-93G kontrolnoj grupi, iako su im gustina kostiju (BMD) i rast bili u normalnim okvirima. Stoga bi se moglo zaklu iti da prisustvo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi u zna ajnom procentu podržava normalan rast i mineralizaciju kostiju. Trebalo bi ista i da su, prema preporukama IOM za humane ekvivalente <sup>(182)</sup>, pacovi na po etku studije imali nedostatak vitamina D (25(OH)D <10 ng/mL). Kontinuirano nizak nivo 25(OH)D<sub>3</sub> (<10 ng/mL) tokom studije detektovan je kod dve grupe pacova, koji su hranjeni dijetama sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (0.5 IU i 1 IU) (Slika 20 c, d) sugerišu i da se 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> iz egzogenih izvora ne prevodi nazad u osnovni -oblik 25(OH)D<sub>3</sub>. Štaviše, konstantno nizak nivo 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod pacova hranjenih dijetom sa 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> (Slika 22 c, d) ukazuje da se proces epimerizacije odvija najverovatnije pre 25-hidroksilacije, sto je u saglasnosti sa prethodnim studijama <sup>(47, 117)</sup>.

Pored navedenog, na kraju studije utvrđeno je značajno sniženje koncentracije PTH kod mužjaka pacova hranjenih dijetama sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (0.5 IU i 1 IU) u poređenju sa pacovima hranjenim 0.5 IU 25(OH)D<sub>3</sub> dijetom. Nagli porast u koncentraciji PTH kod mužjaka hranjenih dijetom sa 25(OH)D<sub>3</sub> na samom kraju studije bi možda mogao osporiti ovo zapažanje. Međutim, uporednom analizom podataka različitih grupa ustanovljeno je da je koncentracija PTH kod mužjaka hranjenih dijetom sa 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> bila značajno niža nego u kontrolnoj grupi (koje je sadržala 1 IU holekalciferola /g hrane) već u četvrtoj nedelji (kontrolna grupa: 455.6 ± 200 pg/mL; 1 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> grupa: 152.7 ± 51.3 pg/mL, p=0.007) ukazujući na supresivni efekat 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na PTH već nakon administracije od 4 nedelje. Slično zapažanje imali su Brown i saradnici, koji su u preliminarnoj studiji sa pacovima (sa uklonjenim bubrezima), koji su uzimali 3-epi-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tokom jedne nedelje, našli smanjenje koncentracije PTH <sup>(126)</sup>.

U našoj studiji, izloženosti ženki pacova 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nije dovela do smanjenja koncentracije PTH, što može biti objašnjeno već niskim-normalnim vrednostima za PTH kod ženki (Slika 23, C i D). Razlike između polova postoje u dnevnom (cirkadijalnom) ritmu za PTH <sup>(461)</sup> kod pacova <sup>(462, 463)</sup> i kod ljudi <sup>(464)</sup>. U rano jutro, skok u koncentraciji PTH se javlja okvirno 2 sata ranije kod ženki u odnosu na mužjake <sup>(461)</sup>, što bi moglo objasniti zašto su zabeležene razlike u PTH odgovoru kod muškog, a ne i kod ženskog pola ako su postojale. Zanimljivo je da koncentracija iCa nije bila izmenjena u bilo kojoj od grupa hranjenih dijetom sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na referentnu grupu hranjenu dijetom sa 25(OH)D<sub>3</sub>, sugerišući da 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> može biti jednako efikasan kao i osnovni 25(OH)D<sub>3</sub> oblik u regulisanju homeostaze kalcijuma kod zdravih glodara u periodu intenzivnog rasta.

Pored niske koncentracije PTH u krvi, mužjaci pacova hranjenih sa 0.5 IU 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> dijetom imali su povećanu ukupnu mineralnu gustinu lumbarnog pršljenja 3 (L3) i mineralnu gustinu koritikalnog tkiva L3, ali ne i trabekularnog tkiva u poređenju sa referentnom 25(OH)D<sub>3</sub> grupom. Odsustvo razlika među grupama u mineralnoj gustini trabekularnog L3 potvrđeno je *ex vivo*  $\mu$ CT merenjem mikrostrukture kostiju L3. Slična zapažanja imali su Bianchini i saradnici u studiji sa odraslim pacovima <sup>(116)</sup>. Pored toga,



nisu uočene razlike između grupa u pogledu jačine (vrstine) i elastičnosti kostiju femura ispitivanih testom jačine kostiju u tri tačke. Naši rezultati su veoma slični prethodno objavljenim vrednostima za parametre vrstine kostiju kod zdravih odraslih pacova i pacova u razvoju<sup>(116, 465)</sup>, osim viših vrednosti za Jangov elastični modul, koji se mogu objasniti uzrastom pacova iz naše studije (12 nedelja). Dalja istraživanja uticaja 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na kosti su sada neophodna kako bi se razjasnilo da li su uočene male razlike u parametrima kostiju fiziološki značajne gledajući i na duge staze.

Dodatna istraživanja su potrebna i u traganju za biološkim izvorima 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, koji su i dalje nepoznati. Hrana i suplementi vitamina D su prethodno razmatrani kao potencijalni izvori ovog epimera. Međutim, merenjem koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u različitim suplementima vitamina D pokazano je da je koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u njima manja od 2% u odnosu na ukupan 25(OH)D<sub>3</sub><sup>(112)</sup>. Dodatno, u humanoj studiji, gde su učesnici imali neadekvatan unos vitamina D, nije pronađena zavisnost između povećane koncentracije 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi i unosa vitamina D iz preko 100 namirnica uključenih u primenjeni upitnik o ustalosti konzumiranja namirnica<sup>(107)</sup>. Naša studija, zajedno sa drugim sličnim istraživanjima pokazala je korelaciju između 25(OH)D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, ukazujući da je najveći doprinos koncentraciji 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi endogenog porekla, kada je unos holekalciferola ishranom povećan<sup>(106, 116)</sup>. Dodatna potpora za ovu tvrdnju je konstantno niska koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u grupi pacova hranjenih 25(OH)D<sub>3</sub> dijetom, čime se potvrđuje da do epimerizacije dolazi pre prve hidroksilacije na poziciji C-25 u jetri.

Iako je jedno od ograničenja ove studije nedostatak analiza 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, vrednosti PTH rezultata ukazuju na dalju hidroksilaciju 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> do 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Ostala ograničenja studije su mala zapremina uzoraka plazme, posebno na samom početku studije, što je bilo ograničenje za neke biohemijske analize. Takođe, nedostatak standarda za 3-epi-24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> onemogućio je analizu ovih metabolita, koji bi dali dalji uvid u metabolizam samog 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Broj pacova unutar grupe n=6 za svaku dijetu i oba pola nije bio dovoljan za uočavanje sitnih promena u parametrima kostiju, ali je bio dovoljan da se identifikuju razlike u

analiziranim metabolitima vitamina D. Duži period od 8 nedelja bio bi potreban da se sagleda eventualna pojava platoa u koncentracijama ispitivanih metabolita vitamina D.

## **6. ZAKLJUČAK**

U skladu sa postavljenim ciljevima i na osnovu prikazanih rezultata izvedeni su sledeći zaključci.

Studijom validacije upitnika o uсталosti konzumiranja namirnica utvrđeno je da primena WRH-FFQ upitnika omogućava procenu unosa vitamina D kod mladih žena u reproduktivnom dobu, u Srbiji gde hrana nije dodatno obogaćena vitaminom D. Prema našim saznanjima ovo je prva studija validacije upitnika za unos vitamina D, u kojoj je validacija urađena primenom metode trijada. Izračunati koeficijenti validacije između stvarnog unosa i unosa procenjenog pomoću upitnika WRH-FFQ (0.847) i 24h-AI (0.810), i određivanjem ukupnog sadržaja 25-OH-D (biomarkera) u plazmi (0.499), potvrdili su visoko slaganje vrednosti unosa i potencijal WRH-FFQ upitnika da adekvatno proceni unos vitamina D. WRH-FFQ je prvi validirani upitnik za procenu unosa vitamina D u centralnoj i istočnoj Evropi. Rezultati ove studije pokazali su, takođe, da je prosečan dnevni unos vitamina D (4 µg/dan) bio ispod preporučenog (10-15 µg/dan) kod svih učesnica u studiji (n=422), dok je nedostatak vitamina D utvrđen kod 70 % ispitanih mladih žena u reproduktivnom dobu u Srbiji. Ovi rezultati mogu biti osnova za razmatranje neophodnosti dodatne suplementacije i obogaćivanja namirnica vitaminom D i uticati na preporuke Ministarstva javnog zdravlja u Srbiji.

Velika uсталost deficijencije vitamina D (ukupni 25-OH-D < 12 ng/mL) registrovana je kod 47 % ispitanih trudnica sa preeklampsijom i bez nje u Srbiji i kod 77 % njihovih novorođenadi. Svi ostali učesnici u ovoj studiji imali su neadekvatan status vitamina D (25-OH-D<sub>3</sub> < 20 ng/ml). Razlog za to, pored neadekvatnog unosa suplemenata i namirnica prirodno bogatih vitaminom D, može biti i nedostatak namirnica obogaćenih vitaminom D na tržištu. Dodatan razlog je i izvođenje studije u zimskom periodu kada je endogena sinteza vitamina D u koži minimalna usled smanjenog UVB zračenja u Srbiji (na geografskoj širini od 44.8° severne hemisfere). Prosečan dnevni unos vitamina D iz namirnica i suplemenata, procenjen pomoću WRH-FFQ, bio je ispod preporučenog (10-15 µg/dan) kod trudnica sa preeklampsijom i bez nje i vrlo sličan u obe grupe ispitanica. Međutim i pored približnog unosa vitamina D trudnice sa preeklampsijom imale su značajno nižu koncentraciju 25-OH-D<sub>3</sub>, 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D u plazmi u odnosu na trudnice bez preeklampsije čime je potvrđena osnovna hipoteza ove studije. U isto vreme nije bilo razlike između grupa u koncentraciji 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi.

Suprotno od majki, koncentracija ukupnog 25-OH-D<sub>3</sub> u plazmi novorođenadi se nije značajno razlikovala između dve grupe, iako su novorođenad majki sa preeklampsijom rođena ranije (manja gestaciona starost) i bila značajno manja po svim antropometrijskim parametrima u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, prvi put je ovom studijom nađeno blago povećanje sadržaja 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub>, izraženog kao procentni udeo od ukupnog 25-OH-D<sub>3</sub>, kod novorođenadi koje su majke imale preeklampsiju u odnosu na kontrolnu grupu. Objedinjeni rezultati ove studije ukazuju da je nedostatak vitamina D jedan od mogućih uzroka za povećan rizik nastanka preeklampsije u zimskom periodu u Srbiji, u odnosu na druga godišnja doba. Utvrđeno je da je nedostatak vitamina D nastao kao posledica ishrane i nađina života trudnica, pored smanjenog intenziteta UVB zračenja. Problematika pojave preeklampsije u Srbiji, na koju se ukazuje ovom studijom, zahteva posebnu strategiju Ministarstva javnog zdravlja kako bi se pojava bolesti vrsto kontrolisala. Naši rezultati sugerišu da bi takva strategija morala da uključuje i najpre edukaciju mladih budućih majki o važnosti vitamina D i njegovim izvorima, a zatim povećanje unosa namirnica i suplemenata sa vitaminom D kao i kontrolisano izlaganje UVB zračenju.

U preliminarnoj studiji, na malom broju (n=19) prevremeno rođene novorođenadi pokazano je da tokom prvih pet nedelja života koncentracija 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> i 25-OH-D<sub>3</sub> značajno raste nakon suplementacije holekalciferolom, kao i odnos sadržaja 25(OH)D<sub>3</sub>:24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. U posmatranom vremenskom periodu koncentracija 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u plazmi nije se značajno menjala ukazujući na nezrelost CYP24A1 (enzima koji katalizuje reakciju hidroksilacije na C-24 položaju) kod prevremeno rođene novorođenadi, nakon pet nedelja postnatalnog života, koja se ogleda u nepotpunoj aktivnosti CYP24A1. Treba istaći da je ovom studijom prvi put sagledana promena koncentracije 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> kod prevremeno rođene novorođenadi, koja je telesna masa izrazito mala, u toku prvih pet nedelja života. Takođe je utvrđena slaba korelacija između koncentracije 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> u plazmi novorođenadi i povećanog mineralnog sadržaja i gustine lumbalnih pršljenova L1-4, što ukazuje na potencijalne pozitivne efekte povećanja koncentracije 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> na gustinu i mineralni sastav kostiju kičmenog stuba.

U cilju razumevanja biološkog odgovora kostiju na 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> na animalnom modelu (Sprague Dawley pacovi) proučena je zavisnost promena telesne mase i biohemijskih parametara, kao i gustine lumbalnog L3 pršljena od sadržaja endogenog i egzogenog 3-epi-25-OH-D<sub>3</sub> kod izloženih životinja. U studiji sa mladim pacovima kontrolisan je unos holekalciferola i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> metabolita putem dijeta, kako bi se usled izloženosti 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> tokom osam nedelja sagledali pozitivni i negativni ishodi kod životinja koje intenzivno rastu. Glavni zaključak ove studije je da je endogeno stvaranje 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> kod mladih pacova dozno zavisno od unosa vitamina D<sub>3</sub>, sa izraženijim efektom kod ženki u odnosu na mužjake pacova. Izloženost egzogenim izvorima 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, putem konzumacije dijeta sa 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, dovodi do brzog porasta njegove koncentracije, a smanjenja koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> iz egzogenih izvora se ne prevodi u 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (smanjena hidroksilacija C-24) u plazmi, kao i koncentracije PTH (supresivni efekat 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> na PTH) kod mužjaka pacova. Tokom perioda od osam nedelja, velika koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi nije značajno uticala na ispitivane biomarkere kostiju (CTX, iCa, RANKL i OPG) u poređenju sa grupom koja je konzumirala dijetu sa 25(OH)D<sub>3</sub>. Takođe, velika koncentracija 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u plazmi podržavala je normalan rast i razvoj kostiju u vidu adekvatne mineralizacije i gustine kostiju. Rezultati ove studije ukazuju da 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> ima biološku funkciju *in vivo* i da su neophodna dalja istraživanja kako bi se sagledao njegov metabolizam i funkcija. Pored toga, rezultati dobijeni tretiranjem mladih pacova različitim koncentracijama holekalciferola i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, u cilju ispitivanja njihovog uticaja na rast kostiju, mogu biti od pomoći pri traženju odgovora na pitanje da li sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> treba razmatrati prilikom procenjivanja statusa vitamina D, jer trenutno ne postoje odrednice od strane zvaničnih institucija kako interpretirati rezultate dobijene za sadržaj 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> u krvi pacijenata.

## **7. LITERATURA**

1. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;95(6):1357-64.
2. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):491s-9s.
3. Paton DN, Watson A. THE ETIOLOGY OF RICKETS: AN EXPERIMENTAL INVESTIGATION. *British medical journal*. 1921;1(3147):594.
4. Basit S. Vitamin D in health and disease: a literature review. *British journal of biomedical science*. 2013;70(4):161-72.
5. Wei SQ, Qi HP, Luo ZC, Fraser WD. Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2013;26(9):889-99.
6. Hypponen E, Cavadino A, Williams D, Fraser A, Vereczkey A, Fraser WD, et al. Vitamin D and Pre-Eclampsia: Original Data, Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of nutrition & metabolism*. 2014;63(4):331-40.
7. Meunier PJ, Chapuy MC, Arlot ME, Delmas PD, Duboeuf F. Can we stop bone loss and prevent hip fractures in the elderly? *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1994;4 Suppl 1:71-6.
8. Grober U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermato-endocrinology*. 2013;5(3):331-47.
9. Comberlati P, Tsabouri S, Piacentini GL, Moser S, Minniti F, Peroni DG. Is vitamin D deficiency correlated with childhood wheezing and asthma? *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2014;6:31-9.
10. Bergman P, Lindh AU, Bjorkhem-Bergman L, Lindh JD. Vitamin D and Respiratory Tract Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PloS one*. 2013;8(6):e65835.
11. Cannell JJ. Autism and vitamin D. *Medical hypotheses*. 2008;70(4):750-9.
12. Cannell JJ. Autism, will vitamin D treat core symptoms? *Medical hypotheses*. 2013;81(2):195-8.
13. Hypponen E. Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association? *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12(9):737-43.
14. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(4):1087s-91s.
15. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & biology*. 2014;21(3):319-29.
16. Holick MF. Chapter 2 - Photobiology of Vitamin D. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 13-22.
17. Ultraviolet light: a hazard to children. *American Academy of Pediatrics. Committee on Environmental Health. Pediatrics*. 1999;104(2 Pt 1):328-33.
18. Specker BL, Valanis B, Hertzberg V, Edwards N, Tsang RC. Sunshine exposure and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in exclusively breast-fed infants. *J Pediatr*. 1985;107(3):372-6.
19. Health Canada. Babies, children and sun safety 2007 [cited 2008 August 25]. Available from: [http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/pubs/sun-sol/babies\\_child-bebes\\_enfant-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/pubs/sun-sol/babies_child-bebes_enfant-eng.php).



20. Zeeb H, Greinert R. The role of vitamin D in cancer prevention: does UV protection conflict with the need to raise low levels of vitamin D? *Deutsches Arzteblatt international*. 2010;107(37):638-43.
21. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Shafaei AR, Karimi F, Madani FS, Larijani B. Vitamin D status in mothers and their newborns in Iran. *BMC pregnancy and childbirth*. 2007;7:1.
22. Weinert LS, Silveiro SP. Maternal-fetal impact of vitamin d deficiency: a critical review. *Maternal and child health journal*. 2015;19(1):94-101.
23. van der Meer IM, Karamali NS, Boeke AJ, Lips P, Middelkoop BJ, Verhoeven I, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant non-Western women in The Hague, Netherlands. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(2):350-3; quiz 468-9.
24. Bodnar LM, Simhan HN, Powers RW, Frank MP, Cooperstein E, Roberts JM. High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *The Journal of nutrition*. 2007;137(2):447-52.
25. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6 Suppl):1710s-6s.
26. de Lourdes Samaniego-Vaesken M, Alonso-Apperte E, Varela-Moreiras G. Vitamin food fortification today. *Food & nutrition research*. 2012;56.
27. Health Canada: Canadian Nutrient File, 2012. Available from URL: <http://webprod3.hc-sc.gc.ca/cnf-fce/> [accessed April 10, 2013] [updated 2012-04-26 Accessed 10 April, 2013].
28. Bagnoli F, Casucci M, Toti S, Cecchi S, Iurato C, Coriolani G, et al. Is vitamin D supplementation necessary in healthy full-term breastfed infants? A follow-up study of bone mineralization in healthy full-term infants with and without supplemental vitamin D. *Minerva pediatrica*. 2013;65(3):253-60.
29. Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF. Vitamin D of human milk: identification of biologically active forms. *The American journal of clinical nutrition*. 1982;36(1):122-6.
30. Canada Go. Food and Drug Regulations B.25.062. Canada: Government of Canada 2016.
31. Hester SN, Hustead DS, Mackey AD, Singhal A, Marriage BJ. Is the macronutrient intake of formula-fed infants greater than breast-fed infants in early infancy? *Journal of nutrition and metabolism*. 2012;2012:891201.
32. Butte NF, Wong WW, Ferlic L, Smith EO, Klein PD, Garza C. Energy expenditure and deposition of breast-fed and formula-fed infants during early infancy. *Pediatric research*. 1990;28(6):631-40.
33. Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, Kolacek S, Koletzko B, et al. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2008;46(1):99-110.
34. Cattaneo A, Williams C, Pallas-Alonso CR, Hernandez-Aguilar MT, Lasarte-Velillas JJ, Landa-Rivera L, et al. ESPGHAN's 2008 recommendation for early introduction of complementary foods: how good is the evidence? *Maternal & child nutrition*. 2011;7(4):335-43.
35. Alvisi P, Brusa S, Alboresi S, Amarri S, Bottau P, Cavagni G, et al. Recommendations on complementary feeding for healthy, full-term infants. *Italian journal of pediatrics*. 2015;41(1):36.
36. Fomon SJ, Nelson SE. Body composition of the male and female reference infants. *Annual review of nutrition*. 2002;22:1-17.
37. Butte NF, Hopkinson JM, Wong WW, Smith EO, Ellis KJ. Body composition during the first 2 years of life: an updated reference. *Pediatric research*. 2000;47(5):578-85.

38. Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M. Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(2):183-91.
39. Hannemann A, Thuesen BH, Friedrich N, Volzke H, Steveling A, Ittermann T, et al. Adiposity measures and vitamin D concentrations in Northeast Germany and Denmark. *Nutrition & metabolism*. 2015;12:24.
40. Zhang M, Li P, Zhu Y, Chang H, Wang X, Liu W, et al. Higher visceral fat area increases the risk of vitamin D insufficiency and deficiency in Chinese adults. *Nutrition & metabolism*. 2015;12:50.
41. Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *International journal of obesity (2005)*. 2012;36(3):387-96.
42. Rajakumar K, Fernstrom JD, Holick MF, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D status and response to Vitamin D(3) in obese vs. non-obese African American children. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2008;16(1):90-5.
43. Wei Z, Dorothy T. Vitamin D. *Handbook of Vitamins, Fifth Edition*: CRC Press; 2013. p. 51-88.
44. Lo CW, Paris PW, Clemens TL, Nolan J, Holick MF. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *The American journal of clinical nutrition*. 1985;42(4):644-9.
45. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *European journal of nutrition*. 2013;52(2):429-41.
46. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):582s-6s.
47. Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, et al. C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers: 25-hydroxyvitamin D3 is metabolized to 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 and subsequently metabolized through C-1alpha or C-24 hydroxylation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(16):15897-907.
48. Kamao M, Tatematsu S, Sawada N, Sakaki T, Hatakeyama S, Kubodera N, et al. Cell specificity and properties of the C-3 epimerization of Vitamin D3 metabolites. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;89-90(1-5):39-42.
49. Bailey D, Perumal N, Yazdanpanah M, Al Mahmud A, Baqui AH, Adeli K, et al. Maternal-fetal-infant dynamics of the C3-epimer of 25-hydroxyvitamin D. *Clinical biochemistry*. 2014;47(9):816-22.
50. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SK. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(8):3055-61.
51. Reddy GS, Muralidharan KR, Okamura WH, Tserng KY, McLane JA. Metabolism of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and its C-3 epimer 1alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D(3) in neonatal human keratinocytes. *Steroids*. 2001;66(3-5):441-50.
52. Willnow TE, Nykjaer A. Cellular uptake of steroid carrier proteins--mechanisms and implications. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;316(1):93-102.
53. Stocklin E, Eggersdorfer M. Vitamin D, an essential nutrient with versatile functions in nearly all organs. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernahrungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2013;83(2):92-100.

54. Hewison M, Adams JS. Chapter 45 - Extrarenal 1 $\alpha$ -Hydroxylase. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 777-804.
55. Reddy GS, Tserng KY. Calcitric acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry*. 1989;28(4):1763-9.
56. Speeckaert MM, Speeckaert R, van Geel N, Delanghe JR. Vitamin D binding protein: a multifunctional protein of clinical importance. *Advances in clinical chemistry*. 2014;63:1-57.
57. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2011;25(4):543-59.
58. Pike JW, Meyer MB, Lee SM. Chapter 7 - The Vitamin D Receptor: Biochemical, Molecular, Biological, and Genomic Era Investigations. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 97-135.
59. Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, et al. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D<sub>3</sub> analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2002;16(6):1243-56.
60. White JH. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2012;13(1):21-9.
61. Bikle D, Adams J, Christakos S, Rosen C. Vitamin D: production, metabolism, mechanism of action, and clinical requirements. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2008:141-9.
62. Zhang J, Chalmers MJ, Stayrook KR, Burris LL, Wang Y, Busby SA, et al. DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR-RXR complex. *Nature structural & molecular biology*. 2011;18(5):556-63.
63. Carlberg C. Chapter 11 - Target Genes of Vitamin D: Spatio-temporal Interaction of Chromatin, VDR, and Response Elements. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 211-26.
64. Holt E, Wysolmerski JJ. Chapter 41 - Parathyroid Hormone, Parathyroid Hormone-Related Protein, and Calcitonin. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 725-45.
65. David V, Quarles LD. Chapter 42 - FGF23/Klotho New Regulators of Vitamin D Metabolism. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 747-61.
66. Silver J, Naveh-Many T. Chapter 27 - Vitamin D and the Parathyroids. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 493-506.
67. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;25(4):531-41.
68. Witschi AKM, Liesegang A, Gebert S, Weber G, Wenk C. Effect of source and quantity of dietary vitamin D in maternal and creep diets on bone metabolism and growth in piglets. *Journal of animal science*. 2011;89(6):1844-52.
69. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporosis International*. 2005;16(7):713-6.
70. Kuro-o M. Klotho. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2010;459(2):333-43.
71. Heaney RP. Chapter 34 - Vitamin D: Role in the Calcium and Phosphorus Economies. In: Adams DFWPS, editor. Vitamin D (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 607-24.
72. Wöhrle S, Bonny O, Beluch N, Gaulis S, Stamm C, Scheibler M, et al. FGF receptors control vitamin D and phosphate homeostasis by mediating renal FGF-23 signaling and regulating FGF-23 expression in bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(10):2486-97.

73. Christakos S, Mady LJ, Dhawan P. Chapter 20 - The Calbindins: Calbindin-D28K and Calbindin-D9K and the Epithelial Calcium Channels TRPV5 and TRPV6. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 363-79.
74. Tebben P, Kumar R. Chapter 26 - Vitamin D and the Kidney. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 471-91.
75. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*. 2016;96(1):365-408.
76. Khosla S, Atkinson EJ, Melton LJ, 3rd, Riggs BL. Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(5):1522-7.
77. Anderson PH, Iida S, Tyson JH, Turner AG, Morris HA. Bone CYP27B1 gene expression is increased with high dietary calcium and in mineralising osteoblasts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;121(1-2):71-5.
78. HENRY HL, LUNTAO EM. Interactions between intracellular signals involved in the regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism. *Endocrinology*. 1989;124(5):2228.
79. Kozai M, Yamamoto H, Ishiguro M, Harada N, Masuda M, Kagawa T, et al. Thyroid hormones decrease plasma 1alpha,25-dihydroxyvitamin D levels through transcriptional repression of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene (CYP27B1). *Endocrinology*. 2013;154(2):609-22.
80. Gao XH, Dwivedi PP, Choe S, Alba F, Morris HA, Omdahl JL, et al. Basal and parathyroid hormone induced expression of the human 25-hydroxyvitamin D 1 [alpha]-hydroxylase gene promoter in kidney AOK-B50 cells: role of Sp1, Ets and CCAAT box protein binding sites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2002;34(8):921-30.
81. Ormsby RT, Findlay DM, Kogawa M, Anderson PH, Morris HA, Atkins GJ. Analysis of vitamin D metabolism gene expression in human bone: evidence for autocrine control of bone remodelling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;144 Pt A:110-3.
82. Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annual review of nutrition*. 2002;22(1):139-66.
83. St-Arnaud R. Chapter 4 - CYP24A1: Structure, Function, and Physiological Role. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 43-56.
84. Fleet JC, Schoch RD. Chapter 19 - Molecular Mechanisms for Regulation of Intestinal Calcium and Phosphate Absorption by Vitamin D. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 349-62.
85. Shinki T, Jin CH, Nishimura A, Nagai Y, Ohyama Y, Noshiro M, et al. Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in rat kidney but not in intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(19):13757.
86. Holick MF. *Vitamin D: physiology, molecular biology, and clinical applications*: Springer; 2010.
87. Petkovich M, Helvig C, Epps T. Chapter 80 - CYP24A1 Regulation in Health and Disease. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 1525-54.
88. Henry HL, Taylor AN, Norman AW. Response of chick parathyroid glands to the vitamin D metabolites, 1, 25-dihydroxycholecalciferol and 24, 25-dihydroxycholecalciferol. *The Journal of nutrition*. 1977;107(10):1918.
89. Goff JP, Horst RL. Assessing adequacy of cholecalciferol supplementation in chicks using plasma cholecalciferol metabolite concentrations as an indicator. *The Journal of nutrition*. 1995;125(5):1351-7.

90. Alkalay D, Shany S, Dekel S. Serum and bone vitamin D metabolites in elective patients and patients after fracture. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1989;71(1):85-7.
91. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> (rapid effects) and 24R,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;197(1-2):1-13.
92. Kato A, Seo EG, Einhorn TA, Bishop JE, Norman AW. Studies on 24R,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: evidence for a nonnuclear membrane receptor in the chick tibial fracture-healing callus. *Bone*. 1998;23(2):141-6.
93. Seo EG, Einhorn TA, Norman AW. 24R,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: an essential vitamin D<sub>3</sub> metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinology*. 1997;138(9):3864-72.
94. Seo EG, Norman AW. Three-fold induction of renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase activity and increased serum 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> levels are correlated with the healing process after chick tibial fracture. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(4):598-606.
95. Gorter EA, Hamdy NA, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. The role of vitamin D in human fracture healing: a systematic review of the literature. *Bone*. 2014;64:288-97.
96. Jones G, Vriezen D, Lohnes D, Palda V, Edwards NS. Side-chain hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub> and its physiological implications. *Steroids*. 1987;49(1-3):29-53.
97. Brommage R, Jarnagin K, DeLuca HF, Yamada S, Takayama H. 1-but not 24-hydroxylation of vitamin D is required for skeletal mineralization in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1983;244(3):E298-E304.
98. Yetley EA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, Phinney KW, Lacher DA, Christakos S, et al. NHANES monitoring of serum 25-hydroxyvitamin D: a roundtable summary. *The Journal of nutrition*. 2010;140(11):2030s-45s.
99. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SKG. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(8):3055.
100. Stepman HC, Vanderroost A, Stockl D, Thienpont LM. Full-scan mass spectral evidence for 3-epi-25-hydroxyvitamin D(3) in serum of infants and adults. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2011;49(2):253-6.
101. Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clinical biochemistry*. 2013;46(3):190-6.
102. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(1):163-8.
103. Schleicher RL, Encisco SE, Chaudhary-Webb M, Paliakov E, McCoy LF, Pfeiffer CM. Isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous measurement of 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub>, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 3-epi-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human serum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412(17-18):1594-9.
104. Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D<sub>3</sub>, 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. *Clinical biochemistry*. 2013;46(13-14):1264-71.
105. Gallo S, Comeau K, Agellon S, Vanstone C, Sharma A, Jones G, et al. Methodological issues in assessing plasma 25-hydroxyvitamin D concentration in newborn infants. *Bone*. 2014;61:186-90.

106. Gallo S, Comeau K, Vanstone C, Agellon S, Sharma A, Jones G, et al. Effect of different dosages of oral vitamin D supplementation on vitamin D status in healthy, breastfed infants: a randomized trial. *Jama*. 2013;309(17):1785-92.
107. Engelman CD, Bo R, Zuelsdorff M, Steltenpohl H, Kirby T, Nieto FJ. Epidemiologic study of the C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) in a population-based sample. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2014;33(3):421-5.
108. Strathmann FG, Sadilkova K, Laha TJ, LeSourd SE, Bornhorst JA, Hoofnagle AN, et al. 3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;413(1-2):203-6.
109. Granado-Lorencio F, Garcia-Heras LM, Blanco-Navarro I, Perez-Sacristan B. Assessment of 3-epi-25-OH-D3 in preterm and full term infant samples and its relationship to demographic, anthropometric and biochemical determinants. *Clinical biochemistry*. 2014;47(9):853-6.
110. Mohaghegh Z, Abedi P, Dilgouni T, Namvar F, Ruzafza S. The relation of preeclampsia and serum level of 25-hydroxyvitamin D in mothers and their neonates: a case control study in Iran. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2015;47(4):284-8.
111. Alp H, Tekgunduz KS, Akkar MK. Maternal and cord blood vitamin D status in high-altitude pregnancy. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2016;29(4):571-5.
112. Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D(3), 25-OH-vitamin D(2) and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. *Clinical biochemistry*. 2013;46(13-14):1264-71.
113. Engelman CD, Bo R, Zuelsdorff M, Steltenpohl H, Kirby T, Nieto FJ. Epidemiologic study of the C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D in a population-based sample. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2013.
114. Masuda S, Kamao M, Schroeder NJ, Makin HL, Jones G, Kremer R, et al. Characterization of 3-epi-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 involved in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 metabolic pathway in cultured cell lines. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2000;23(2):133-9.
115. Brown AJ, Ritter C, Slatopolsky E, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS. 1Alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *Journal of cellular biochemistry*. 1999;73(1):106-13.
116. Bianchini C, Lavery P, Agellon S, Weiler HA. The Generation of C-3alpha Epimer of 25-Hydroxyvitamin D and Its Biological Effects on Bone Mineral Density in Adult Rodents. *Calcified tissue international*. 2015.
117. Bianchini C, Lavery P, Agellon S, Weiler HA. The generation of C-3alpha epimer of 25-hydroxyvitamin D and its biological effects on bone mineral density in adult rodents. *Calcified tissue international*. 2015;96(5):453-64.
118. Genazzani AR, Palumbo MA, de Micheroux AA, Artini PG, Criscuolo M, Ficarra G, et al. Evidence for a role for the neurosteroid allopregnanolone in the modulation of reproductive function in female rats. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 1995;133(3):375-80.
119. Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M. Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;85(2-5):247-55.
120. Higashi T, Sakajiri K, Shimada K. Analysis of C-3 epimerization in (24R)-24,25-dihydroxyvitamin D3 catalyzed by hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;36(3):429-36.

121. Kamao M, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, Kubodera N, et al. Measurement and characterization of C-3 epimerization activity toward vitamin D3. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005;436(1):196-205.
122. Kadiyala S, Nagaba S, Takeuchi K, Yukihiko S, Qiu W, Eyes ST, et al. Metabolites and analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3): evaluation of actions in bone. *Steroids*. 2001;66(3-5):347-55.
123. Molnar F, Siqueiro R, Sato Y, Araujo C, Schuster I, Antony P, et al. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-3-epi-vitamin D3, a natural physiological metabolite of vitamin D3: its synthesis, biological activity and crystal structure with its receptor. *PloS one*. 2011;6(3):e18124.
124. Rhieu SY, Annalora AJ, Wang G, Flarakos CC, Gathungu RM, Vouros P, et al. Metabolic stability of 3-epi-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 over 1  $\alpha$  25-dihydroxyvitamin D3: metabolism and molecular docking studies using rat CYP24A1. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(10):2293-305.
125. Rehan VK, Torday JS, Peleg S, Gennaro L, Vouros P, Padbury J, et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D3: production and biological activity studies in pulmonary alveolar type II cells. *Molecular genetics and metabolism*. 2002;76(1):46-56.
126. Brown AJ, Ritter CS, Weiskopf AS, Vouros P, Sasso GJ, Uskokovic MR, et al. Isolation and identification of 1 $\alpha$ -hydroxy-3-epi-vitamin D3, a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;96(3):569-78.
127. Rhieu SY, Annalora AJ, Wang G, Flarakos CC, Gathungu RM, Vouros P, et al. Metabolic stability of 3-Epi-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 over 1  $\alpha$  25-dihydroxyvitamin D3 : Metabolism and molecular docking studies using rat CYP24A1. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(10):2293-305.
128. Jones G. Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 2012;243:7-13.
129. Carter GD, Jones JC, Shannon J, Williams EL, Jones G, Kaufmann M, et al. 25-Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015.
130. Glendenning P. Measuring vitamin D. *Australian prescriber*. 2015;38(1):12-5.
131. Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J. How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the international vitamin D external quality assessment scheme. *Clinical chemistry*. 2004;50(11):2195-7.
132. Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):507s-10s.
133. Binkley N, Wiebe D. Clinical controversies in vitamin D: 25(OH)D measurement, target concentration, and supplementation. *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry*. 2013;16(4):402-8.
134. Binkley N, Sempos CT. Standardizing vitamin D assays: the way forward. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2014;29(8):1709-14.
135. Sempos CT, Durazo-Arvizu RA, Binkley N, Jones J, Merkel JM, Carter GD. Developing vitamin D dietary guidelines and the lack of 25-hydroxyvitamin D assay standardization: The ever-present past. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015.
136. Hazell TJ, Gallo S, Berzina L, Vanstone CA, Rodd C, Weiler HA. Plasma 25-hydroxyvitamin D, more so than its epimer, has a linear relationship to leaner body composition across infancy in healthy term infants. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2014:1-7.

137. Carter GD, Berry JL, Gunter E, Jones G, Jones JC, Makin HL, et al. Proficiency testing of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) assays. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;121(1-2):176-9.
138. Phinney KW, Bedner M, Tai SS, Vamathevan VV, Sander LC, Sharpless KE, et al. Development and certification of a standard reference material for vitamin D metabolites in human serum. *Analytical chemistry*. 2012;84(2):956-62.
139. Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) 25(OH)D review. review. London: Charing Cross Hospital, 2014.
140. Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Annals of clinical biochemistry*. 2008;45(Pt 2):153-9.
141. Kaufmann M, Gallagher JC, Peacock M, Schlingmann KP, Konrad M, DeLuca HF, et al. Clinical utility of simultaneous quantitation of 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D by LC-MS/MS involving derivatization with DMEQ-TAD. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(7):2567-74.
142. Bredderman S, Nieman L, Cox A. Introducing dietary assessment to first-year medical students. *Journal of medical education*. 1984;59(6):518-20.
143. Gibson R. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd edition ed. Melbourne, Australia: Oxford University Press Australia; 2005.
144. Earthman CP. *Body Composition Tools for Assessment of Adult Malnutrition at the Bedside: A Tutorial on Research Considerations and Clinical Applications*. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2015;39(7):787-822.
145. Jensen GL, Hsiao PY, Wheeler D. Adult nutrition assessment tutorial. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2012;36(3):267-74.
146. RZS Rzsz. *Izvod iz metodologije rada potrošačke korpe Belgrade, Serbia RZS Republic of Serbia*; 2010.
147. König J. *Chemie der Menschlichen Nahrungs- und Genussmittel*. Berlin Springer; 1878.
148. Kaić-Rak A AK. *Tablice o sastavu namirnica i pića*. Zagreb: Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske 1990.
149. Gurinović M, Milešević J, Kadvan A, Djekić-Ivanković M, Debeljak-Martačić J, Takić M, et al. Establishment and advances in the online Serbian food and recipe data base harmonized with EuroFIR™ standards. *Food Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.107>
150. Willett WC, Sampson L, Stampfer MJ, Rosner B, Bain C, Witschi J, et al. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *American journal of epidemiology*. 1985;122(1):51-65.
151. Block G, Woods M, Potosky A, Clifford C. Validation of a self-administered diet history questionnaire using multiple diet records. *Journal of clinical epidemiology*. 1990;43(12):1327-35.
152. Willett WC. *Nutritional Epidemiology*. Press OU, editor. USA1998.
153. Kaaks RJ. Biochemical markers as additional measurements in studies of the accuracy of dietary questionnaire measurements: conceptual issues. *The American journal of clinical nutrition*. 1997;65(4 Suppl):1232s-9s.
154. Potischman N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *The Journal of nutrition*. 2003;133 Suppl 3:875s-80s.
155. Ocke MC, Kaaks RJ. Biochemical markers as additional measurements in dietary validity studies: application of the method of triads with examples from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 1997;65(4 Suppl):1240s-5s.
156. Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X, Spiegelman D, Campos H. Application of the method of triads to evaluate the performance of food frequency questionnaires and



- biomarkers as indicators of long-term dietary intake. *American journal of epidemiology*. 2001;154(12):1126-35.
157. National Research Council Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Recommended Dietary Allowances: 10th Edition. Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright (c) 1989 by the National Academy of Sciences.; 1989.158. Communities CotE. Proposed nutrient and energy intakes for the European community: a report of the Scientific Committee for Food of the European community. *Nutrition reviews*. 1993;51(7):209-12.
  159. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington, DC: National Academy Press; 1997.
  160. Nations WHOaFaAOotU. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Geneva, Switzerland: 2004.
  161. Vitamin D and adult bone health in Australia and New Zealand: a position statement. *The Medical journal of Australia*. 2005;182(6):281-5.
  162. Pedersen JI. Vitamin D requirement and setting recommendation levels - current Nordic view. *Nutrition reviews*. 2008;66(10 Suppl 2):S165-9.
  163. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press; 2011.
  164. Commission of the European Communities. Proposed nutrient and energy intakes for the European community: a report of the Scientific Committee for Food of the European community. *Nutr Rev*. 1993;51(7):209-12.
  165. White JH. Vitamin D and human health: more than just bone. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(10):623.
  166. Vidailhet M, Garabedian M. [Vitamin D requirements for french children]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2010;17(6):808-9.
  167. Hypponen E, Fararouei M, Sovio U, Hartikainen AL, Pouta A, Robertson C, et al. High-dose vitamin D supplements are not associated with linear growth in a large Finnish cohort. *The Journal of nutrition*. 2011;141(5):843-8.
  168. Shepherd D, Day AS, Leach ST, Lopez R, Messenger R, Woodhead HJ, et al. Single High-Dose Oral Vitamin D3 Therapy (Stoss): A Solution to Vitamin D Deficiency in Children With Inflammatory Bowel Disease? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2015;61(4):411-4.
  169. Shepherd D, Belessis Y, Katz T, Morton J, Field P, Jaffe A. Single high-dose oral vitamin D3 (stoss) therapy--a solution to vitamin D deficiency in children with cystic fibrosis? *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013;12(2):177-82.
  170. Emel T, Dogan DA, Erdem G, Faruk O. Therapy strategies in vitamin D deficiency with or without rickets: efficiency of low-dose stoss therapy. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2012;25(1-2):107-10.
  171. Jeans P, Stearns G. The effect of vitamin D on linear growth in infancy. II. The effect of intakes above 1800 USP units daily. *J Pediatr*. 1938;13:730-40.
  172. First Nations Inuit and Métis Health Committee, Canadian Paediatric Society. Vitamin D supplementation: Recommendations for Canadian mothers and infants. *Paediatrics & child health*. 2007;12(7):583-9.
  173. Ozkan B, Hatun S, Bereket A. Vitamin D intoxication. *The Turkish journal of pediatrics*. 2012;54(2):93-8.
  174. Vanstone MB, Oberfield SE, Shader L, Ardeshipour L, Carpenter TO. Hypercalcemia in children receiving pharmacologic doses of vitamin D. *Pediatrics*. 2012;129(4):e1060-3.
  175. Ketha H, Wadams H, Lteif A, Singh RJ. Iatrogenic vitamin D toxicity in an infant--a case report and review of literature. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;148:14-8.

176. Nimesh M, Singh P, Jhamb U, Dubey AP. An Unsuspected Pharmacological Vitamin D Toxicity in a Child and its Brief Review of Literature. *Toxicology international*. 2015;22(1):167-9.
177. Atkinson SA. *Vitamin D: Current dilemmas* Toronto: Dietitians of Canada; 2008. Available from: <http://www.onpen.ca/docviewer.asp?id=6993>.
178. Wagner CL, Hulseley TC, Fanning D, Ebeling M, Hollis BW. High-dose vitamin D3 supplementation in a cohort of breastfeeding mothers and their infants: a 6-month follow-up pilot study. *Breastfeed Med*. 2006;1(2):59-70.
179. Ross AC. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D. *Public health nutrition*. 2011;14(5):938-9.
180. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. Geneva, World Health Organization and Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004.
181. Ross A, Taylor C, Yaktine A. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington (DC): Institute of Medicine, 2011.
182. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(1):53-8.
183. Haq A, Svobodova J, Imran S, Stanford C, Razzaque MS. Vitamin D deficiency: A single centre analysis of patients from 136 countries. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016.
184. Lindqvist PG, Epstein E, Landin-Olsson M, Ingvar C, Nielsen K, Stenbeck M, et al. Avoidance of sun exposure is a risk factor for all-cause mortality: results from the Melanoma in Southern Sweden cohort. *Journal of internal medicine*. 2014;276(1):77-86.
185. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clinic proceedings*. 2013;88(7):720-55.
186. Zhang MX, Pan GT, Guo JF, Li BY, Qin LQ, Zhang ZL. Vitamin D Deficiency Increases the Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2015;7(10):8366-75.
187. El-Fakhri N, McDevitt H, Shaikh MG, Halsey C, Ahmed SF. Vitamin D and its effects on glucose homeostasis, cardiovascular function and immune function. *Hormone research in paediatrics*. 2014;81(6):363-78.
188. Towler DA. Chapter 73 - Vitamin D: Cardiovascular Effects and Vascular Calcification. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 1403-26.
189. Ganji V, Zhang X, Shaikh N, Tangpricha V. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(1):225-33.
190. Schoenrock SA, Tarantino LM. Developmental vitamin D deficiency and schizophrenia: the role of animal models. *Genes, brain, and behavior*. 2016;15(1):45-61.
191. Mpandzou G, Ait Ben Haddou E, Regragui W, Benomar A, Yahyaoui M. Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: A review. *Revue neurologique*. 2016;172(2):109-22.
192. Mostowska A, Sajdak S, Pawlik P, Lianeri M, Jagodzinski PP. Vitamin D receptor gene BsmI and FokI polymorphisms in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013;17(3):183-7.
193. Marusic G, Jeremic D, Vojinovic S, Filipovic N, Popov M. [Vitamin D and prostate cancer]. *Medicinski pregljed*. 2013;66(5-6):259-62.

194. Zeljic K, Supic G, Stamenkovic Radak M, Jovic N, Kozomara R, Magic Z. Vitamin D receptor, CYP27B1 and CYP24A1 genes polymorphisms association with oral cancer risk and survival. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2012;41(10):779-87.
195. Welsh J. Chapter 85 - Vitamin D Actions in Mammary Gland and Breast Cancer. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 1657-73.
196. Trump DL, Johnson CS. Chapter 90 - The Anti-tumor Effects of Vitamin D in Other Cancers. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 1763-73.
197. Tang JY, Epstein Jr EH. Chapter 89 - Vitamin D and Skin Cancer. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 1751-62.
198. Jurecka-Lubieniecka B, Paliczka E, Czarniecka A, Jarzab M, Handkiewicz D, Hasse-Lazar K, et al. [Hypoparathyroidism after surgery on thyroid cancer: is there a delayed chance for recovery after a prolonged period of substitutive therapy?]. *Endokrynologia Polska.* 2006;57(5):501-8.
199. Rodriguez C, McCullough ML, Mondul AM, Jacobs EJ, Fakhrabadi-Shokoohi D, Giovannucci EL, et al. Calcium, dairy products, and risk of prostate cancer in a prospective cohort of United States men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2003;12(7):597-603.
200. Shaw NJ. Prevention and treatment of nutritional rickets. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2015.
201. Foo LH, Zhang Q, Zhu K, Ma G, Hu X, Greenfield H, et al. Low vitamin D status has an adverse influence on bone mass, bone turnover, and muscle strength in Chinese adolescent girls. *The Journal of nutrition.* 2009;139(5):1002-7.
202. Ward KA, Das G, Berry JL, Roberts SA, Rawer R, Adams JE, et al. Vitamin D status and muscle function in post-menarchal adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(2):559-63.
203. Pettifor JM. Nutritional rickets: deficiency of vitamin D, calcium, or both? *The American journal of clinical nutrition.* 2004;80(6 Suppl):1725s-9s.
204. Čukalović M, K-MJ, Odalović A., Jakšić D. . Incidence of ricket clinical symptoms and relation between clinical and laboratory findings in infants. 2014; (43 (3)):87-90.
205. Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine.* 2007;357(3):266-81.
206. Willis CM, Laing EM, Hall DB, Hausman DB, Lewis RD. A prospective analysis of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations in white and black prepubertal females in the southeastern United States. *The American journal of clinical nutrition.* 2007;85(1):124-30.
207. Ward LM, Gaboury I, Ladhani M, Zlotkin S. Vitamin D-deficiency rickets among children in Canada. *CMAJ.* 2007;177(2):161-6.
208. Schoenmakers I, Pettifor JM, Pena-Rosas JP, Lamberg-Allardt C, Shaw N, Jones KS, et al. Prevention and consequences of vitamin D deficiency in pregnant and lactating women and children: A symposium to prioritise vitamin D on the global agenda. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2015.
209. Cooper C, Westlake S, Harvey N, Dennison E. Developmental origins of osteoporotic fracture. *Advances in experimental medicine and biology.* 2009;639:217-36.
210. Cooper C, Harvey N, Cole Z, Hanson M, Dennison E. Developmental origins of osteoporosis: the role of maternal nutrition. *Advances in experimental medicine and biology.* 2009;646:31-9.

211. Mahon P, Harvey N, Crozier S, Inskip H, Robinson S, Arden N, et al. Low maternal vitamin D status and fetal bone development: cohort study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(1):14-9.
212. Moon RJ, Harvey NC, Davies JH, Cooper C. Vitamin D and skeletal health in infancy and childhood. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2014;25(12):2673-84.
213. Winzenberg T, Jones G. Vitamin D and bone health in childhood and adolescence. *Calcified tissue international*. 2013;92(2):140-50.
214. Ryan LM, Brandoli C, Freishtat RJ, Wright JL, Tosi L, Chamberlain JM. Prevalence of vitamin D insufficiency in African American children with forearm fractures: a preliminary study. *Journal of pediatric orthopedics*. 2010;30(2):106-9.
215. Weiler H, Fitzpatrick-Wong S, Veitch R, Kovacs H, Schellenberg J, McCloy U, et al. Vitamin D deficiency and whole-body and femur bone mass relative to weight in healthy newborns. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2005;172(6):757-61.
216. Schroth RJ, Lavelle C, Tate R, Bruce S, Billings RJ, Moffatt ME. Prenatal vitamin D and dental caries in infants. *Pediatrics*. 2014;133(5):e1277-84.
217. Cockburn F, Belton NR, Purvis RJ, Giles MM, Brown JK, Turner TL, et al. Maternal vitamin D intake and mineral metabolism in mothers and their newborn infants. *British medical journal*. 1980;281(6232):11-4.
218. Karras S, Paschou SA, Kandarakis E, Anagnostis P, Annweiler C, Tarlatzis BC, et al. Hypovitaminosis D in pregnancy in the Mediterranean region: a systematic review. *European journal of clinical nutrition*. 2016.
219. Palacios C, De-Regil LM, Lombardo LK, Pena-Rosas JP. Vitamin D supplementation during pregnancy: Updated meta-analysis on maternal outcomes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016.
220. Liu NQ, Hewison M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;523(1):37-47.
221. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. 2010;31(12):1027-34.
222. Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentration. *The Journal of clinical investigation*. 1981;67(3):589-96.
223. Barrett H, McElduff A. Vitamin D and pregnancy: An old problem revisited. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2010;24(4):527-39.
224. Baksi SN, Kenny AD. Acute effect of estradiol on the renal vitamin D hydroxylases in Japanese quail. *Biochemical pharmacology*. 1978;27(24):2765-8.
225. Bass JK, Chan GM. Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2006;22(10):1057-66.
226. Malone JL. Vitamin passage across the placenta. *Clinics in perinatology*. 1975;2(2):295-307.
227. Abrams SA. What are the risks and benefits to increasing dietary bone minerals and vitamin D intake in infants and small children? *Annu Rev Nutr* 2011;21(31):285-97.
228. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74(6):1966-71.

229. Delvin EE, Glorieux FH, Salle BL, David L, Varenne JP. Control of vitamin D metabolism in preterm infants: fetomaternal relationships. *Archives of disease in childhood*. 1982;57(10):754-7.
230. Weisman Y, Sapir R, Harell A, Edelstein S. Maternal-perinatal interrelationships of vitamin D metabolism in rats. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;428(2):388-95.
231. Sunaga S, Horiuchi N, Takahashi N, Okuyama K, Suda T. The site of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production in pregnancy. *Biochemical and biophysical research communications*. 1979;90(3):948-55.
232. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocrine reviews*. 1997;18(6):832-72.
233. Kovacs CS. Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):520S-8.
234. Salih SM, Taylor HS. HOXA10 gene expression in human fallopian tube and ectopic pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;190(5):1404-6.
235. Sayegh L, Fuleihan Gel H, Nassar AH. Vitamin D in endometriosis: a causative or confounding factor? *Metabolism: clinical and experimental*. 2014;63(1):32-41.
236. Lee JM, Smith JR, Philipp BL, Chen TC, Mathieu J, Holick MF. Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants. *Clinical pediatrics*. 2007;46(1):42-4.
237. Dror DK. Vitamin D status during pregnancy: maternal, fetal, and postnatal outcomes. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2011;23(6):422-6.
238. Liu N, Kaplan AT, Low J, Nguyen L, Liu GY, Equils O, et al. Vitamin D induces innate antibacterial responses in human trophoblasts via an intracrine pathway. *Biology of reproduction*. 2009;80(3):398-406.
239. Bouillon R, Van Baelen H, De Moor P. 25-hydroxyvitamin D and its binding protein in maternal and cord serum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1977;45(4):679-84.
240. Greer FR. 25-Hydroxyvitamin D: functional outcomes in infants and young children. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):529s-33s.
241. Rodd C, Mushcab SA. Hypocalcemic seizures secondary to nutritional vitamin D deficiency in 3 infants fed soy formula. *Clin Pediatr* 2005;44(5):455-7.
242. Ward LM. Vitamin D deficiency in the 21st century: a persistent problem among Canadian infants and mothers. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2005;172(6):769-70.
243. Yun C, Chen J, He Y, Mao D, Wang R, Zhang Y, et al. Vitamin D deficiency prevalence and risk factors among pregnant Chinese women. *Public health nutrition*. 2015:1-9.
244. Rodriguez-Dehli AC, Riano Galan I, Fernandez-Somoano A, Navarrete-Munoz EM, Espada M, Vioque J, et al. [Prevalence of vitamin d deficiency and insufficiency and associated factors in pregnant women of northern Spain]. *Nutricion hospitalaria*. 2015;31(4):1633-40.
245. Lewis S, Lucas RM, Halliday J, Ponsonby AL. Vitamin D deficiency and pregnancy: from preconception to birth. *Molecular nutrition & food research*. 2010;54(8):1092-102.
246. Holmes VA, Barnes MS, Alexander HD, McFaul P, Wallace JM. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. *The British journal of nutrition*. 2009;102(6):876-81.
247. Milman N, Hvas AM, Bergholt T. Vitamin D status during normal pregnancy and postpartum. A longitudinal study in 141 Danish women. *Journal of perinatal medicine*. 2012;40(1):57-61.
248. Ozias MK, Kerling EH, Christifano DN, Scholtz SA, Colombo J, Carlson SE. Typical prenatal vitamin D supplement intake does not prevent decrease of plasma 25-hydroxyvitamin D at birth. *Journal of the American College of Nutrition*. 2014;33(5):394-9.

249. Hollis BW, Johnson D, Hulseley TC, Ebeling M, Wagner CL. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(10):2341-57.
250. Yu CK, Sykes L, Sethi M, Teoh TG, Robinson S. Vitamin D deficiency and supplementation during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(5):685-90.
251. Bowyer L, Catling-Paull C, Diamond T, Homer C, Davis G, Craig ME. Vitamin D, PTH and calcium levels in pregnant women and their neonates. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(3):372-7.
252. Johnson DD, Wagner CL, Hulseley TC, McNeil RB, Ebeling M, Hollis BW. Vitamin D deficiency and insufficiency is common during pregnancy. *Am J Perinatol*. 2011;28(1):7-12.
253. Leffelaar ER, Vrijkotte TG, van Eijsden M. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to fetal and neonatal growth: results of the multi-ethnic Amsterdam Born Children and their Development cohort. *Br J Nutr*. 2010;104(1):108-17.
254. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*. 2008;33(1):90-4.
255. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(3):690-3.
256. Lenders CM, Feldman HA, Von Scheven E, Merewood A, Sweeney C, Wilson DM, et al. Relation of body fat indexes to vitamin D status and deficiency among obese adolescents. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;90(3):459-67.
257. Gagnon C LZ, Magliano DJ, Dunstan DW, Shaw JE, Zimmet PZ, Sikaris K, Ebeling PR, Daly RM. Low serum 25-hydroxyvitamin D is associated with increased risk of the development of the metabolic syndrome at five years: results from a national, population-based prospective study (The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study: AusDiab). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97 (6):1953-61.
258. Bodnar LM, Catov JM, Roberts JM, Simhan HN. Prepregnancy obesity predicts poor vitamin D status in mothers and their neonates. *The Journal of nutrition*. 2007;137(11):2437-42.
259. Josefson JL, Reisetter A, Scholtens DM, Price HE, Metzger BE, Langman CB. Maternal BMI Associations with Maternal and Cord Blood Vitamin D Levels in a North American Subset of Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study Participants. *PloS one*. 2016;11(3):e0150221.
260. Josefson JL, Feinglass J, Rademaker AW, Metzger BE, Zeiss DM, Price HE, et al. Maternal obesity and vitamin D sufficiency are associated with cord blood vitamin D insufficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(1):114-9.
261. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2008;10(3):185-97.
262. Lips P. Vitamin D physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006;92(1):4-8.
263. Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Medical hypotheses*. 2010;74(1):71-5.
264. McGrath J. Does 'imprinting' with low prenatal vitamin D contribute to the risk of various adult disorders? *Medical hypotheses*. 2001;56(3):367-71.
265. Tabesh M, Salehi-Abargouei A, Tabesh M, Esmailzadeh A. Maternal vitamin D status and risk of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(8):3165-73.
266. Hypponen E, Cavadino A, Williams D, Fraser A, Vereczkey A, Fraser WD, et al. Vitamin D and pre-eclampsia: original data, systematic review and meta-analysis. *Annals of nutrition & metabolism*. 2013;63(4):331-40.

267. Wei SQ. Vitamin D and pregnancy outcomes. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2014;26(6):438-47.
268. Jido TA, Yakasai IA. Preeclampsia: a review of the evidence. *Annals of African medicine*. 2013;12(2):75-85.
269. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.
270. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367(9516):1066-74.
271. Bilano VL, Ota E, Ganchimeg T, Mori R, Souza JP. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: a WHO secondary analysis. *PLoS one*. 2014;9(3):e91198.
272. Williams D. Long-term complications of preeclampsia. *Seminars in nephrology*. 2011;31(1):111-22.
273. Tufnell DJ SA, Waugh JJS, Walker JJ. . The management of severe pre-eclampsia/eclampsia, guideline number 10(A). London: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists; 2006.
274. Lowe SA, Brown MA, Dekker GA, Gatt S, McLintock CK, McMahon LP, et al. Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 2009;49(3):242-6.
275. Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, von Dadelszen P. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2008;30(3 Suppl):S1-48.
276. Lindheimer MD, Taler SJ, Cunningham FG. Hypertension in pregnancy. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2008;2(6):484-94.
277. Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C, et al. The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005;330(7491):576-80.
278. Lambert G, Brichant JF, Hartstein G, Bonhomme V, Dewandre PY. Preeclampsia: an update. *Acta anaesthesiologica Belgica*. 2014;65(4):137-49.
279. Gynecologists- TACoOa. Hypertension in pregnancy. *Library of Congress Cataloging-in-PublicationData*: 2013.
280. Gynecologists ACoOa. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 2013;122(5):1122-31.
281. Warrington JP, George EM, Palei AC, Spradley FT, Granger JP. Recent advances in the understanding of the pathophysiology of preeclampsia. *Hypertension*. 2013;62(4):666-73.
282. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. 2006;27(9-10):939-58.
283. Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension*. 2008;52(5):873-80.
284. Achkar M, Dodds L, Giguere Y, Forest JC, Armson BA, Woolcott C, et al. Vitamin D status in early pregnancy and risk of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2014.
285. Mostello D, Kallogjeri D, Tungsiripat R, Leet T. Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;199(1):55.e1-7.
286. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005;330(7491):565.

287. Kosinska-Kaczynska K, Wielgos M. Do normal-weight women pregnant with twins are at the lowest risk of developing preeclampsia? *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2016;1-3.
288. Stang J, Huffman LG. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics.* 2016;116(4):677-91.
289. Lei Q, Niu J, Lv L, Duan D, Wen J, Lin X, et al. Metabolic risk factors clustering and adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2016.
290. Rana S, Karumanchi SA, Lindheimer MD. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. *Hypertension.* 2014;63(2):198-202.
291. Afshani N, Moustaqim-Barrette A, Biccard BM, Rodseth RN, Dyer RA. Utility of B-type natriuretic peptides in preeclampsia: a systematic review. *International journal of obstetric anesthesia.* 2013;22(2):96-103.
292. Roberge S, Sibai B, McCaw-Binns A, Bujold E. Low-Dose Aspirin in Early Gestation for Prevention of Preeclampsia and Small-for-Gestational-Age Neonates: Meta-analysis of Large Randomized Trials. *American journal of perinatology.* 2016.
293. Ghesquiere L, Clouqueur E, Garabedian C, Tsatsaris V, Houfflin-Debarge V. [Can we prevent preeclampsia?]. *Presse medicale (Paris, France : 1983).* 2016.
294. Euser AG, Metz TD, Allshouse AA, Heyborne KD. Low-dose aspirin for pre-eclampsia prevention in twins with elevated human chorionic gonadotropin. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association.* 2016.
295. Navaratnam K, Alfirevic A, Alfirevic Z. Low dose aspirin and pregnancy: how important is aspirin resistance? *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology.* 2016.
296. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2007;92(9):3517-22.
297. Robinson CJ, Alanis MC, Wagner CL, Hollis BW, Johnson DD. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels in early-onset severe preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2010;203(4):366 e1-6.
298. Qian L, Wang H, Wu F, Li M, Chen W, Lv L. Vitamin D3 alters Toll-like receptor 4 signaling in monocytes of pregnant women at risk for preeclampsia. *International journal of clinical and experimental medicine.* 2015;8(10):18041-9.
299. van Weert B, van den Berg D, Hrudehy EJ, Oostvogels AJ, de Miranda E, Vrijkotte TG. Is first trimester vitamin D status in nulliparous women associated with pregnancy related hypertensive disorders? *Midwifery.* 2016;34:117-22.
300. Zabul P, Wozniak M, Slominski AT, Preis K, Gorska M, Korozan M, et al. A Proposed Molecular Mechanism of High-Dose Vitamin D3 Supplementation in Prevention and Treatment of Preeclampsia. *International journal of molecular sciences.* 2015;16(6):13043-64.
301. Andraweera PH, Dekker GA, Jayasekara RW, Dissanayake VH, Roberts CT. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes and the risk of preeclampsia in Sinhalese women. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2016;29(7):1072-6.
302. Hypponen E. Vitamin D for the prevention of preeclampsia? A hypothesis. *Nutrition reviews.* 2005;63(7):225-32.



303. Ota K, Dambaeva S, Han AR, Beaman K, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Vitamin D deficiency may be a risk factor for recurrent pregnancy losses by increasing cellular immunity and autoimmunity. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2014;29(2):208-19.
304. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstetrics and gynecology*. 2003;102(1):181-92.
305. Noyola-Martinez N, Diaz L, Avila E, Halhali A, Larrea F, Barrera D. Calcitriol downregulates TNF-alpha and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women. *Cytokine*. 2013;61(1):245-50.
306. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
307. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(6):2505-12.
308. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *The American journal of pathology*. 2004;164(3):1049-61.
309. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(40):10695-702.
310. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research*. 2012;53(1-3):11-24.
311. Frazao JB, Errante PR, Condino-Neto A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2013;61(6):427-43.
312. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;89-90(1-5):387-92.
313. George EM. New approaches for managing preeclampsia: clues from clinical and basic research. *Clinical therapeutics*. 2014;36(12):1873-81.
314. LaMarca BD, Gilbert J, Granger JP. Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Hypertension*. 2008;51(4):982-8.
315. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):327-31.
316. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of biochemistry*. 2013;153(1):13-9.
317. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney international*. 2006;69(8):1377-84.
318. Woodham PC, Brittain JE, Baker AM, Long DL, Haeri S, Camargo CA, Jr., et al. Midgestation maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio as predictors of severe preeclampsia. *Hypertension*. 2011;58(6):1120-5.
319. Saleh L, Danser JA, van den Meiracker AH. Role of endothelin in preeclampsia and hypertension following antiangiogenesis treatment. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2016;25(2):94-9.
320. Liberis A, Stanulov G, Ali EC, Hassan A, Pagalos A, Kontomanolis EN. Pre-eclampsia and the vascular endothelial growth factor: a new aspect. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*. 2016;43(1):9-13.

321. Pena HR, de Lima MC, Brandt KG, de Antunes MM, da Silva GA. Influence of preeclampsia and gestational obesity in maternal and newborn levels of vitamin D. *BMC pregnancy and childbirth*. 2015;15:112.
322. Roberts JM, Bodnar LM, Patrick TE, Powers RW. The Role of Obesity in Preeclampsia. *Pregnancy hypertension*. 2011;1(1):6-16.
323. Nicholas LM, Morrison JL, Rattanatrav L, Zhang S, Ozanne SE, McMillen IC. The early origins of obesity and insulin resistance: timing, programming and mechanisms. *International journal of obesity (2005)*. 2016;40(2):229-38.
324. Gallos ID, Sivakumar K, Kilby MD, Coomarasamy A, Thangaratinam S, Vatish M. Pre-eclampsia is associated with, and preceded by, hypertriglyceridaemia: a meta-analysis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2013;120(11):1321-32.
325. Conde-Agudelo A, Belizan JM. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2000;107(1):75-83.
326. Qiu C, Luthy DA, Zhang C, Walsh SW, Leisenring WM, Williams MA. A prospective study of maternal serum C-reactive protein concentrations and risk of preeclampsia. *American journal of hypertension*. 2004;17(2):154-60.
327. Greer FR. Defining vitamin D deficiency in children: beyond 25-OH vitamin D serum concentrations. *Pediatrics*. 2009;124(5):1471-3.
328. Lian JB, Stein GS, Montecino M, Stein JL, van Wijnen AJ. Chapter 16 - Genetic and Epigenetic Control of the Regulatory Machinery for Skeletal Development and Bone Formation: Contributions of Vitamin D3. In: Adams DFWPS, editor. *Vitamin D (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 301-19.
329. Lian J, Staal A, van Wignen A, Stein J, Stein G. Biologic and molecular effects of vitamin D on bone. In: Holick MF, editor. *Vitamin D: Physiology, molecular biology, and clinical applications*. Totowa, NJ: Humana Press; 1999.
330. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy reports*. 2013;2:447.
331. Misof BM, Fratzl-Zelman N, Paschalis EP, Roschger P, Klaushofer K. Long-term safety of antiresorptive treatment: bone material, matrix and mineralization aspects. *BoneKEy reports*. 2015;4:634.
332. Atanacković M. Kosti i zglobovi. *Patofiziologija*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2003. p. 750-3.
333. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Shirode-Fukuda Y, Yu T, Sekine K, et al. Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology*. 2013;154(3):1008-20.
334. Lian JB, Stein GS. Chapter 14 - The Cells of Bone. In: Bilezikian MJSPRP, editor. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2006. p. 221-58.
335. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H, editors. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 29-57.
336. Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N. p38 Mitogen-activated protein kinase is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis, or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology*. 2003;144(11):4999-5005.
337. Franklin M, Bu SY, Lerner MR, Lancaster EA, Bellmer D, Marlow D, et al. Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone*. 2006;39(6):1331-42.

338. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF-kappaB-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2015;30(1):35-44.
339. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Current osteoporosis reports*. 2014;12(1):115-20.
340. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):362-71.
341. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(Suppl 3):S131-S9.
342. Kido S, Inoue D, Hiura K, Javier W, Ito Y, Matsumoto T. Expression of RANK is dependent upon differentiation into the macrophage/osteoclast lineage: induction by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and TPA in a human myelomonocytic cell line, HL60. *Bone*. 2003;32(6):621-9.
343. Kitazawa R, Kitazawa S. Vitamin D(3) augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(2):650-5.
344. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):139-46.
345. Schulman RC, Weiss AJ, Mechanick JL. Nutrition, bone, and aging: an integrative physiology approach. *Current osteoporosis reports*. 2011;9(4):184-95.
346. Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, Phleger L, Kurimoto P, Boudignon B, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(9):1659-68.
347. Wecker L, Watts S, Faingold C, Dunaway G, Crespo L. *Brody's human pharmacology: Elsevier Health Sciences*; 2009.
348. Kanzawa M, Sugimoto T, Kanatani M, Chihara K. Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells. *European journal of endocrinology*. 2000;142(6):661-4.
349. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004;19(2):235-44.
350. Bellido T, Ali A, Gubrij I, Plotkin L, Fu Q, O'Brien C, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005;146(11):4577-83.
351. Lemire JM. Immunomodulatory role of 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of cellular biochemistry*. 1992;49(1):26-31.
352. Sato K, Takayanagi H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Current opinion in rheumatology*. 2006;18(4):419-26.
353. Holick MF. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Application*. Bendich A, editor. USA: Humana Press; 2010. 1155 p.
354. Lewiecki EM. Imaging technologies for assessment of skeletal health in men. *Current osteoporosis reports*. 2013;11(1):1-10.
355. Chappard C. [Microarchitecture assessment of human trabecular bone: description of methods]. *Medecine sciences : M/S*. 2012;28(12):1111-5.
356. Poundarik AA, Vashishth D. Multiscale imaging of bone microdamage. *Connect Tissue Res*. 2015;56(2):87-98.

357. Maret D, Telmon N, Peters OA, Lepage B, Treil J, Inglese JM, et al. Effect of voxel size on the accuracy of 3D reconstructions with cone beam CT. *Dento maxillo facial radiology*. 2012;41(8):649-55.
358. Peyrin F, Dong P, Pacureanu A, Langer M. Micro- and nano-CT for the study of bone ultrastructure. *Current osteoporosis reports*. 2014;12(4):465-74.
359. Wang Y, Teichtahl AJ, Cicuttini FM. Osteoarthritis year in review 2015: imaging. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2016;24(1):49-57.
360. Block G, Subar AF. Estimates of nutrient intake from a food frequency questionnaire: the 1987 National Health Interview Survey. *Journal of the American Dietetic Association*. 1992;92(8):969-77.
361. Colic Baric I, Satalic Z, Keser I, Cecic I, Sucic M. Validation of the folate food frequency questionnaire with serum and erythrocyte folate and plasma homocysteine. *International journal of food sciences and nutrition*. 2009;60 Suppl 5:10-8.
362. Subar AF, Dodd KW, Guenther PM, Kipnis V, Midthune D, McDowell M, et al. The food propensity questionnaire: concept, development, and validation for use as a covariate in a model to estimate usual food intake. *J Am Diet Assoc*. 2006;106(10):1556-63.
363. Gurinovic M, Milesevic J, Kadvan A, Djekic-Ivankovic M, Debeljak-Martacic J, Takic M, et al. Establishment and advances in the online Serbian food and recipe data base harmonized with EuroFIR standards. *Food Chem*. 2016;193:30-8.
364. Gurinovic M, Milesevic J, Novakovic R, Kadvan A, Djekic-Ivankovic M, Satalic Z, et al. Improving nutrition surveillance and public health research in Central and Eastern Europe/Balkan Countries using the Balkan Food Platform and dietary tools. *Food Chem*. 2016;193:173-80.
365. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*. 1997;65(4 Suppl):1220S-8S; discussion 9S-31S.
366. Flood A, Peters U, Chatterjee N, Lacey JV, Jr., Schairer C, Schatzkin A. Calcium from diet and supplements is associated with reduced risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(1):126-32.
367. Barr SI. Applications of Dietary Reference Intakes in dietary assessment and planning. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2006;31(1):66-73.
368. Canada H. Canada's Food Guide Servings. [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/food-guide-aliment/track-suivi/table\\_female-femme\\_preg-ence\\_age19-50-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/food-guide-aliment/track-suivi/table_female-femme_preg-ence_age19-50-eng.php)2011.
369. Macri EV, Lifshitz F, Alsina E, Juiz N, Zago V, Lezon C, et al. Monounsaturated fatty acids-rich diets in hypercholesterolemic-growing rats. *International journal of food sciences and nutrition*. 2015;66(4):400-8.
370. Peterson CA, Eurell JA, Erdman JW, Jr. Alterations in calcium intake on peak bone mass in the female rat. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1995;10(1):81-95.
371. Ersfeld DL, Rao DS, Body JJ, Sackrison JL, Jr., Miller AB, Parikh N, et al. Analytical and clinical validation of the 25 OH vitamin D assay for the LIAISON automated analyzer. *Clinical biochemistry*. 2004;37(10):867-74.
372. Hollis BW, Horst RL. The assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)2D: where we are and where we are going. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103(3-5):473-6.
373. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2008;391(5):1917-30.
374. JIAN-XIN QI. Determination of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Na and K in serum flame by atomic absorption spectroscopy. Palo Alto: Varian Instruments at Work's; 1990. p. 1-2.
375. Yu MW, Horng IS, Hsu KH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *American journal of epidemiology*. 1999;150(4):367-74.
376. Brouwers JE, Van Rietbergen B, Huiskes R. No effects of in vivo micro-CT radiation on structural parameters and bone marrow cells in proximal tibia of wistar rats detected after eight weekly scans. *Journal of Orthopaedic Research*. 2007;25(10):1325-32.
377. Longo AB, Sacco SM, Salmon PL, Ward WE. Longitudinal Use of Micro-computed Tomography Does Not Alter Microarchitecture of the Proximal Tibia in Sham or Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *Calcified tissue international*. 2016.
378. Duque G, Macoritto M, Dion N, Ste-Marie LG, Kremer R. 1,25(OH)2D3 acts as a bone-forming agent in the hormone-independent senescence-accelerated mouse (SAM-P/6). *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005;288(4):E723-30.
379. Reichling TD, German RZ. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size. *The Journal of nutrition*. 2000;130(9):2326-32.
380. Meganck JA, Kozloff KM, Thornton MM, Broski SM, Goldstein SA. Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by X-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD. *Bone*. 2009;45(6):1104-16.
381. Crenshaw T, Peo Jr E, Lewis A, Moser B. Bone Strength as a Trait For Assessing Mineralization in Swine: A Critical Review of Techniques Involved. *Faculty Papers and Publications in Animal Science*. 1981:655.
382. Su Z, Narla SN, Zhu Y. 25-Hydroxyvitamin D: Analysis and clinical application. *Clinica Chimica Acta*. 2014;433:200-5.
383. Uriu-Adams JY, Obican SG, Keen CL. Vitamin D and maternal and child health: overview and implications for dietary requirements. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2013;99(1):24-44.
384. Olfert ED CB, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care Ottawa;; 1993.
385. Pazarincevic FK, Bogojevski DG, Damanski AF. [Studies on vitamin D and so-called pseudovitamin C in beans following preservation of short duration]. *Vojnosanitetski preglod Military-medical and pharmaceutical review*. 1957;14(4):199-201.
386. Gunduz S, Kosger H, Aldemir S, Akcal B, Tevrici H, Hizli D, et al. Sleep deprivation in the last trimester of pregnancy and inadequate vitamin D: Is there a relationship? *The American journal of clinical nutrition*. 2016;79(1):34-8.
387. Namgung R, Tsang RC. Factors affecting newborn bone mineral content: in utero effects on newborn bone mineralization. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2000;59(1):55-63.
388. Velickovic VA. Znacaj uloga i profil polinezasicenih masnih kiselina u preeklampsiji. 2012.
389. Kramer MS, Platt RW, Wen SW, Joseph KS, Allen A, Abrahamowicz M, et al. A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age. *Pediatrics*. 2001;108(2):E35.
390. Institute of Medicine SCotSEoDRI. DRI Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment Washington (DC): National Academies Press (US); 2000.

391. Djekic-Ivankovic M, Weiler HA, Nikolic M, Kadvan A, Gurinovic M, Mandic LM, et al. Validity of an FFQ assessing the vitamin D intake of young Serbian women living in a region without food fortification: the method of triads model. *Public health nutrition*. 2015;1-9.
392. Gallo S, Vanstone CA, Weiler HA. Normative data for bone mass in healthy term infants from birth to 1 year of age. *Journal of osteoporosis*. 2012;2012:672403.
393. Ramakrishnan U, Grant F, Goldenberg T, Zongrone A, Martorell R. Effect of women's nutrition before and during early pregnancy on maternal and infant outcomes: a systematic review. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2012;26 Suppl 1:285-301.
394. Kaludjerovic JVRSC. Relationship Between Vitamin D During Perinatal Development and Health. *Journal of Midwifery and Women's Health*. 2010;55(6):550-60.
395. Secura G. Long-acting reversible contraception: a practical solution to reduce unintended pregnancy. *Minerva ginecologica*. 2013;65(3):271-7.
396. McNaughton SA, Marks GC, Gaffney P, Williams G, Green A. Validation of a food-frequency questionnaire assessment of carotenoid and vitamin E intake using weighed food records and plasma biomarkers: the method of triads model. *European journal of clinical nutrition*. 2005;59(2):211-8.
397. Shuaibi AM, Sevenhuysen GP, House JD. Validation of a food choice map with a 3-day food record and serum values to assess folate and vitamin B-12 intake in college-aged women. *J Am Diet Assoc*. 2008;108(12):2041-50.
398. Verkleij-Hagoort AC, de Vries JH, Stegers MP, Lindemans J, Ursem NT, Steegers-Theunissen RP. Validation of the assessment of folate and vitamin B12 intake in women of reproductive age: the method of triads. *European journal of clinical nutrition*. 2007;61(5):610-5.
399. Daures JP, Gerber M, Scali J, Astre C, Bonifacj C, Kaaks R. Validation of a food-frequency questionnaire using multiple-day records and biochemical markers: application of the triads method. *Journal of epidemiology and biostatistics*. 2000;5(2):109-15.
400. Gurinovic M, Kadvan A, Vukotic M. The quality of nutrition in schoolchildren and adult members of families. In *Yugoslav Study of Atherosclerosis Precursors in Schoolchildren in Serbia: Twenty Years Follow-up*. Belgrade: Medical Faculty, University of Belgrade; 2011.
401. Elmadfa I, Freisling H. Nutritional status in Europe: methods and results. *Nutrition reviews*. 2009;67 Suppl 1:S130-4.
402. Rodler I, Biro L, Greiner E, Zajkas G, Szorad I, Varga A, et al. [Dietary survey in Hungary, 2003-2004]. *Orvosi hetilap*. 2005;146(34):1781-9.
403. Novakovic R, Cavelaars AE, Bekkering GE, Roman-Vinas B, Ngo J, Gurinovic M, et al. Micronutrient intake and status in Central and Eastern Europe compared with other European countries, results from the EURRECA network. *Public health nutrition*. 2013;16(5):824-40.
404. Lamberg-Allardt CJ, Outila TA, Karkkainen MU, Rita HJ, Valsta LM. Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland: could this be a concern in other parts of Europe? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(11):2066-73.
405. Cashman KD, Muldowney S, McNulty B, Nugent A, FitzGerald AP, Kiely M, et al. Vitamin D status of Irish adults: findings from the National Adult Nutrition Survey. *The British journal of nutrition*. 2013;109(7):1248-56.
406. International E. *CONSUMER LIFESTYLES IN SERBIA*. 2010.
407. Hu F. *Obesity Epidemiology*. Press OU, editor. USA2008.
408. Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clinical science*. 1972;43(3):413-31.

409. Vimalleswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS medicine*. 2013;10(2):e1001383.
410. Osowski JM, Beare T, Specker B. Validation of a food frequency questionnaire for assessment of calcium and bone-related nutrient intake in rural populations. *J Am Diet Assoc*. 2007;107(8):1349-55.
411. Pritchard JM, Seechurn T, Atkinson SA. A food frequency questionnaire for the assessment of calcium, vitamin D and vitamin K: a pilot validation study. *Nutrients*. 2010;2(8):805-19.
412. Preis SR, Spiegelman D, Zhao BB, Moshfegh A, Baer DJ, Willett WC. Application of a repeat-measure biomarker measurement error model to 2 validation studies: examination of the effect of within-person variation in biomarker measurements. *American journal of epidemiology*. 2011;173(6):683-94.
413. Kipnis V, Midthune D, Freedman L, Bingham S, Day NE, Riboli E, et al. Bias in dietary-report instruments and its implications for nutritional epidemiology. *Public health nutrition*. 2002;5(6a):915-23.
414. Kipnis V, Midthune D, Freedman LS, Bingham S, Schatzkin A, Subar A, et al. Empirical evidence of correlated biases in dietary assessment instruments and its implications. *American journal of epidemiology*. 2001;153(4):394-403.
415. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public health nutrition*. 2002;5(4):567-87.
416. Haugen M, Brantsaeter AL, Trogstad L, Alexander J, Roth C, Magnus P, et al. Vitamin D supplementation and reduced risk of preeclampsia in nulliparous women. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2009;20(5):720-6.
417. Genus SJ. Maternal and Pediatric Health Outcomes in relation to Gestational Vitamin D Sufficiency. *Obstetrics and gynecology international*. 2015;2015:501829.
418. Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2013;346:f1169.
419. Martineau AR, Khan K. Maternal vitamin D insufficiency is associated with adverse pregnancy and neonatal outcomes. *Evidence-based medicine*. 2014;19(1):e4.
420. Thorne-Lyman A, Fawzi WW. Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2012;26 Suppl 1:75-90.
421. Bodnar LM, Simhan HN, Catov JM, Roberts JM, Platt RW, Diesel JC, et al. Maternal vitamin D status and the risk of mild and severe preeclampsia. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2014;25(2):207-14.
422. Qiu C, Coughlin KB, Frederick IO, Sorensen TK, Williams MA. Dietary fiber intake in early pregnancy and risk of subsequent preeclampsia. *American journal of hypertension*. 2008;21(8):903-9.
423. Zhang C, Williams MA, King IB, Dashow EE, Sorensen TK, Frederick IO, et al. Vitamin C and the risk of preeclampsia--results from dietary questionnaire and plasma assay. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2002;13(4):409-16.
424. Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2015;74(2):115-24.
425. Gallagher JC, Yalamanchili V, Smith LM. The effect of vitamin D supplementation on serum 25(OH)D in thin and obese women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;136:195-200.

426. Singla R, Gurung P, Aggarwal N, Dutta U, Kochhar R. Relationship between preeclampsia and vitamin D deficiency: a case control study. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2015;291(6):1247-51.
427. Kovacs CS. Maternal vitamin D deficiency: Fetal and neonatal implications. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2013.
428. Fares S, Sethom MM, Khouaja-Mokrani C, Jabnoun S, Feki M, Kaabachi N. Vitamin A, E, and D deficiencies in tunisian very low birth weight neonates: prevalence and risk factors. *Pediatrics and neonatology*. 2014;55(3):196-201.
429. Eckhardt CL, Gernand AD, Roth DE, Bodnar LM. Maternal vitamin D status and infant anthropometry in a US multi-centre cohort study. *Annals of human biology*. 2014:1-8.
430. Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC, Gale CR, Dennison EM, Boucher BJ, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet*. 2006;367(9504):36-43.
431. Cooper C, Javaid K, Westlake S, Harvey N, Dennison E. Developmental origins of osteoporotic fracture: the role of maternal vitamin D insufficiency. *The Journal of nutrition*. 2005;135(11):2728s-34s.
432. Bailey D, Perumal N, Yazdanpanah M, Al Mahmud A, Baqui AH, Adeli K, et al. Maternal-fetal-infant dynamics of the C3-epimer of 25-hydroxyvitamin D. *Clinical biochemistry*. 2014;47(9):816-22.
433. Evers IM, de Valk HW, Visser GH. Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ (Clinical research ed)*. 2004;328(7445):915.
434. Bennett SE, Casey C, McPeake J, McCance DR, Manderson JG, McGinty A. 3-Epi-25 hydroxyvitamin D in pregnancy. *Pregnancy hypertension*. 2014;4(3):236.
435. Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstetrics and gynecology*. 2009;114(6):1326-31.
436. Haugen G, Helland I. Influence of preeclampsia or maternal intake of omega-3 fatty acids on the vasoactive effect of prostaglandin F-two-alpha in human umbilical arteries. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2001;52(2):75-81.
437. Zhang J, Klebanoff MA, Roberts JM. Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 2001;97(2):261-7.
438. Khalessi N, Kalani M, Araghi M, Farahani Z. The Relationship between Maternal Vitamin D Deficiency and Low Birth Weight Neonates. *Journal of family & reproductive health*. 2015;9(3):113-7.
439. Olmos-Ortiz A, Avila E, Durand-Carbajal M, Diaz L. Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. *Nutrients*. 2015;7(1):443-80.
440. Djekic-Ivankovic M, Weiler H, Jones G, Kaufmann M, Kaludjerovic J, Aleksic-Velickovic V, et al. Vitamin D status in mothers with pre-eclampsia and their infants: a case-control study from Serbia, a country without a vitamin D fortification policy. *Public health nutrition*. 2016:1-11.
441. Bodnar LM, Platt RW, Simhan HN. Early-pregnancy vitamin d deficiency and risk of preterm birth subtypes. *Obstetrics and gynecology*. 2015;125(2):439-47.
442. Wetta LA, Biggio JR, Cliver S, Abramovici A, Barnes S, Tita AT. Is midtrimester vitamin D status associated with spontaneous preterm birth and preeclampsia? *American journal of perinatology*. 2014;31(6):541-6.
443. Arain N, Mirza WA, Aslam M. Review-Vitamin D and the prevention of preeclampsia: A systematic review. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2015;28(3):1015-21.



444. McCarthy RA, McKenna MJ, Oyefeso O, Uduma O, Murray BF, Brady JJ, et al. Vitamin D nutritional status in preterm infants and response to supplementation. *The British journal of nutrition*. 2013;110(1):156-63.
445. Hanson C, Jones G, Lyden E, Kaufmann M, Armas L, Anderson-Berry A. Vitamin D metabolism in the premature newborn: A randomized trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2015.
446. Wagner D, Hanwell HE, Schnabl K, Yazdanpanah M, Kimball S, Fu L, et al. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 is predictive of 25-hydroxyvitamin D3 response to vitamin D3 supplementation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;126(3-5):72-7.
447. Folkert RD, Haynes RL, Borenstein NS, Belliveau RA, Trachtenberg F, Rosenberg PA, et al. Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(9):990-9.
448. Zhou YK, Liang Z, Guo Y, Zhang HT, Wang KH. High glucose upregulates CYP24A1 expression which attenuates the ability of 1,25(OH)2D3 to increase NGF secretion in a rat Schwann cell line RSC96. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;404:75-81.
449. Reiter EO, Braunstein GD, Vargas A, Root AW. Changes in 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1979;135(2):227-9.
450. Aksnes L, Aarskog D. Plasma concentrations of vitamin D metabolites in puberty: effect of sexual maturation and implications for growth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1982;55(1):94-101.
451. Weiler HA, Yuen CK, Seshia MM. Growth and bone mineralization of young adults weighing less than 1500 g at birth. *Early human development*. 2002;67(1-2):101-12.
452. Buttazzoni C, Rosengren B, Tveit M, Landin L, Nilsson JA, Karlsson M. Preterm Children Born Small for Gestational Age are at Risk for Low Adult Bone Mass. *Calcified tissue international*. 2016;98(2):105-13.
453. Fewtrell MS. Does early nutrition program later bone health in preterm infants? *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(6 Suppl):1870s-3s.
454. Torabi Z, Moemeni N, Ahmadi-far A, Mazloomzadeh S. The effect of calcium and phosphorus supplementation on metabolic bone disorders in premature infants. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2014;64(6):635-9.
455. Ebeling PR, Daly RM, Kerr DA, Kimlin MG. Building healthy bones throughout life: an evidence-informed strategy to prevent osteoporosis in Australia. *The Medical journal of Australia*. 2013;199(7 Suppl):S1.
456. Alizadeh Taheri P, Sajjadian N, Beyrami B, Shariat M. Prophylactic effect of low dose vitamin D in osteopenia of prematurity: a clinical trial study. *Acta medica Iranica*. 2014;52(9):671-4.
457. Weiler HA, Fitzpatrick-Wong SC, Schellenberg JM, Fair DE, McCloy UR, Veitch RR, et al. Minimal enteral feeding within 3 d of birth in prematurely born infants with birth weight < or = 1200 g improves bone mass by term age. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(1):155-62.
458. Chan GM, Armstrong C, Moyer-Mileur L, Hoff C. Growth and bone mineralization in children born prematurely. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2008;28(9):619-23.
459. Fleet JC, Bradley J, Reddy GS, Ray R, Wood RJ. 1 alpha,25-(OH)2-vitamin D3 analogs with minimal in vivo calcemic activity can stimulate significant transepithelial calcium transport and mRNA expression in vitro. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;329(2):228-34.

460. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;523(1):9-18.
461. Fraser WD, Ahmad AM, Vora JP. The physiology of the circadian rhythm of parathyroid hormone and its potential as a treatment for osteoporosis. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004;13(4):437-44.
462. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-Kopacz N. The relationship between the daily profile of chosen biochemical markers of bone metabolism and melatonin and other hormone secretion in rats under physiological conditions. *Neuro endocrinology letters*. 2002;23(5-6):417-25.
463. Shao P, Ohtsuka-Isoya M, Shinoda H. Circadian rhythms in serum bone markers and their relation to the effect of etidronate in rats. *Chronobiology international*. 2003;20(2):325-36.
464. Jubiz W, Canterbury JM, Reiss E, Tyler FH. Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels. *The Journal of clinical investigation*. 1972;51(8):2040-6.
465. Joo W, Singh H, Ahles CP, Lee Y, Colazas W, Lee LC, et al. Training-induced Increase in Bone Mineral Density between Growing Male and Female Rats. *International journal of sports medicine*. 2015;36(12):992-8.

## **8. PRILOZI**

**Prilog 1 Upitnik o uestalosti konzumiranja namirnica za procenu vitamina D kod žena u reproduktivnom dobu u Srbiji (WRH-FFQ)**

**OPŠTI UPITNIK**

1. Današnji datum :

2. Ime i prezime :

3. Godina rođenja:  Mesto rođenja:

4. Telesna masa (kg):  Telesna visina (cm):

5. Navedite najviši stupanj obrazovanja:

- osnovna škola
- zanat (3 godine)
- srednja škola (4 godine)
- viša škola (VI stepen)
- fakultet
- magistar/doktor
- ostalo: \_\_\_\_\_

6. Broj osoba u domaćinstvu: 0    1    2    3    4    5    \_\_\_\_\_

7. Bracno stanje:

- u braku     razveden     u zajednici     sam/sama

8. Koliko novca *nedeljno* izdvajate za hranu? \_\_\_\_\_ dinara

Koliki je to procenat vašeg kucnog budžeta? \_\_\_\_\_%

9. Da li ste alergični na neku namirnicu?

NE    DA → Ako DA, na koju?

10. Da li bolujete od neke hronične bolesti? NE    DA → Ako DA, od koje?

11. Da li TRENUTNO uzimate neke lekove?

NE    DA → Ako DA, koje?

12. Da li redovno tj. gotovo svaki dan uzimate dodatke ishrani, suplemenate npr vitamine ili mineralne (tablete, pastile, sirupi i sl.)?

NE DA → Ako DA, navedite naziv proizvoda ili neki drugi podatak o proizvodu:

Koliko dugo uzimate navedeni dodatak ishrani?  meseci.

Navedeni dodatak ishrani uzimate:

natašte/na prazan želudac  posle jela

13. Da li TRENUTNO pušite? NE DA → Ako DA, koliko cigareta na dan:

manje od 10  11-20  više od 20

14. Da li konzumirate alkoholana pića?

NE DA → Ako DA, najčešće pijete  pivo  žestoka pića  crno vino  belo vino

15. Koliko alkoholnih pića popijete tokom jedne prosečne NEDELJE?

*jedno alkoholno piće = 1 čaša vina ili 1 čaša piva ili 1 čašica žestokog alkoholnog pića*

0  1-7  8-14  više od 14 ili koliko pića nedeljno

16. Koliko šoljica kafe popijete tokom jednog prosečnog DANA?

0-1  2-3  4-5  više od 5

17. Da li konzumirate čaj?

NE DA → Ako DA, najčešće pijete  crni ili zeleni  drugi: \_\_\_\_\_

18. Koliko šoljica čaja popijete tokom jednog prosečnog DANA?

0-1  2-3  4-5  više od 5

19. Koliko gaziranih pića popijete tokom jedne prosečne NEDELJE?

*jedno gazirano piće = 1 čaša Coca-cola ili 1 čaša Fante ili 1 nekog drugog gaziranog pića*

0  1-7  8-14  više od 14 ili koliko pića nedeljno

20. Da li ste se suncali u zadnjih 3 meseca?

u solarijumu NE DA → Ako DA, koliko cesto \_\_\_\_\_ i koliko dugo \_\_\_\_\_ min

na moru NE DA → Ako DA, koliko cesto \_\_\_\_\_ i koliko dugo \_\_\_\_\_ min

Koje vitamine, suplimente ste koristili u **poslednja tri meseca?**

	Nikad		1 x mesечно	2/3 x mesечно	1 x nedeljno	2 x nedeljno	3/4 x nedeljno	5/6 x nedeljno	Dnevno	Upisite dozu ako je znate	Napisite koliko meseci uzimate navedeni preparat
Pojedinacni vitamini (ne u multivitaminским preparatima)											
Vitamin A	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Beta Karoten	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Vitamin C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Vitamin E	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Folna Kiselina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Kalcium	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Vitamin D	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Zink	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Gvozdje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Selen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Omega 3, riblje ulje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Multivitamini	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Ostali (upisite preparate koji pijete)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		

21. Da li se rekreirate (npr. hodanje, trčanje, fitnes, grupne vežbe i sl.)? NE DA →

Ako DA, koja aktivnost?

Koliko sati NEDELJNO?  manje od  $\frac{1}{2}$  h   $\frac{1}{2}$  -  $3\frac{1}{2}$  h  više od  $3\frac{1}{2}$  h

## ANKETNI UPITNIK ZA ISHRANU

Koliko puta NEDELJNO imate: Doručak je prvi obrok u danu (1-2 h nakon ustajanja),

užina\* je međuobrok između doručka i ručka. Užina\*\* je međuobrok između ručka i večere.

doručak 0 1 2 3 4 5 6 7

užinu\* 0 1 2 3 4 5 6 7

ručak 0 1 2 3 4 5 6 7

užinu\*\* 0 1 2 3 4 5 6 7

večeru 0 1 2 3 4 5 6 7

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

### Mlečni proizvodi:

#### 1. mleko

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 2. sir (edamer, feta, i sl.)

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 3. sir za rendanje (npr. parmezan, kackavalj)

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 4. sveži kravlji sir

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 5. jaja

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Meso:

#### 6. meso (svinjetina, govedina, jagnjetina i teletina)

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 7. piletina i ćuretina

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 8. džigerica

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

#### 9. jetrena pašteta

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

10. viršle, parizer i sunka

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

11. čvarci

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

12. roštilj

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

13. kobasice i ostali suhomesnati proizvodi

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

14. pečenje

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Riba:

1. losos

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

2. sardine u konzervi

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

3. tunjevina u konzervi

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

4. morska riba (skuša, sardela, oslić)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

5. rečna riba (pastrmka, saran, som, smudj)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno



## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

6. morski plodovi (lignje, školjke, rakovi)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

7. riblja pašteta

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Ulja

8. ulje suncokreta ili uljane repice (za prženje, kuvanje, salate)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

9. maslinovo ulje  za kuvanje  u salatama

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

10. druga ulja (susama, lana, bundeve, kikirikija, kukuruznih klica, koštica groždja)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

Navedite koje ulje najčešće koristite \_\_\_\_\_

11. svinjska mast (za prženje, kuvanje, u jelima)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Povrće

12. pasulj

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

13. sočivo

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

14. grašak

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

15. brokoli, karfiol, kelj

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

16. cvekla

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

17. zelena salata:

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

18. svež kupus

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

19. zelena boranija

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

20. sveža paprika

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

21. svež paradajz

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

22. krompir

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

23. spanać, blitva

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

24. šargarepa

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

25. kukuruz

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

26. Kiseli kupus, turšija

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Voće:

27. citrusi (pomorandža, mandarina, grejpfrut, limun)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

28. banane

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

29. jabuke, kruške

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

30. jagode, grožđe, borovnice

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

31. trešnje, višnje, šljive

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

32. suve šljive, suve smokve, suve kajsije

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

33. orašasti plodovi(koštunjavo voće) (bademi, orasi, lešnici)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

34. lubenice, dinje

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Žitarice:

35. proja, kačamak

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

36. testenina

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

37. pirinač

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

38. hleb:  beli  crni  integralni

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

39. kroasani, lisnata testa, biskviti

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

40. kolači i torte

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

41. žitarice (kukuruzne ili zobene pahuljice, musli i sl.)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

Koje žitarice NAJČEŠĆE konzumirate?

---

—  
(npr. obične kukuruzne pahuljice, obične zobene pahuljice ili nešto drugo)  
Molimo Vas za naziv proizvoda i ime proizvođača kao što je napisano na ambalaži!

42. kakao:  u prahu  Nesquik  \_\_\_\_\_

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

43.  Cedevida  Multivita  \_\_\_\_\_

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

44. čips, grisine, smoki (grickalice)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

45. kikiriki

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

46. čokolada

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

47. crna čokolada

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## ODABERITE UOBIČAJENU VELIČINU SERVIRANJA ZA 1 OBROK

45. mleko  1 dL  2 dL  1 šolja (2,5 dL)   $\frac{1}{2}$  L  1L  \_\_\_ dL

46. sir

A (25 g)



B (50 g)



ili C \_\_\_ grama

47. parmezan

1 kafena kašičica

\_\_\_ kafenih kašičica

48. sveži kravljji sir A (25 g)



B (50 g)



ili C \_\_\_ grama

49. jaja

1 kom.  \_\_\_ komada

50. jetrena pašteta  1 kafena kašičica  2 kafene kašičice  \_\_\_ kafenih kašičica

50a. riblja pašteta  1 kafena kašičica  2 kafene kašičice  \_\_\_ kafenih kašičica

51. riba u konzervi   $\frac{1}{2}$  konzerve ( \_\_\_ gr)  1 konzerva  2 konzerve  \_\_\_ konzerve

52. meso, živina, iznutrice, riba

A (100 g)



B (200 g)

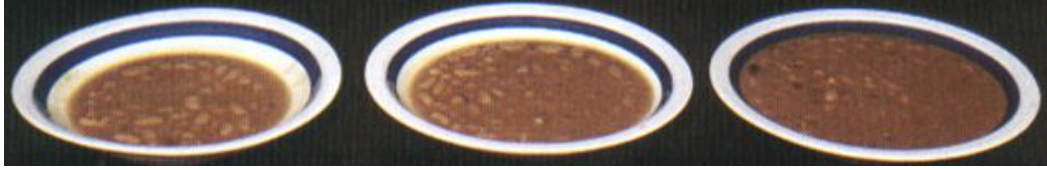


ili C \_\_\_ grama

53. pasulj, sočivo A (100 g)

B (180 g)

C ( 320 g)



ili D \_\_\_\_ grama

54. grašak

A (25 g)

B (125 g)

C ( 200 g)



ili D \_\_\_\_ grama

55. testenina A (100 g)

B (200 g)

C ( 350 g)



ili D \_\_\_\_ grama

56. pirinač A (150 g)

B (200 g)

C ( 350 g)



ili D \_\_\_\_ grama

57. hleb

A (40 g)

B (80 g)

C ( 120



ili D \_\_\_\_ grama

58. brokoli, karfiol, kelj

A (46 g)



B (84 g)



C (146 g)



ili D \_\_\_\_ grama

59. cvekla

A (100 g)



B (180 g)



C ( 230 g)



ili D \_\_\_\_ grama

60. zelena salata

A (15 g)



B (35 g)



ili C \_\_\_\_ grama

61. kupus

A (75 g)



B (130 g)



C ( 200 g)



ili D \_\_\_\_ grama

62. boranija A (60 g)

B (150 g)

C ( 235 g)



ili D \_\_\_\_ grama



63. paprika

A (55 g)



B (100 g)



ili C \_\_\_\_ grama

64. paradajz

A (80 g)



B (180 g)



ili C \_\_\_\_ grama

65. spanać, blitva

A (110 g)



B (190 g)



C (225 g)



ili D \_\_\_\_ grama

66. krompir

A (150 g)



B (300 g)



C ( 500 g)



ili D \_\_\_\_ grama

67. pomorandža, mandarina, grejpfrut, limun

1 kom.

2 kom.

\_\_\_\_ komada

68. banane

1 kom.

2 kom.

\_\_\_\_ komada

69. jabuke, kruške  1 kom.

2 kom.

\_\_\_\_ komada

70 a). jagode, maline, kupine (1 šolja = 2,5 dL)

$\frac{1}{2}$  šolje

1 šolja

$1\frac{1}{2}$  šolja

2 šolje

\_\_\_\_ šolje

70 b). grožđe, borovnice, ribizle (1 šolja = 2,5 dL)

$\frac{1}{2}$  šolje     1 šolja      $1\frac{1}{2}$  šolja     2 šolje     \_\_\_\_ šolje

71. trešnje, višnje, šljive (1 šolja = 2,5 dL)

$\frac{1}{2}$  šolje     1 šolja      $1\frac{1}{2}$  šolja     2 šolje     \_\_\_\_ šolje

72. suve šljive, suve smokve

2-3 kom.     10 kom.     \_\_\_\_ kom.

73. orašasti plodovi (koštunjavo voće) (bademi, orasi, lešnici i sl.)

2-3 kom.     10 kom.     \_\_\_\_ kom.

74. čokolada

cela čokolada (100 g)      $\frac{1}{2}$  čokolade (50 g)     \_\_\_\_ g

75. kakao

1 kafena kašičica     2 kafene kašičice     \_\_\_\_ kafenih kašičica

76. Cedevida, Multivita i sl.

1 kafena kašičica     2 kafene kašičice     \_\_\_\_ kafenih kašičica

77. Koliko vode popijete DNEVNO? (vodovodne i flaširane)

1 dL     2 dL      $\frac{1}{2}$  L     1L     \_\_\_\_ dL

80. koju količinu ulja koristite pri pripremi jela (prženje, kvanje)

1 dL     2 dL     1 šolja (2,5 dL)      $\frac{1}{2}$  L     1L     \_\_\_\_ dL

81. koju količinu ulja koristite u salatama

1 velika kašika     2 velike kašike     \_\_\_\_ velikih kašika

78. Žitarice: kukuruzne pahuljice i sl.

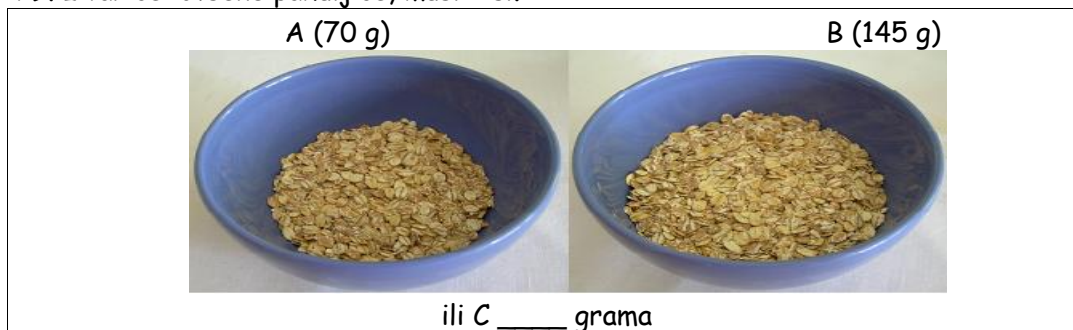
A (35 g)

B (85 g)



ili C \_\_\_\_ grama

79. Žitarice: ovsene pahuljice, musli i sl.



80. koju količinu ulja koristite pri pripremi jela (prženje, kvanje)

1 dL  2 dL  1 šolja (2,5 dL)   $\frac{1}{2}$  L  1L  \_\_\_\_ dL

81. koju količinu ulja koristite u salatama

1 velika kašika  2 velike kašike  \_\_\_\_ velikih kašika

82. Da li konzumirate hranu obogaćenu vitaminom D?

(proizvodi koji na ambalaži imaju oznaku: *obogaćeno vitaminom D npr. AD MLEKO*

*IMLEK*) NE DA → Ako DA, navedite proizvod:

Koliko često ste navedeni proizvod konzumirali tokom poslednjih mesec dana?

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno

jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

Koja je vaša uobičajena porcija? \_\_\_\_\_

(kao pomoć za opis porcije možete se poslužiti slikama s prethodnih stranica)

83. Da li konzumirate hranu obogaćenu folnom kiselinom i/ili vitaminom B<sub>12</sub> ?

(to su proizvodi koji na ambalaži imaju oznaku: *obogaćeno folnom kiselinom i/ili*

vitaminom B<sub>12</sub>) NE DA → Ako DA, navedite proizvod:

Koliko često ste navedeni proizvod konzumirali tokom poslednjih mesec dana?

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno

jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

Koja je vaša uobičajena porcija? \_\_\_\_\_

(kao pomoć za opis porcije možete se poslužiti slikama s prethodnih stranica)

Vrsta hrane ili pica	Nikad	1 x meseno	2-3 x meseno	1 x nedeljno	2 x nedeljno	3-4 x nedeljno	5-6 x nedeljno	1 x dnevno	2+x dnevno	Srednje velicine	Vaša količina		
											Mala	Srednja	Velika
okoladno mleko										1 aša (250 mL)			
Sojino mleko										1 aša (250 mL)			
Mleko u kafi ili aju										1 velika kašika			
Mleko na pahuljicama (ako niste ve ura unali)										½ aše (125 mL)			
Mle ni desert (sladoled, puding)										½ aše (125 mL, 1 kugla)			
Jogurt od mleka ili soje										½ aše (125 g, 1 malo pakovanje)			
Mladi sir										2 kriške manje			
Tvrđi sir										2 kriške manje			
Kajmak										1 velika kašika			
Palacinke ili przenice										1 parce (1 komad)			
Puter										1 mala kasi ica			
Margarin										1 mala kasi ica			
Tofu										1 kriš ica ili 1 kašika			
Makarone ili pita sa sirom										1 aša ili 1 par e			
Skuša iz konzerve										2 ribe (1/2 konzerve)			
Sardine iz konzerve										2 ribe (1/2 konzerve)			
Pastrmka fileti										90g			
Krem supa ili orba										1 casa (250 mL)			
Pizza sa sirom										1 par e			
Pire krompir sa mlekom ili margarinom										½ aše (125 mL)			
Cedjeni sok od pomorandže										1 aša (250 mL)			
Kupovni sok od pomorandže										1 aša (250 mL)			
Govedina ili svinjetina kuvana										90 g			
Slanina ili kobasice										2 komada			
Ajvar, pindjur										1 velika kašika			
Majonez u salati, sendvi ima ili jelima										1 mala kaši ica			

**Prilog 2. Spisak namirnica koje su zabeležene pomo u WRH-  
FFQ i 24-h recall upitnika**

Namirnice u WRH-FFQ upitnik	Namirnice zabeležene sa 24-h recall
<b>Mleko, mlečni proizvodi i alternative</b>	
Mleko	✓
Sir tvrdi, edamer ili kačkavalj	–
Feta	✓
Parmezan	✓
Mladi sir (gruda)	✓
Čokoladno mleko	✓
Mleko od soje	✓
Mleko u kafi ili čaju	✓
Mleko sa pahuljicama (ako nije već uračunato)	✓
Sladoled mlečni	✓
Jogurt	✓
Tvrdi prevreli sirevi (slični feti)	✓
Mladi sirevi (slični mocareli)	✓
Kajmak	✓
Tofu sir	–
Buter	✓
<b>Meso i mesne prerađevine</b>	
Svinjetina	✓
Teletina	✓
Jagnjetina	✓
Junetina	✓
Piletina ili ćuretina	✓
Dzigerica (pileća, juneća)	✓
Jetrena pašteta	✓
Šunka	–
Viršle	✓
Čvarci	–
Roštilj	✓
Kobasice	✓
Kuvana junetina ili svinjetina	✓
Slanina ili pršuta	✓
Pečenje jagneće ili svinjsko	✓
<b>Riba i plodovi mora</b>	
Losos	✓
Sardine u konzervi	✓
Tunjevina u konzervi	✓
Tunjevina sveža	–
Skuša	–
Pastrmka	✓
Som	–
Oslić	–
Mešani morski plodovi	–
Riblja pašteta	–
<b>Mast ili ulje</b>	
Ulje (suncokretovo)	✓
Ulje uljane repice	–
Maslinovo ulje	✓
Druga ulja	–

Namirnice u WRH-FFQ upitnik	Namirnice zabeležene sa 24-h recall
<b>Povrće</b>	
Pasulj	✓
Sočivo	–
Grašak	✓
Brokoli	✓
Karfiol	–
Kelj	–
Cvekla	✓
Zelena salata	–
Kupus	✓
Boranija	✓
Paprike sveže	–
Paradajz svež	–
Krompir	✓
Spanać	✓
Blitva	–
Šargarepe	✓
Kukuruz	✓
Kiseli kupus	✓
Kiseli krastavčići	✓
Ajvar/pindjur	✓
Kisele paprike	–
<b>Voće</b>	
Pomorandže	✓
Mandarine	✓
Grejpfrut	–
Limun	✓
Banane	✓
Jabuke	✓
Kruške	✓
Jagode	–
Grožđe belo	–
Grožđe crno	–
Borovnice	–
Trešnje	–
Višnje	–
Šljive	–
Suve šljive	✓
Suve smokve	–
Suve kajsije	–
Dinja	–
Lubenica	–
<b>Žitarice i proizvodi</b>	
Projara ili proja	✓
Palenta	✓
Makaroni, špageti	✓
Pirinač	✓
Hleb beli	✓
Hleb od celog zrna pšenice	✓

Margarin	–
Mast (svinjska)	–
Majonez (u sendvičima i salatama)	✓
<b>Pića</b>	
Kafa	✓
Čaj	✓
Sveže ceđeni sok od pomorandže	✓
Sok (paradajz, pomorandža, jabuka)	✓
Cedevita	✓
<b>Jaja</b>	
Jaja	✓
<b>Orašasti plodovi I semenke</b>	
Orasi	✓
Lešnici	✓
Bademi	✓
Kikiriki	✓
Semenke (bindeve, suncokreta)	–

Ražani hleb	–
Kroasani I listnato testo	✓
Kolači I torte	✓
Pahuljice ječmene	–
Pahuljice kukuruzne	✓
Palačinke ili prženice	✓
<b>Ostali proizvodi</b>	
Kakao	–
Nesquik	–
Čips	✓
Smoki	–
Mlečna čokolada	✓
Crna čokolada	✓
Gibanica ili pita sa sirom	✓
Supa	✓
Pizza sa sirom	✓
Pire-krompir sa buterom I mlekom	✓

3.

a \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

: 18/2010

„ \_\_\_\_\_ C-3 -e 25- \_\_\_\_\_ ”

)  
)

)  
)

, 06.06.2016.





4.

o

\_\_\_\_\_ -  
: 18/2010  
\_\_\_\_\_

„ \_\_\_\_\_ C-3 -e 25- \_\_\_\_\_ ”

:

:

, 06.06.2016.

*P. Jent-Neuwirth*

5.

” “

:

“ C-3 -e 25- ”

(Creative Commons)

/ .

1.

2. -

3. - -

4. - -

5. -

6. -

( ).

, 06.06.2016.



1. - , ,  
, , .

2. - , . ,  
, , .

3. - - , ,  
, , .

4. - - , ,  
, , .

5. - , , ,  
, , .

6. - , , ,  
, , .

# Biografija

Marija Djeki -Ivanković rođena je 07. aprila 1981 godine u Valjevu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2000. godine. Diplomirala je 2007. godine, na smeru Diplomirani farmaceut. Nakon objavljivanja prvog naučnog rada, 2010. godine započela je doktorske studije na Hemijskom fakultetu (Biohemija), pod mentorstvom dr Ljube Mandić, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zaposlila se kao istraživač-pripravnik u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu 2009. godine. U Centru izuzetnih vrednosti u oblasti ishrane i metabolizma bila je angažovana na više naučnih istraživačkih projekata, finansiranih od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije, u periodu od 2009. do 2015. godine. U periodu od 2009. do danas, kao deo istraživačkog tima Marija je bila angažovana na 5 međunarodnih projekata Šestog i Sedmog okvirnog programa Evropske komisije: „*Sustainable exploitation of bioactive components from the Black Sea Area traditional foods FP7 (BaSeFood)*”, „*European Food Information Resource Network FP6 (EuroFIR)*”, „*European Food Information Resource Network Food Platform FP7 (EuroFIR Nexus)*”, „*Harmonizing nutrient recommendations across Europe with special focus on vulnerable groups and consumer understanding FP6 (EURRECA)*”, i „*Food-based solutions for optimal vitamin D nutrition and health through the life cycle FP7 (ODIN)*”. Učestvuje u radu organizacije *Capacity Development Network in Nutrition for West Balkan and Central and Eastern Europe (CAPNUTRA)*. Autor je i koautor 9 radova publikovanih u međunarodnim časopisima od kojih je 5 publikovano u vrhunskim međunarodnim časopisima. Dobitnik je nagrada za usavršavanje studenata EuroFIR-a (2009) i Mary Frances Picciano (2011) Američkog instituta zdravlja. Kao gostujuć i student provela je 3 godine u laboratoriji Dr Hope Weiler na McGill Univerzitetu u Kanadi i mesec dana u Institutu za istraživanje hrane u Norveškoj i u Velikoj Britaniji. Član je Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za ishranu, Američkog društva za ishranu i Internacionalnog društva za promicanje humanog mleka i laktacije.

## OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA INE DEO DISERTACIJE

### Radovi u vrhunskom meunarodnom časopisu (M<sub>21</sub>)

1. Djekic-Ivankovic M., Weiler H.A., Jones G., Kaufmann M., Kaludjerovic J., Aleksic-Velickovic V., Mandic L., Glibetic M. Vitamin D Status in Mothers with Preeclampsia and Their Infants: A Case Control Study from Serbia. *Public Health Nutrition*, 2016, <http://dx.doi.org/10.1017/S1368980016000409>.
2. Djekic-Ivankovic M., Weiler H.A., Nikolic M., Kadnan A., Gurinovic M., Mandic Lj., Glibetic M. Validity of a Food Frequency Questionnaire Assessing the Vitamin D Intake of Young Serbian Women Living in a Region without Food Fortification: The method of triads model. *Public Health Nutrition*, 2016, 19 (3): 437-445. [doi:10.1017/S136898001500138X](http://dx.doi.org/10.1017/S136898001500138X)

### Saopštenja na skupu meunarodnog značaja štampana u izvodu (M<sub>34</sub>)

1. Djekic-Ivankovic M., Lavery P., Agellon S., Weiler H.A. C-3 alpha Epimer of 25-Hydroxyvitamin D3 from endogenous and exogenous sources supports normal growth and bone mineral density in weanling rats. Canadian National Perinatal Research Meeting. Banff, February 2016. Abstract O15. p.77
2. Djekic-Ivankovic M., Weiler H.A., Jones G., Kaufmann M., Kaludjerovic J., Aleksic-Velickovic V., Mandic L., Glibetic M. Vitamin D Plasma 3-epi-25-Hydroxyvitamin D3 in Very Low Birth Weight Preterm Infants in Canada during the First Five Weeks after Birth. Experimental Biology 2015. Boston, March 2015. Abstract p.901
3. Djekic-Ivankovic M., Jones G., Kaufmann M., Weiler H.A. Vitamin D Status Is Low in Mothers with Preeclampsia and Their Infants: A Case Control Study from Serbia. Experimental Biology 2015. Boston, March 2015. Abstract p.590
4. Djekic-Ivankovic M., Mak I., Wang K., Lavery P., Agellon S. and Weiler H. High dose C-3 alpha epimer of 25-hydroxyvitamin D over 8 weeks reduces cortical mineral density of lumbar vertebra in weanling rats. Experimental Biology. April 2014. FASEB J. 28, 828.2