

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**NOVI SAD**

**Dimitrije Jeremić**

**Značaj određivanja koncentracije D vitamina u evaluaciji  
karcinoma prostate**

**Doktorska disertacija**

Novi Sad, 2013. godina

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

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

Dimitrije Jeremić

AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje):

Prof. dr Goran Marušić, doc. Dr Nikola Ćurić

MN

Naslov rada:

Značaj određivanja koncentracije D vitamina u  
evaluaciji karcinoma prostate

NR

Jezik publikacije:

Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski  
JI

Zemlja publikovanja: Srbija  
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina  
UGP

Godina: 2013.  
GO

Izdavač: Autorski reprint  
IZ

Mesto i adresa: Medicinski fakultet  
MA  
Hajduk Veljkova 3  
21000 Novi Sad

Fizički opis rada: 9 poglavlja / 113 stranica / 3 slike / 31 tabela / 30  
FO grafikona / 245 referenci / 3 priloga

Naučna oblast: Medicina  
NO

Naučna disciplina: Urologija, onkologija  
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Neoplazme prostate; Karcinom; Vitamin D;  
PO stadijum neoplazme

UDK 616.65-006.6:577.161.2

Čuva se: Univerzitet u Novom Sadu  
ČU Biblioteka Medicinskog fakulteta  
Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

Vitamin D ima antiproliferativno, proapoptotsko i prodiferencijaciono dejstvo. Dokazi o dejstvu na ćelije adenokarcinoma prostate su malobrojni i nekonzistentni. Cilj ispitivanja je određivanje stepena povezanosti između nivoa vitamina D, stadijuma adenokarcinoma prostate, prostata specifičnog antigena, Gleason grade i progresije oboljenja. Ispitivanje je prospektivno, sprovedeno na 120 ispitanika (90 pacijenata sa dijagnostikovanom karcinomom prostate i 30 kontrolnih, zdravih subjekata). Pacijenti sa dijagnostikovanom adenokarcinomom prostate podeljeni su prema stadijumu bolesti u dve grupe: lokalizovano (pT2cN0M0, prostata specifični antigen  $\leq 20$  ng/ml, Gleason 2-7) i metastatsko oboljenje (pT3-4, N1, M 0,1(a,b,c), prostata specifični antigen  $\geq 20$  ng/ml, Gleason  $\geq 8$ ), dok su prema ordiniranoj terapiji podeljeni u tri grupe: pacijenti koji su hemijski kastrirani, hirurški kastrirani i grupa kod koje je urađena radikalna prostatektomija. Uzorci za analizu nivoa vitamina D i prostata specifičnog antigen uzeti pre ordinirane terapije a nakon toga posle 6 i 12 meseci. Kako ne postoje definisane vrednosti unosa vitamina D i kalcijuma za ispitivano podneblje formirani smo Upitnik kojim smo evaluirali dnevni unos kod 90 zdravih subjekata muškog pola starijih od 50 godina koji nisu učestvovali u ispitivanju. Da bismo uočili ispitanike koji su hranom ili životnim navikama drastično uticali na vrednost vitamina D isti Upitnik su ispunili svi ispitanici uključeni u ispitivanje. Ustanovljena je očuvana godišnja oscilacija vitamina D kod ispitanika te smo statističkim modelom korigovali ovu varijablu. Rezultati pokazuju da grupa obolelih nema apsolutno niske vrednosti vitamina D i da su vrednosti kod obolelih niže u odnosu na kontrolne subjekte (64.12 nmol/l vs. 74.45 nmol/l). Nije uočena razlika u nivou vitamina D kod pacijenata sa lokalizovanim i metastatskim oboljenjem (62.90 nmol/l vs. 64,65 nmol/l). Odnos između prostata specifičnog antigena i vitamina D posmatran tokom perioda ispitivanja pokazuje da je kod obolelih pacijenata koji su

hemijski ili hirurški kastrirani i kod pacijenata kod kojih je urađena radikalna prostatektomija postoji pozitivna korelacija pre ordinirane terapije u sve tri grupe, nakon ordinirane terapije možemo uočiti inverznu korelaciju. Kontrolna grupa ispitanika pokazuje stalnu pozitivnu korelaciju između nivoa vitamina D i prostata specifičnog antigena. Pacijenti kod kojih je došlo do progresije imaju niže vrednosti nivoa vitamina D u odnosu na pacijente kod kojih nije došlo do progresije. Nije ustanovljena korelacija između vremenskog intervala do progresije oboljenja i nivoa vitamina D.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 31.05.2011.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

KO

predsednik: prof.dr Jasenko Dozić, redovni profesor, Klinika za urologiju, Klinički centar Vojvodine

član: prof.dr Vuk Sekulić, vanredni profesor, Klinika za urologiju, Klinički centar Vojvodine

član: prof. dr Zoran Džamić, vanredni profesor, Klinika za urologiju, Klinički centar Srbije

član: doc. dr Saša Vojinović, docent, Klinika za urologiju, Klinički centar Vojvodine

član: doc. dr Ivan Levakov, docent, Klinika za urologiju, Klinički centar Vojvodine

University of Novi Sad

ACIMSI

Key word documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph documentation

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Contents code:

Ph. D. Thesis

CC

Author:

Dimitrije Jeremić

AU

Mentor:

Prof. dr Goran Marušić, Asst Prof Nikola Ćurić

MN

Title:

Significance of vitamin D level determination in  
prostate cancer

TI

Language of text:	Serbian
LT	
Language of abstract:	English / Serbian
LA	
Country of publication:	Serbia
CP	
Locality of publication:	Vojvodina
LP	
Publication year:	2013.
PY	
Publisher:	Author`s reprint
PU	
Publication place:	Faculty of Medicine
PP	Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
Physical description:	9 chapters / 113 pages/ 3 pictures / 31 tables / 30 graphs / 245 references / 3 appendix
PD	
Scientific field	Medicine
SF	
Scientific discipline	Urology, Oncology
SD	
Subject, Key words	Prostatic Neoplasms; Carcinoma; Vitamin D, Neoplasm Staging
SKW	
UC	616.65-006.6:577.161.2
Holding data:	University of Novi Sad
HD	Library of the Faculty of Medicine

Note:

N

Abstract:

AB

Vitamin D has antiproliferative, proapoptotic and prodifferentiation actions. There is a limited number of studies assessing influence of vitamin D on prostate cancer. Results of those available studies are inconsistent. This study hypothesizes with correlation of vitamin D, prostate cancer stage, prostate specific antigen, Gleason grade, stage, and disease progression. This prospective study included 120 subjects (90 subjects with diagnosed prostate cancer and 30 healthy, age adjusted controls). Patients with diagnosed prostate cancer formed two groups by criterion of disease advancement: localised ( $\leq$ pT2cN0M0, prostate specific antigen  $\leq$  20 ng/ml, Gleason 2-7) and metastatic ( $\geq$ pT3-4, N1, M 0,1(a,b,c), prostate specific antigen  $\geq$  20 ng/ml, Gleason  $\geq$  8). According to applied therapy subjects were divided in three groups: surgically castrated, medicamentous castrated and radical prostatectomy treated. Samples were obtained before therapy and after 6 and 12 months. As no defined value for vitamin D and calcium intake could be found we formed Questionnaire for vitamin D and calcium intake. Data were obtained from 90 healthy, age adjusted subjects, not included in this study. All subjects included in this study filed the Questionnaire and subjects with unusual vitamin D and calcium intake were excluded. Annual oscillation of vitamin D was observed, so we applied statistical model that excluded this variable. Subjects with diagnosed prostate cancer didn't have absolutely low vitamin D level. This level was lower in group of subjects with diagnosed prostate cancer comparing to controls (64.12 nmol/l vs. 74.45 nmol/l). No differences in vitamin D level was observed in groups of patients with localised and metastatic disease (62.90 nmol/l vs. 64,65 nmol/l). Correlation of vitamin D and prostate specific antigen during 12 months period showed that



castrated subjects and subjects in radical prostatectomy group showed positive correlation before surgical treatment and inverse, negative correlation, after treatment. Control group showed positive correlation of vitamin D and prostate specific antigen in all three measurements. Subjects with progression have significantly lower vitamin D level comparing to subjects without progression. No correlation between time to progression and vitamin D have been observed.

Accepted on Scientific Board on: 31.05.2011.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

president: prof.dr. Jasenko Đozić, Urology Clinic,  
Clinical Center of Vojvodina

member: prof.dr. Vuk Sekulić, Urology Clinic,  
Clinical Center of Vojvodina

member: prof. dr. Zoran Džamić, Urology Clinic,  
Clinical Center of Serbia

member: ass. prof. dr. Saša Vojinov, Urology Clinic,  
Clinical Center of Vojvodina

member: ass. prof. dr. Ivan Levakov, Urology  
Clinic, Clinical Center of Vojvodina

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Goranu Marušiću, na stručnoj pomoći i idejama koje su pomogle u koncipiranju istraživanja za doktorsku disertaciju. Njegova neizmerna podrška, koju mi pruža od samog dolaska na Klinikum za urologiju, predstavlja pravo značenje reči mentor.

Zahvaljujem se komentoru doc. dr Nikoli Ćuriću koji mi je svojim iskustvom, savetima i podsticanjem u velikoj meri pomogao u izradi teze.

## Skraćenice

1. Proliferativna inflamatorna atrofija (PIA).
2. High grade prostatic intraepitel neoplasia (HGPIN)
3. Prostata specifični antigen (PSA)
4. Ultrasonografski (USG)
5. Active surveillance (AS)
6. Watchfull waiting (WW)
7. Tumor, nodus , metastaza (TNM)
8. Radiološki (RTG)
9. Dihidrotestosteron (DHT)
10. Radikalna prostatektomija (RP)
11. Vitamin D receptor (VDR)
12. Paratireoidni hormon (PTH)
13. Kalcitonin (CT)
14. Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 (TRPV6)
15. Plasma membrane calcium atpase 1b (PMCA1b)
16. Membrane-associated rapid response steroid-binding protein(MARRS)
17. Knock-out (KO)
18. Calcium sensing receptor (CASR)
19. Na<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> pumpa (NCX1)
20. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)
21. Tumor necrosis factor (TNM)
22. Vitamin D vezujući protein (VDPB)
23. Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK)
24. Retinoidni X receptor (RXR)
25. Internacionalna jedinica (IU)

26. Intracelularni vitamin D vezujući proteini (IDBPs)
27. Fibroblastni faktor rasta 23 (FGF23)
28. Nasledni hipokalcemijski vitamin D rezistentni rahitis (HVDRR)
29. Interleukin 2 (IL2)
30. Kisela fofsataza (PAP)
31. Prostata specifični membranski antigen (PSMA)
32. Retinoblastoma protein (RB)
33. Ciklin zavisnih kinaznim inhibitorima (CDKi)
34. Transforming growth factor b (TGF b)
35. Insulin growth factor binding protein 3 (IGFBP-3)
36. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)
37. Proliferativna inflamatorna atrofija (PIA)
38. High grade prostatična intraepitelna neoplazija (HGPIN)
39. Ciklooksigenaza 2 (COX2)
40. Dual specificity phosphatase 10 (DUSP10)
41. Mitogen-activated protein kinases (MAPKS)
42. Body mass indeks (BMI)
43. 24-chloro calcipotriene-based vitamin D3 analog (BGP-15)
44. Insulin growth factor (IGF)
45. Epidermalni faktor rasta (EGF)
46. Keratinocitni faktor rasta (KGF)
47. Bazični fibroblastni faktor rasta (BFGF)
48. Transformišući faktori rasta (TGFS)
49. Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO)
50. European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC)
51. Prostate Testing for Cancer and Treatment ( ProtecT)
52. Physicians' Health Study (PHS)

53. vreme udvostručenja PSA (PSADT)

54.  $1\alpha,25$ - dihydroxy-16-ene-23-yne-cholecalciferol (16-23-D 3)

## Sadržaj

1.	<b>Uvod</b> .....	1
1.1.	Incidenca i mortalitet.....	1
1.2.	Faktori koji utiču na razvoj adenokarcinoma prostate.....	3
1.2.1.	Genetski faktori.....	3
1.2.2.	Inflamacija i infekcija.....	3
1.3.	Dijagnostika karcinoma prostate.....	4
1.3.1.	Digitorektalni pregled.....	4
1.3.2.	Prostata specifični antigen.....	4
1.3.3.	Biopsija prostate.....	5
1.4.	Tumor node metastasis (TNM) klasifikacija.....	5
1.4.1.	T staging.....	5
1.4.2.	N staging.....	6
1.4.3.	M staging.....	6
1.5.	Modaliteti lečenja.....	6
1.5.1.	Radikalna prostatektomija (RP).....	7
1.5.2.	Medikamentozna kastracija.....	7
1.5.3.	LHRH agonisti.....	7
1.5.4.	Antiandrogeni.....	8
1.5.5.	Kompletna androgena blokada.....	8
1.5.6.	Hirurška kastracija.....	8
1.6.	Praćenje i progresija bolesti.....	9
1.6.1.	PSA.....	9
1.6.2.	DRE.....	9
1.7.	Vitamin D.....	9
1.7.1.	Metabolizam kalcijuma.....	10

1.7.2.	Transport kalcijuma u enterocitima .....	11
1.7.3.	Metabolizam kalcijuma u bubrezima .....	12
1.7.4.	Metabolizam kalcijuma u kostima.....	13
1.7.5.	Metabolizam fosfata .....	13
1.7.6.	Fiziološke i patološke vrednosti vitamina D .....	14
1.7.7.	Sinteza vitamina D .....	15
1.7.8.	VDR i polimorfizam VDR receptora.....	17
1.7.9.	Geni pod kontrolom VDR.....	20
1.8	Antikancersko dejstvo.....	22
1.8.1	Epidemiološke studije antikancerskog dejstva vitamina D .....	22
1.8.2.	Serološke studije antikancerskog dejstva vitamina D.....	24
1.8.3.	Ispitivanja in vitro antikancerskog dejstva vitamina D.....	25
1.8.4.	Ispitivajna in vivo antikancerskog dejstva vitamina D.....	30
1.8.5.	Uloga vitamina D u regulaciji zapaljenskih procesa.....	31
2.	<b>Materijal i metode</b> .....	32
2.1.	Ispitanici .....	32
2.1.1.	Konstrukcija i način izbora uzorka .....	32
2.1.2.	Pacijenti sa dijagnostikovanim karcinomom prostate .....	32
2.1.3.	Kontrolna grupa.....	33
2.2.	Uticaj pigmentacije kože na apsorpciju UVB zraka.....	34
2.3.	Upitnik za procenu uticaja insolacije, ishrane i suplemenata .....	35
2.3.1.	Uticaj vitamina D i kalcijuma .....	35
2.3.2.	Uticaj insolacije .....	36
3.	<b>Metodologija rada</b> .....	36
4.	<b>Ciljevi i hipoteze</b> .....	38
4.1.	Ciljevi .....	38

4.2.	Hipoteze rada.....	38
5.	<b>Rezultati</b> .....	39
5.1.	Nivo vitamina D u grupama ispitanika.....	39
5.2.	Uticaj insolacije na vrednost vitamina D i korelacija sa vrstom oboljenja.....	41
5.3.	Nivo vitamina D prema nivou PSA.....	44
5.4.	Korelacija nivoa vitamina D i Gleason grade i scor.....	49
5.5.	Nivo vitamina D kod pacijenata kod kojih je došlo do progresije bolesti.....	53
5.6.	Promena nivoa PSA nakon lečenja i određivanje stepena povezanosti sa nivoom vitamina D.....	53
5.7.	Nivo vitamina D i vreme do progresije.....	54
6.	<b>Diskusija</b> .....	58
6.1.	Nivo vitamina D kod kontrolne grupe (Z).....	58
6.2.	Uticaj insolacije na vrednosti vitamina D - sezonska oscilacija nivoa vitamina D.....	58
6.3.	Nivo vitamina D u grupama ispitanika.....	60
6.4.	Nivo vitamina D prema nivou PSA.....	64
6.5.	Nivo vitamina D prema Gleason grade i scor.....	68
6.6.	Nivo vitamina D kod pacijenata kod kojih je došlo do progresije bolesti.....	75
6.7.	Promena nivoa PSA nakon lečenja i korelacija sa nivoom vitamina D.....	79
6.8.	Nivo vitamina D i vreme do progresije.....	84
7.	<b>Zaključci</b> .....	87
8.	<b>Literatura</b> .....	88
9.	<b>Prilozi</b> .....	108



## **1. Uvod**

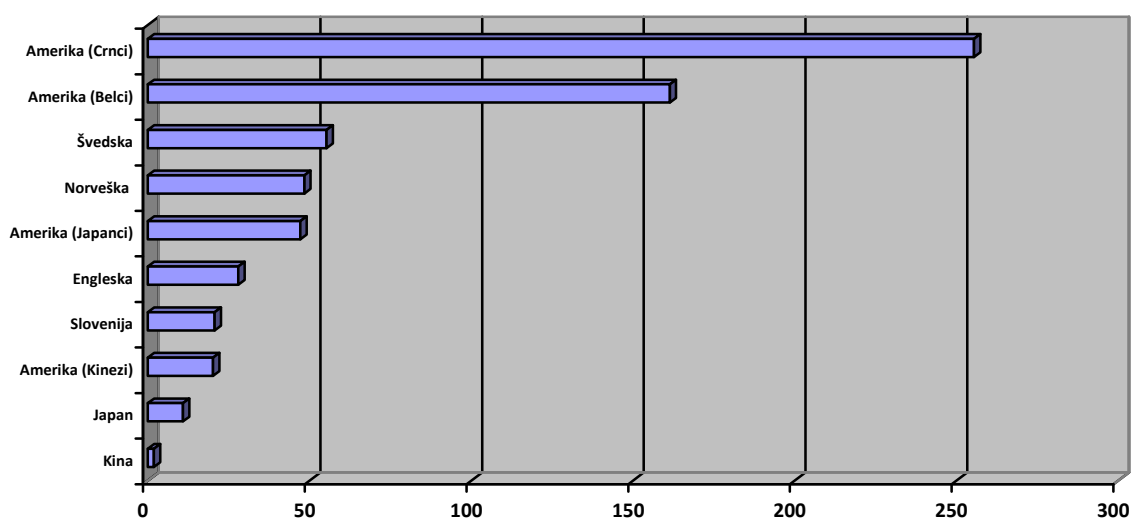
Adenokarcinom prostate je često oboljenje koje se javlja u starijoj životnoj dobi. Oboljenje ima dug period razvoja i nizak mortalitet te može u značajnoj meri uticati na smanjenje kvaliteta života. Utvrđeno je da razvoj karcinoma prostate predstavlja kompleksnu interakciju između genetskih faktora i faktora sredine. Kombinacija dugog perioda razvoja bolesti, niske stope mortaliteta, uticaja faktora sredine i mogućnosti otkrivanja oboljenja u ranom stadijumu čine adenokarcinom prostate pogodnim za primenu hemopreventivnih mera. Nažalost, sa faktorima koji bi mogli delovati na karcinom prostate u hemopreventivnom smislu dosta se hipotetiše, uz mali broj studija koje jasno definišu njihov značaj. Važno je indentifikovati jedinjenja značajna za prevenciju, reverziju i inhibiciju promena kod adenokarcinoma prostate i ustanoviti njihovu tačnu ulogu kako bismo promenama životnih i dijetetskih navika mogli da utičemo na razvoj ovog čestog oboljenja. Vitamin D je svakako, sa dokazanim antiproliferativnim i proapoptotskim dejstvima, značajno jedinjenje. Danas ne postoji jasno definisan stav o ulozi vitamina D u razvoju i progresiji karcinoma prostate, te su neophodna istraživanja koja bi definisala njegovu tačnu ulogu.

### **1.1. Incidenca i mortalitet**

Adenokarcinom prostate pogađa stariju populaciju, mali broj pacijenata oboli pre 50 godine života. Ovo je česta bolest, verovatnoća da će se razviti tokom života u opštoj populaciji je 16,72%, dok je verovatnoća da će doći do smrtnog ishoda 2,57% (1). Podatak da je kumulativni rizik za razvoj klinički manifestnog oboljenja tokom života širom sveta 0,5-20% i da se patohistološki karcinom prostate može dokazati kod 75% pacijenata starijih od 85 godina još više naglašava značaj rasprostranjenosti oboljenja (2). Velike varijacije u kumulativnom riziku i geografskoj distribuciji predstavljaju osnovu za ispitivanje razlika među populacijama koje bi mogle biti uzrok različite učestalost karcinoma prostate.

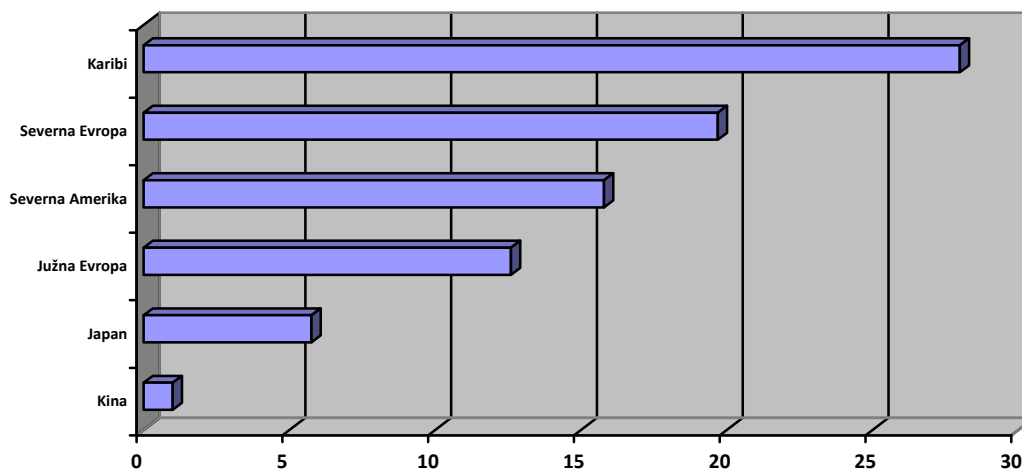
Poznato je da je širom sveta incidenca patohistološki dijagnostikovanog karcinoma prostate (koji se klinički ne ekspirira) slična. Sa druge strane, incidenca klinički manifestnog karcinoma znatno varira (Grafikon 1). Podatak da se kod pacijenata koji emigriraju iz Azije u Ameriku incidenca karcinoma prostate povećava ali da ne dostiže incidencu populacije koja je rođena na tlu Amerike govori u prilog uticaja faktora životne sredine (3). Značaj faktora sredine naglašava i antropološka teorija da između rasa postoje samo suptilne biološke razlike a da sama rasna podela ima najvećim delom kulturološku, običajnu i socijalnu osnovu (4). Pored uticaja sredine, smatra se da određeni genetski faktori deluju protektivno tako da incidenca kod emigranata ne dostiže incidencu starosedelaca na Američkom kontinentu (1). Razlika u učestalosti između rasa može se objasniti dejstvom faktora spoljašnje sredine, ishrane, kulturoloških i socijalnih faktora, dostupnošću zdravstvenog sistema ali i uticajem gena te se smatra da su ove razlike multifaktorijelnog porekla.

Grafikon 1. Učestalost karcinoma prostate u različitim regionima (/100 000)(5)



Mortalitet raste do 1992. godine nakon čega dolazi do postepenog opadanja (6). Danas je mortalitet niži od nivoa koji je imao pre uvođenja PSA u dijagnostičku proceduru (7). Mortalitet takođe značajno varira između različitih geografskih regiona.

Grafikon 2. Mortalitet od karcinoma prostate u različitim regionima (/100 000)



## 1.2. Faktori koji utiču na razvoj adenokarcinoma prostate

### 1.2.1. Genetski faktori

Postojanje genetske osnove uočeno je nakon što je zapažena veća učestalost karcinoma prostate u pojedinim porodicama. Godine starosti i pozitivna porodična anamneza se smatraju najznačajnijim rizikofaktorima za razvoj oboljenja (8,9,10). Petnaest procenata karcinoma prostate ima naslednu osnovu, verovatnoća da će se bolest razviti kod naredne generacije povećava se sa stepenom srodnost, brojem aficiranih članova i godinama starosti u kojima je oboljenje nastalo (11). Geni koji se smatraju odgovornim su HPC1, HPC2, MSR1, MIC1, PON1, OGG, CHECK, BRCA2 i single nucleotid polymorphism (npr. SNP R462Q). U istraživanju iz 2005. godine Tomlins i saradnici pokazali su veliku učestalost (oko 50% slučajeva lokalizovanog karcinoma prostate) TMPRSS2 genske fuzije kod pacijenata sa lokalizovanim karcinomom prostate i nižim Gleason grade-om (12,13).

### 1.2.2. Inflamacija i infekcija

Zapaljenski procesi smatraju se odgovornim za razvoj 20% svih karcinoma (14). Smatra se da hronična proliferacija tkiva predstavlja pogodno tlo za malignu alteraciju i u prostati. Veliki broj epidemioloških studija posmatrao je učestalost seksualno prenosivih bolesti i prostatitisa i njihov odnos prema učestalosti adenokarcinoma prostate. Deo ovih studija pronašao je pozitivnu korelaciju (15,16,17,18) dok istraživači u drugim studijama nisu uočili

postojanje povezanosti između adenokarcinoma prostate i inflamacije (19). Putzi i De Marzo su 2000. godine definisali proliferativnu inflamatornu atrofiju (PIA). PIA je regenerativna promena koja nastaje kao posledica infekcije, često se nalazi u blizini high grade prostatične intraepitelne neoplazije (HGPIN) koja se smatra prekursorom adenokarcinoma prostate (20).

### 1.3. Dijagnostika karcinoma prostate

Dijagnoza se postavlja na osnovu nalaza digitorektalnog pregleda (DRE), nivoa prostata specifičnog antigena (PSA), transrektalnog ultrazvuka (TRUS) i TRUS vođene biopsije.

#### 1.3.1. Digitorektalni pregled

Karcinom prostate je najčešće lokalizovan u perifernoj zoni gde je palpatorno lako dostupan prilikom pregleda. Palpiraju se noduli približne zapremine 0,2 ml ili veći. Senzitivnost samog DRE je 18%, ukoliko se kombinuje sa nivoom PSA senzitivnost se povećava na 5 – 30% (21,22). Pozitivan nalaz korelira sa višim Gleason scor – om (23).

#### 1.3.2. Prostata specifični antigen

PSA se stvara isključivo u epitelnim ćelijama prostate i specifičan je za organi ali ne i za oboljenje (povišen i kod benigne hiperplazije, zapaljenja, nakon manipulacije). Ima veću specifičnost u odnosu na DRE i TRUS. PSA je kontinuirani parametar tj. i pri niskom nivou PSA postoji mogućnost da je pacijent obolio od adenokarcinoma prostate.

Tabela 1. Učestalost karcinoma prostate u odnosu na vrednosti PSA

Vrednost PSA (ng/ml)	Incidenca adenokarcinoma prostate
0-0.5	6.6%
0.6-1	10.1%
1.1-2	17.0%
2.1-3	23.9%
3.1-4	26.9%

Postoji više izvedenih parametara koji služe za preciznije određivanje nivoa PSA u serumu. Najznačajniji je free/total PSA (f/t PSA). f/tPSA predstavlja odnos slobodnog PSA u

serumu (koji nije vezan za serumske proteine) i nivoa ukupnog PSA. Pacijenti sa karcinomom prostate imaju niži nivo slobodnog (free) PSA u serumu, samim tim i f/tPSA. Ovaj parametar se koristi pri vrednostima od 4-10 ng/ml, kada nivo ukupnog PSA daje najmanje podataka neophodnih za postavljanje dijagnoze adenokarcinoma prostate. Vrednost f/tPSA od 25% otkriva 95% karcinoma i eliminiše 20% nepotrebnih biopsija (24). Na f/tPSA utiče volumen prostate, smatra se da najbolju prediktivnu sposobnost ima za prostate manje od 40 ccm<sup>3</sup>.

### **1.3.3. Biopsija prostate**

Pozitivan nalaz digitorektalnog pregleda predstavlja apsolutnu indikaciju za biopsiju. Granična vrednost od 4 ng/ml koja se ranije uzimala kao referentna za biopsiju danas je napuštena. PSA je kontinuirani parametar, te se i pri nižim vrednostima može javiti karcinom prostate. Danas se prema nekim autorima za graničnu vrednost uzima 2,6 ng/ml. TRUS vođena biopsija prostate je standard, najveću prediktivnu vrednost imaju Gleason scor i procent malignog tkiva koje zahvata bioptate.

## **1.4. Tumor node metastasis (TNM) klasifikacija**

Klinički staging proširenosti oboljenja na osnovu dijagnostičkih parametara ima važnu prognostičku ulogu i služi za donošenje odluke o modalitetu lečenja. Klinička TNM klasifikacija zasniva se na nalazu DRE, PSA, biopsije prostate i radioloških (RTG) pretraga, daje informacije o stepenu proširenosti oboljenja u prostati, limfnim čvorovima ili eventualnom postojanju metastatskih promena.

### **1.4.1. T staging**

DRE korelira sa patološkim stadijumom u 50% slučajeva nakon prvog pregleda, dok je prilikom drugog i trećeg DRE ovaj procenat manji i iznosi 29.9% i 21.2%(25,26). Vrednost PSA ne može se upotrebiti samostalno za predikciju patohistološkog stadijuma, zbog prisustva povišenih vrednosti PSA kod BHP i zapaljenskih procesa. Lokalizovani stadijum se vidi kod 80% pacijenata sa PSA < od 4 ng/ml, 66% ukoliko je PSA od 4-10 ng/ml, dok je ograničena bolest kod 50% pacijenata sa PSA >od 10 ng/ml (27). Kombinacija DRE i PSA ima znatno veću prediktivnu vrednost nego pojedinačni parametri (28). Studije su pokazale da TRUS nema veću prediktivnu vrednost za lokalizovanu bolest nego DRE (29). Kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonanca (MR) nemaju dovoljnu

senzitivnost i specifičnost za detekciju lokalno uznapredovale bolesti. Biopsija prostate daje definitivnu informaciju o proširenosti bolesti. Gleason grade predstavlja izgled tkiva dobijenog biopsijom ili operativnim zahvatom pod malim mikroskopskim uvećanjem. Posmatra se citoarhitektura te se prema grafičkim šemama koje je odredio američki patolog Donald Gleason dodeljuje numerička vrednost od 1-5 (1 – dobro diferencirano tkivo, 5 dediferencirano tkivo). Primarni Gleason grade predstavlja najzastupljeniju citoarhitekturu, sekundarni Gleason grade predstavlja drugu po zastupljenosti. Sabiranjem primarnog i sekundarnog Gleason grade dobija se Gleason scor (2 do 10). Sedamdeset procenata pacijenata ima lokalizovanu bolest ako je Gleason scor  $\leq 6$ . Lokalizovana / lokalno uznapredovala bolest korelira sa procenatom malignog tkiva u biopstatima (30,31,32). Prilikom procene lokalnog stepena uznapredovalosti oboljenja najvažnije je uočiti razliku između T2 i T3 stadijuma. tj. lokalizovane i lokalno uznapredovale bolesti.

#### **1.4.2. N staging**

Širenje bolesti u limfne čvorove je važan podatak jer utiče na donošenje odluke o modalitetu lečenja. Verovatnoća za postojanje pozitivnih limfnih čvorova povećava se sa povećanjem nivoa PSA, stadijumom T2b – 3, dediferencijacijom i perineuralnom invazijom u patohistološkom nalazu. Nalaz Gleason scora 4 na biopsiji korelira sa pozitivnim limfnim čvorovima u 20 – 45%. Radiološke pretrage oslanjaju se na dimenzije limfnih čvorova (0,8cm za okrugle i 1cm za ovalne limfatike).

#### **1.4.3. M staging**

Najčešće mesto metastaziranja adenokarcinoma prostate je koštani sistem. Kombinacija nivoa alkalne fosfataze i PSA ima senzitivnost od 98% za postojanje koštanih metastaza (33,34). PSA > 100 ng/ml je parametar koji ima senzitivnost 100% za detekciju košanih metastaza (35). Scintigrafija skeleta ima najvišu senzitivnost, superiornija je u odnosu na radiološke i serološke pretrage. Radiološke pretrage (RTG, USG, CT, MRI) su metode izbora za evaluaciju drugih lokalizacija u koje adenokarcinom prostate daje metastaze.

### **1.5. Modaliteti lečenja**

Nakon postavljanja dijagnoze pacijenti u zavisnosti od stadijuma bolesti mogu biti podvrgnuti različitim modalitetima lečenja

- Active monitoring

- Watchfull waiting
- Radikalna prostatektomija
- Zračna terapija
- Hirurška ili hormonska kastracija

### **1.5.1. Radikalna prostatektomija (RP)**

Predstavlja uklanjanje tkiva prostate, semenih vezikula i u nekim slučajevima pelvičnih limfnih čvorova. PSA se stvara jedino u prostati, te se nakon radikalne prostatektomije očekuje nizak nivo PSA. Da bi se ispunio osnovni cilj radikalne prostatektomije – eradikacija moraju se indentifikovati pacijenti sa lokalizovanim oboljenjm. Pacijenti su prema riziku za progresiju bolesti nakon radikalne prostatektomije podeljeni u tri grupe: sa niskim, srednjim i visokim rizikom za progresiju.

- Nizak rizik: cT1-T2a, Gleason score 2-6 i PSA < 10 ng/mL
- Srednji rizik: cT2b-T2c ili Gleason score = 7 ili PSA 10-20 ng/mL
- Visok rizik: cT3a ili Gleason score 8-10 ili PSA > 20 ng/mL

Radikalna prostatektomija daje bolje rezultate kod pacijenata sa niskim ili srednjim rizikom za progresiju. Deset godina nakon operativnog lečenja pacijenti koji su imali lokalizovanu bolest (do T2c) bili su bez biohemijskog relapsa je između 60 – 75% uz preživljavanje specifično za karcinom od 94 – 98% (36,37,38).

### **1.5.2. Medikamentozna kastracija**

Androgeni su neophodni da bi prostatične ćelije normalno rastle, diferencirale se i obavljale fiziološke funkcije. U nedostatku androgena dolazi do indukcije apoptoze ćelija prostate. Na nivo androgena možemo uticati inhibicijom sekrecije (hirurška ili medikamentozna kastracija) ili inhibicijom dejstva u prostati (antiandrogeni). Kombinacijom ove dve metode lečenja dobija se totalna androgena blokada. Fiziološka vrednost testosterona je oko 600 ng/dl kod odraslih a kastraciona oko 20 ng/dl.

### **1.5.3. LHRH agonisti**

Aplikuju se u vidu retard preparata na 1 ili 3 meseca. Deluju tako što se inicijalno vezuju za LHRH receptore i u prvoj nedelji nakon početka lečenja prolazno stimulišu sekreciju LH,

FSH i testosterona (flare up fenomen). Zbog hroničnog izlaganja LHRH agonistima dolazi do smanjenja ekspresije LHRH receptora u hipofizi. Pošto nema receptora na koje bi LHRH agonista delovao smanjuje se i produkcija FSH i LH i u roku od 2-4 nedelje dolazi do pada testosterona na kastracione vrednosti (39). Kada uzmemo da je kastraciona vrednost testosterona 20 ng/ml 15% pacijenata nema kastracionu vrednost nakon primene LHRH agonista. Da bi se sprečila pojava inicijalnog porasta testosterona i flare up fenomena tokom prve dve nedelje primene LHRH preporučuje se i uporeba antiandrogena.

#### **1.5.4. Antiandrogeni**

Kompetitivno inhibiraju dejstvo androgena na androgene receptore u prostatičnim ćelijama i na taj način izazivaju apoptozu. Postoje dve klase antiandrogena:

- Steroidni (ciproteron acetat, megestrol acetat)
- Nesteroidni (nilutamid, flutamid, bicalutamid)

Obe klase deluju kompetitivno na nivou testosteronskih receptora u prostati, nesteroidni antiandrogeni ne snižavaju nivo testosterona.

#### **1.5.5. Kompletna androgena blokada**

Nakon aplikacije LHRH nivo testosterona se smanjuje za 95%. Preostalih 5% testosterona sintetiše se u nadbubregu i u prostati konvertuje u dihidrotestosteron (DHT). Da bi se sprečilo dejstvo nadbubrežnih androgena u prostati LHRH agonistima se dodaju antiandrogeni, koncept poznat kao kompletna androgena blokada (CAB). Indikacije za CAB su T3 i T4 stadijum, asimptomatske i simptomatske metastaze (M1) i pozitivni limfni čvorovi.

#### **1.5.6. Hirurška kastracija**

Hirurška kastracija je standard u lečenju karcinoma prostate. Operativni zahvat se izvodi u lokalno ili opštoj anesteziji, najčešće subkapsularnim uklanjanjem tkiva testisa.



## **1.6. Praćenje i progresija bolesti**

Nakon radikalne prostatektomije ili CAB na kontrolnim pregledima neophodno je uraditi PSA, DRE i dobiti anamnestičke podatke vezane za bolest.

### **1.6.1. PSA**

Predstavlja osnovu monitoringa kod pacijenata kod kojih je urađena RP ili CAB. Promene u nivou PSA javljaju se nekoliko godina pre pojave kliničkih simptoma progresije bolesti (40,41). Nakon uspešne radikalne prostatektomije PSA je nemerljiv nakon 6 nedelja(42). Nakon RP dva konsektivna nalaza PSA veća od 0,2 ng/ml predstavljaju biohemijsku progresiju (43).

Ukoliko PSA ne padne na vrednost ispod 0.2 ng/ml kod pacijenata sa metastatskim oboljenjima verovatnoća da će doći do progresije bolesti u 24 meseca je petnaest puta veća u odnosu na pacijente sa PSA < 0.2 ng/ml (44,45). Pacijenti koji imaju vrednost PSA < od 0,2 ng/ml imaju bolju prognozu nego pacijenti koji imaju vrednosti PSA nakon MK i HK između 0,2 i 4 ng/ml.

### **1.6.2. DRE**

Procenjuje postojanje lokalnog recidiva. Nakon operativnog lečenja veoma je teško proceniti nalaz DRE. Značajan je kod pacijenata koji imaju dediferenciran tumor, sa malom produkcijom PSA.

## **1.7. Vitamin D**

Važna uloga vitamina D u metabolizmu kalcijuma i fosfora, mineralizaciji kosti, neuromuskularnoj funkciji, egzokrinnoj sekreciji, ćelijskoj adheziji i intercelularnoj signalizaciji od ranije je poznata. Nakon otkrića vitamin D receptora (VDR) i enzima neophodnih za formiranje aktivnog oblika vitamina D u drugim tkivima, među kojima su bila i maligno izmenjena tkiva, pojavilo se interesovanje za definisanje alternativnih uloga i dejstava vitamina D. Intenzivnim proučavanjem ovog plejotropnog vitamina otkriveno je njegovo antiproliferativno i proapoptotsko dejstvo na različite vrste ćelija.

Hipoteza da vitamin D deluje na maligne ćelije prostate potekla je iz epidemioloških studija koje su pokazale da je životna dob najvažniji faktor rizika za razvoj adenokarcinoma prostate, što je u skladu sa većom učestalošću vitamin D deficijencije kod starijih. Takođe je ustanovljeno da je incidenca karcinoma prostate obrnuto proporcionalna ekspoziciji UV zračenju (geografska širina) i crnoj puti. Epidemiološke studije su dalje elaborirane kroz in vitro i in vivo studije koje su do određenog stepena objasnile ulogu vitamina D u procesu maligne alteracije.

Razvoj malignih neoplazmi predstavlja kompleksnu interakciju genetskih faktora i faktora sredine. Dug period razvoja adenokarcinoma prostate omogućava da na sam proces delujemo promenom životnih navika i ishrane. Značaj vitamina D i njegova uloga u procesu kancerogeneze porasla je nakon ustanovljavanja osnovnih principa hemoprevencije tj. primene prirodnih ili sintetskih materija koje preveniraju, inhibiraju ili dovode do reverzije patoloških procesa u maligno alteriranom tkivu. Na osnovu podataka koji ukazuju da faktori sredine imaju veliki uticaj na razvoj karcinoma prostate pažnja je usmerena na indentifikaciju činilaca koji mogu imati ulogu u razvoju tj. prevenciji adenokarcinoma prostate. Jedan od postavljenih ciljeva u lečenju lokalizovanog i metastatskog karcinoma prostate je pronalaženje novih, manje agresivnih metoda lečenja koje bi mogle sprečiti nastanak tj. usporiti i/ili zaustaviti progresiju bolesti.

### **1.7.1. Metabolizam kalcijuma**

Osnovna uloga vitamina D je regulacija homeostaze kalcijuma i fosfora. Da bi se nivo kalcijuma održao u uskim, fiziološkim, granicama vitamin D deluje na više organskih sistema. Kod sisara nivo kalcijuma je precizno regulisan. Približno 50% serumskog kalcijuma je slobodno, dok je druga polovina vezana za serumske proteine (albumini) i anjone (citrati, bikarbonati, fosfati). U krvnoj plazmi nivo jonizovanog kalcijuma je u uskim granicama između 1.10 -1.30 mmol/l, vezanog 2.2 – 2.5 mmol/l uz fiziološke oscilacije od 1-2 %.

Homeostaza kalcijuma održava se posredstvom: vitamina D, paratireoidnog hormona (PTH), kalcitonina (CT), dejstvom na tanko crevo, kosti i bubrege. Gastrointestinalni trakt je mesto apsorpcije kalcijuma u organizmu. Količina kalcijuma koja se absorbuje je pod direktnim uticajem količine kalcijuma u hrani i kvaliteta transporta kroz epitelne ćelije tankog creva. Kao odgovor na niže vrednosti kalcijuma u hrani bubrezi reaguju pojačanim stvaranjem 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Dokazano je da je pri nižem unosu kalcijuma efikasnost apsorpcije u tankom

crevu veća za 50%(46,47). Približno 35% kalcijuma se apsorbuje iz tankog creva aktivnim (transcelularno) i pasivnim transportom (paracelularno) (48). Aktivni transport je za razliku od pasivnog saturabilan. Ukoliko je sadržaj kalcijuma u himusu nizak aktivira se vitaminom D regulisan aktivni transport u duodenumu i jejunumu. Kod vitamin D insuficijentnih pacijenta apsorbuje se samo 75% kalcijuma aktivnim transportom (49,50). Apsorpcija kalcijuma iz creva je pod uticajem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .  $25(\text{OH})\text{D}_3$  deluje na apsorpciju jedino u slučaju kada je nivo  $25(\text{OH})\text{D}_3$  u serumu suviše nizak za formiranje  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u bubrezima (51,52). U ovom slučaju hidroksilacija  $25(\text{OH})\text{D}_2$  u  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  odvija se preko CYP27B1 prisutnog lokalno u enterocitima.

### 1.7.2. Transport kalcijuma u enterocitima

Transport kroz apikalnu membranu enterocita odvija se preko transient receptor potential vanilloid 6 (TRPV6) (ranije CaT1, ECaC2). Transport pomoću TRPV6 je vitamin D zavisian. Gen TRPV6 se nalazi na 7q34. Protein je lociran u apikalnom delu enterocita, pretežno u duodenumu i jejunumu. TRPV6 je do 90% redukovan kod vitamin D insuficijencije, kod smanjenog unosa kalcijuma je jače eksprimiran (53,54,55). TRPV6 mRNK je pojačano eksprimirana kod karcinoma prostate u odnosu na benignu hiperplaziju prostate i korelira sa Gleason grade/scor te se razmatra njegov prognostički značaj (56,57,58, 59,60). Nakon ulaska u ćeliju kalcijum se transportuje od apikalnog do bazalnog dela ćelije.

Postoje četiri poznata mehanizma transporta kalcijuma kroz ćeliju:

- Olakšana difuzija: nakon ulaska u ćeliju smatra se da centralnu ulogu u daljem transportu kalcijuma ima calcium-binding protein - calbindin D. Postoje dva oblika calbindina D: calbindin  $\text{D}_{9k}$  lokalizovan u crevu i calbindin  $\text{D}_{28k}$  lokalizvan u bubregu. Kod vitamin D deficijencije nivo calbindina  $\text{D}_{9k}$  je znatno snižen (49,61), nakon aplikacije vitamina D nivo se povećava, te se gen koji kodira calbindin  $\text{D}_{9k}$  smatra za jedan od vitamin D target gena (62,63). Kod calbindin  $\text{D}_{9k}$  null miševa postojala je normalna bazalna i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimulisana apsorpcija kalcijuma (64,65,66,67). Nakon izučavanja calbindin  $\text{D}_{9k}$  i TRPV6 double null miševa ustanovljeno je da je apsorpcija kalcijuma manja za 60%, što sugerise da ova dva molekula imaju određenu interakciju u transportu kalcijuma (68). Tačan mehanizam transporta kalcijuma kroz ćeliju ostaje nerazjašnjen. Smatra se da je u pitanju kompleksniji mehanizam od prostog transporta pomoću calbindina  $\text{D}_{9k}$ . Kalcijum se iz enterocita u serum

transportuje uz gradijent koncentracije, pomoću enzima plasma membrane calcium ATPase 1b (PMCA1b). U slučajevima deficijencije vitamina D dolazi do smanjene transkripcije gena za PMCA1b.

- Endocitoza: Gerasimenko i saradnici uočili su je da se kalcijum nakuplja u endozomima nakon aplikacije  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (69). Endozomi pri apikalnom polu enterocita eksprimiraju calbindin  $\text{D}_{28\text{K}}$  i osetljivi su na dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (70,71,72,73). Smatra se da acidifikacija kalcijumom ispunjenih endozoma dovodi do intracelularnog otpuštanja kalcijuma (69). Tačan mehanizam formiranja endozoma ispunjenih kalcijumom nije poznat.

- Transkaltahija: predstavlja brz odgovor na stimulaciju bazolateralne strane enterocita sa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Nakon nanošenja  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na serozu creva dolazi do povećanja apsorpcije približno za 40% u kratkom vremenskom roku. Protein na bazolateralnoj stani odgovoran za transport kalcijuma je membrane associated rapid response steroid-binding protein (MARRS) (74). Kod knock-out (KO) miševa za gen koji kodira MARRS protein usvajanje ekstracelularnog kalcijuma je bilo zanemarljivo ili u potpunosti odsuno (75).

- Pasivni transport: mehanizam paracelularnog transporta kalcijuma nije tačno poznat, sem da se najvećim delom odvija u jejunumu i ileumu (76,77,78). Fujita et al. su 2008. godine hipotetisali sa ulogom kladina u transportu kalcijuma (79). Kladini su ekstracelularni proteini za koje se smatra da formiraju kanale za transport jona. Dokazali su da claudin 2 i 12 učestvuju u apsorpciji kalcijuma i da se ekspresija ovih proteina povećava pod uticajem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

### **1.7.3. Metabolizam kalcijuma u bubrezima**

Bubrezi imaju ključno mesto u održavanju homeostaze kalcijuma. Tokom 24 h kroz glomerule se filtrira oko 8g kalcijuma, 98% se resorbuje u tubulima. U proksimalnim konvoluiranim tubulima pasivnim mehanizmom resorbuje se oko 70% kalcijuma. Dodatnih 15% kalcijuma se resorbuje u debelom ascendentnom kraku Henlejeve petlje, takođe pasivnim mehanizmom (claudin - 16). Preostalih 10-15% kalcijuma apsorbuje se u distalnim konvoluiranim tubulima. Calcium sensing receptor (CaSR) lokalizovan u ascendentnom kraku Henlejeve petlje registruje promene u ekstracelularnom nivou kalcijuma i reguliše nivo PTH i resorpciju kalcijuma, kalijuma, natrijuma i vode, u zavisnosti od mesta dejstva u nefronu.

Eksprimiran je u svim segmentima nefrona. Za transport kalcijuma iz lumena tubula odgovoran je transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) i 6 (TRPV6) koji su eksprimirani na apikalnom polu tubularnih ćelija. Nakon ulaska u ćeliju kalcijum se vezuje za calbindin-D<sub>28K</sub>, protein koji transportuje kalcijum do bazalne membrane. Kao i u tankom crevu eksprimiranje calbindin-D<sub>28K</sub> se povećava nakon aplikacije vitamina D. U bazalnom delu membrane Na<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> pumpa (NCX1) i PMCA1b transportuju kalcijum u cirkulaciju. Smatra se da i Klotho i FGF23 imaju ulogu u metabolizmu kalcijuma. Klotho je eksprimiran u bubrezima i reguliše metabolizam kalcijuma interakcijom sa  $\alpha_1$  i  $\beta$  subjedinicom Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (80). Takođe interreaguje sa FGF receptorom i pretvara ga u specifični FGF23 receptor. Klotho i FGF23 deluju na smanjivanje stvaranja vitamina D u bubrezima (81).

#### **1.7.4. Metabolizam kalcijuma u kostima**

Nakon formiranja kosti osteoblasti i osteoklasti učestvuju u njenom remodelingu. Formiranje kosti je primarna funkcija osteoblasta koji indirektno stimulišu osteoklaste te dolazi do resorpcije. Osteoblasti su pod uticajem: 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH, IL1, IL6 (82,83). Preko sekrecije Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) proteina osteoblasti indukuju diferencijaciju progenitornih ćelija u osteoklaste. RANKL spada u porodicu tumor necrosis factor (TNF). Fu et al. su 2006. otkrili mehanizme kontrole Rankl gena preko RANKL distal control region (RL-DCR) (84). Delecije RL-DCR su pokazale da je ovaj molekul neophodan za indukciju sinteze RANKL. Ustanovljeno je da je RL-DCR pod direktnom kontrolom PTH i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Uticaj 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> je VDR zavisian, kod VDR null miševa 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nema uticaja na Rankl (85,86).

#### **1.7.5. Metabolizam fosfata**

Apsorpciju fosfata u crevu reguliše vitamin D, dok resorpciju iz kosti reguliše PTH. Kod vitamin D insuficijencije u crevu se apsorbuje samo 60% fosfora (87,88). U bubregu vitamin D i PTH smanjuju resorpciju fosfata iz tubula. Kako su oba hormona odgovorna prvenstveno za metabolizam kalcijuma, smatralo se da postoji drugi način održavanje homeostaze fosfata. Danas se zna da je u pitanju FGF23, koji se stvara u osteoblastima i osteocitima (89,90,91,92,93). Luči se u slučajevima kada je povišena vrednost fosfata u serumu i kada je povišena vrednost 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. U bubrezima blokira tubularnu resorpciju fosfata, inhibira CYP27B1 samim tim smanjuje intestinalnu resorpciju kalcijuma i fosfata (94,95). Ne interferira sa metabolizmom fosfata.

### 1.7.6. Fiziološke i patološke vrednosti vitamina D

Količina vitamina D koji se unosi u organizam meri se u internacionalnim jedinicama (IU). Smatra se da populacija do 70 godine starosti treba da unosi 600 IU/dan, starije osobe 800 IU/dan. Ne preporučuje se unošenje više od 4000 IU/dan (83). Pored vitamina D koji se dobija izlaganjem suncu i iz hrane koja prirodno sadrži vitamin D, danas se pojedine vrste hrane fortifikuju (cerealije, mleko i mlečni produkti, testenine i margarin). Nivo vitamina D se dobija merenjem 25(OH)D<sub>3</sub> u serumu. Deficijencija, suficijentne vrednosti i hipervitaminoza definišu se prema preporukam Institute of Medicine (IOM) i to (tabela 2):

Tabela 2. fiziološke i patološke vrednosti 25(OH)D<sub>3</sub>

	ng/ml	nmol/l
<b>deficijentno</b>	< 20 ng/ml	<50 nmol/l
<b>suficijentno</b>	≥20 ng/ml -50 ng/ml	≥50 nmol/l – 125 nmol/l
<b>hipervitaminoza d</b>	>50 ng ml	>125 nmol/l

1µg=40IU vitamina

Holick je pored ovih vrednosti 2007. godine definisao i vitamin D insuficijenciju kao nivo vitamina D od 21 do 29 ng/ml tj. 52 do 72 nmol/l. Tokom letnjih meseci izlaganje suncu dovodi do deponovanja vitamina D u masnom tivu i predstavlja važan izvor vitamina D tokom zime (96,97). Smatra se da je izlaganje suncu u trajanju od 5-30 minuta dva puta nedeljno dovoljno za deponovanje fiziološke količine vitamina D u masno tkivo (98). Četrdeset procenata opšte populacije ima vitamin D deficijenciju ili insuficijenciju prema navedenim kriterijumima (96,99,100). Deficijencija vitamina D izaziva rahitis i osteomalaciju zbog poremećaja mineralizacije kostiju. Holick je 2002. godine ustanovio da vitamin D deficijencija povećava šansu za razvoj osteoporoze (101). Takođe ustanovljena je veća incidenca kardiovaskularnih bolesti sa povećanjem geografske širine što je takođe dovedeno u vezu sa vitaminom D (102). Stanja koja predisponiraju za razvoj vitamin D deficijencije i insuficijencie su mnogobrojna:

Tabela 3. uzoroci vitamin D deficijencije i insuficijencije

uzrok	način delovanja
smanjena produkcija u koži	starenje, geografska širina, godišnje doba
smanjena bioraspoloživost	malapsorpcija, gojaznost
povećan katabolizam	antikonvulzivi, glukokortikoidi
smanjena sinteza 25(OH)D <sub>3</sub>	insuficijencija jetre
smanjena sinteza 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	bubrežna insuficijencija, hiperfosfatemija,
nasledni poremećaji	vitamin D rezistentan rahitis, rahitis izazvan pseudovitamin D deficijencijom
stečeni poremećaji	tumorska osteomalacija, primarni hiperparatireoidizam

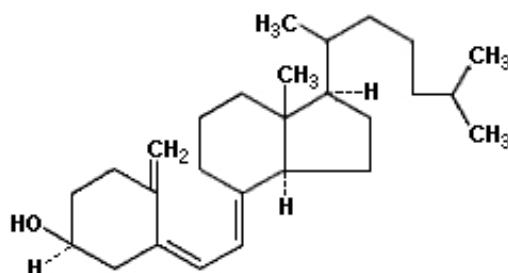
Intoksikacija vitaminom D se javlja retko, po pravilu nakon uzimanja velikih doza per os. Uzimanje 50 000 IU povećava vrednost vitamina D na oko 150 ng/ml, manifestuje se hiperkalcemijom i hiperfosfatemijom.

#### 1.7.7. Sinteza vitamina D

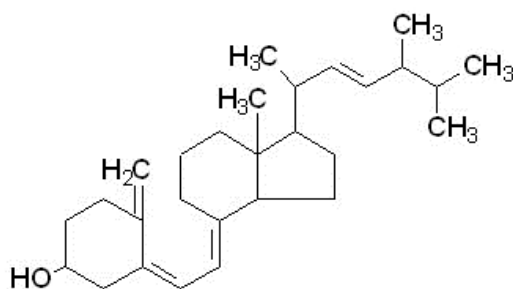
Vitamin D se stvara u koži ili se u organizam unosi per os. Ishrana bogata ribljim uljima sprečava razvoj deficijencije vitamina D (103,104). Ishranom se unosi vitamin D<sub>2</sub> – ergocalciferol i D<sub>3</sub> – cholecalciferol. Nakon prve 25 hidroksilacije u jetri i posledične 1 $\alpha$ -hidroksilacije u bubrezima ishranom unet cholecalciferol i ergocalciferol daju 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> koji imaju slične metaboličke efekte.

U koži se vitamin D proizvodi iz 7 dehidroholesterola pod uticajem ultravioletnih B zraka talasne dužine 270 – 300 nm, uz najveću produkciju pri ekspoziciji svetlosti talasne dužine 295 – 297 nm. Ova talasna dužina svetlosti javlja se u tropskim krajevima svakodnevno, u umerenom klimatskom pojasu tokom leta, dok se u arktičkoj zoni praktično ne javlja. Izomerizacijom preko niza međuprodukata, u stratumu spinosumu i stratumu basale epiderma dobija se vitamin D<sub>3</sub> - cholecalciferol, oblik koji se otpušta u cirkulaciju. Deo vitamina D<sub>3</sub> se deponuje u adipocitima, dok se drugi deo aktivira u jetri i bubrezima.

Slika 1. Hemijska struktura vitamina D<sub>3</sub> – cholecalciferol



Slika 2. Hemijska struktura vitamina D<sub>2</sub> - ergocalciferol



Vitamin D<sub>3</sub> je fiziološki inertno jedinjenje, kod pacijenata koji obole od naslednog hipokalcemijskog vitamin D rezistentnog rahitisa tip II (mutacija CYP1 $\alpha$ ) i pored unošenja terapijskih doza vitamina D<sub>2,3</sub> bolest perzistira (105). Prilikom prolaska kroz jetru enzim vitamin D 25-hidroksilaza (CYP27B1) hidroksilira vitamin D<sub>3</sub> i dobija se 25(OH)D<sub>3</sub> - calcidiol. Ovaj oblik vitamina D se meri u serumu da bismo definisali vitamina D status kod pacijenata. Poluživot 25(OH)D<sub>3</sub> je 288 sati. U cirkulaciji calcidiol je vezan za  $\alpha$ -globulin, transportuje se u bubrege gde se pod uticajem 25(OH)D<sub>3</sub>1 $\alpha$ -hidroksilaze (CYP1 $\alpha$ ) ponovo hidroksilira u mitohondrijama ćelijama proksimalnih renalnih tubula i dobija 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - calcitriol (106). Otkrivena su i druga mesta dejstva 25(OH)D<sub>3</sub>1 $\alpha$ -hidroksilaze – koža, prostata i imuni sistem. Smatra se da se u ovim tkivima produkuje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> koji deluje intrakrino, autokrino ili parakrino. Lokalno dejstvo nema uticaj na metabolizam kalcijuma i fosfora u širem smislu (107,108). Da bi autokrino i parakrino sekrecija 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bila normalna neopodan je fiziološki nivo 25(OH)D<sub>3</sub>, što je potvrđeno studijama u kojima se pokazalo da



više vrednosti  $25(\text{OH})\text{D}_3$  deluju protektivno u odnosu na hronična oboljenja. Ukoliko su vrednosti  $25(\text{OH})\text{D}_3$  ispod fizioloških  $25(\text{OH})\text{D}_3$  1- $\alpha$ -hidroksilaza nema neophodnu količinu supstrata i lokalna sinteza  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  izostaje (109). Funkcija CYP27B1 nije precizno određena nivoom calcitriola i kalcijuma, dok je aktivnost CYP1 $\alpha$  tesno povezana sa nivoom ovih jedinjenja.

Nakon otpuštanja u cirkulaciju calcitriol se vezuje se za transportni protein - vitamin D vezujući protein (VDBP). Gen za VDBP nalazi se na hromozomu 4q11-q13, protein se sintetiše u jetri, u količini od 10 mg/kg/dan, sa poluživotom od 48 sati. VDBP ima visok afinitet za  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dok  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ima 10 -100 puta niži afinitet. Odgovoran je za transport 99% vitamina D u cirkulaciji, ostatak se transportuje vezan za albumine i lipoproteine. Pored transporta vitamina D i njegovih metabolita VDBP ima ulogu u vezivanju masnih kiselina i monomera aktina, sprečavajući njihovu polimerizaciju u krvotoku (110,111,112). Strukturno je sličan albuminima i  $\alpha$ -fetoproteinu (113). U literaturi nisu zabeleženi slučajevi kompletnog nedostatka VDBP, dok se VDBP null miševi normalno razvijaju (114). Studije koje su proučavale odnos VDBP sa nivoom vitamina D ili homeostazom minerala nisu uspele da ustanove korelaciju (115). Enzimskom transformacijom VDBP prelazi u VDBP aktivirajući faktor za makrofage (VDBP - MAF), te deluje na makrofage i osteoklaste. Iz cirkulacije se uklanja razgradnjom u jetri. Kompleks VDBP – vitamin D ulazi u ćeliju i vezuje se sa vitamin D receptorom.

Calcidiol i calcitriol se razgrađuju 24 – hidroksilazom (CYP24A1) do calcitriolne kiseline i izlučuju putem žuči. Katabolizam vitamina D regulisan je negativnom povratnom spregom, tj. povišene vrednosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dovode do transkripcije CYP24A1. Pored ovog mehanizma transkripciju CYP24A1 stimuliše i FGF23.

#### **1.7.8. VDR i polimorfizam VDR receptora**

Inicijalno je VDR otkriven u tankom crevu, smatralo se da ima ulogu isključivo u metabolizmu kalcijuma i fosfora. Danas se zna da se u različitoj koncentraciji nalazi u sledećim tkivima:

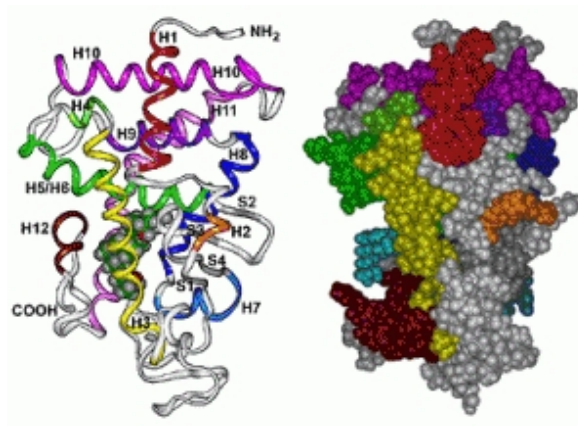
Tabela 4. Distribucija VDR u tkivima

Sistem	Tkivo
Gastrointestinalni	tanko crevo, debelo crevo, želudac, jednjak
Urogenitalni	Prostata, bubreg, uretra, testis, ovarijum, placenta, uterus, endometrijum, yolk sac
Kardiovaskularni	srčani mišić
Endokrini	Paratireoidna, tireoidna, adrenalana, hipofiza
Imuni	timus, kosna srž, T i B limfociti
Respiratoni	alveolarni epitel
Koštano – mišićni	osteroblasti, osteoklasti
CNS	neuroni

Upravo ovakva distribucija, u tkivima koja nisu vezana za homeostazu kalcijuma i fosfora pobudila je interesovanje za druge funkcije vitamina D.

VDR, poznat i kao NR1H1 (nuclear receptor subfamily 1, group I, member 1), je nuklearni receptor i transkripcioni faktor. Gen koji kodira VDR nalazi se na 12q13.11. VDR ima visok afinitet i specifičnost za vitamin D. Sva dejstva vitamina D posredovana su VDR. Da bi se dejstvo preko VDR ostvarilo neophodna je posttranslaciona modifikacija samog VDR, kao i prisustvo VDBP, komodulatora, VDREs i intracelularnih vitamin D vezujućih proteina (IDBPs). Značaj VDR se vidi kod VDR null miševa i pacijenata koji boluju od naslednog hipokalcemijskog vitamin D rezistentnog rahitisa tip II (mutacija gena za VDR). Kod ljudi oboljenje se prenosi autozomno recesivno, manifestuje se deformitetom donjih ekstremiteta, niskim rastom, alopecijom, hipokalcijemijom, sekundarnim hiperparatireoidizmom, imunološkim poremećajima i većom učestalošću malignih bolesti (116,117). Tkiva koja ne ekspimiraju VDR ne odgovaraju direktno na vitamin D.

Slika 3. Struktura VDR



Da bi ostvario svoju funkciju na VDREs, VDR formira heterodimer sa retinoidnim X receptorom (RXR). Ovaj molekul sadrži dva domena – za DNK i ligand. Funkcija RXR je ostvarivanje visokog afiniteta vitamina D za određene sekvence DNK i transkripcije gena (118). Nakon vezivanja za VDR formira se funkcionalni heterodimer koji je sposoban da penetrira kroz genetski materijal u jedru i indentifikuje VDREs (119,120). RXR je u odsustvu vitamin D – VDR kompleksa vezan za VDREs zajedno sa korepresorom.

Pored dejstava vezanih za kost, mineralini metabolizam i aktivacije do sada navedenih gena postoji važna uloga  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  koja rezultira drugim fiziološkim efektima. Ova dejstva posredovana su intrakrinom, autokrinom ili parakrinom sekrecijom  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Lokalno produkovan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ne utiče na serumsku koncentraciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , i ispoljava dejstva kao što su smanjenje sekrecije interleukina 2 (IL2) u T limfocitima, lučenje antimikrobnih materija defensina i cathelicidina, pojačana sekrecija p21 i insulina (121,122). VDR je uočen u različitim malignim tkivima, te se smatra da eksprimirani VDR ima ulogu u metabolizmu malignih ćelija.

Tabela 5. Distribucija VDR u malignim tkivima

Adenokarcinom kolona	Limfocitna leukemija	Karcinom bubrega
Bazocelularni karcinom	Maligni melanom	Tranziciocelularni karcinom bešike
Karcinom bešike	Mieloidna leukemija	Karcinom prostate
Karcinom dojke	Karcinom ovarijuma	Karcinom pluća
Karcinom vrata grlića materice	Neuroblastom	Pituitarni adenom

Karcinom žučne kese	Karcinom pankreasa	Karposijev sarkom
Kolorektalni karcinom	Non-Hidgkin limfom	Gliom

Schwartz et al. su hipotetisali sa postojanjem  $25(\text{OH})\text{D}_3$   $1\alpha$ -hidroksilaze u benignom i malignom tkivu prostate. Posmatrali su potencijalnu aktivnost u tri ćelijske linije karcinoma prostate LNCaP, DU 145, i PC-3, kulturu hiperplastičnog i normalnog tkiva. Ustanovljeno je postojanje sinteze  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , tj. ustanovljeno je postojanje  $25(\text{OH})\text{D}_3$   $1\alpha$ -hidroksilaze u benignom i malignom tkivu prostate (123,124). Smatra se da je za lokalnu produkciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u prostati neophodna odgovarajuća koncentracija  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , u serumu, tj. da serumska vrednost  $25(\text{OH})\text{D}_3$  utiče na lokalnu produkciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u prostati.

U ekstraktu citosola benignih, hiperplastičnih i malignih ćelija pronađeni su VDR. U stromalnim ćelijama prostate nađena je manja količina receptora nego u epitelu što je bilo konzistentno sa nalazom da je rast stromalnih ćelija slabije inhibiran vitaminom D. Kada su uzorkovane periferna i centralna zona prostate nije uočeno postojanje razlike u koncentraciji VDR (125). Najveća ekspresiranost VDR u prostati je u petoj deceniji nakon čega se postepeno koncentracija smanjuje (126).

### 1.7.9. Geni pod kontrolom VDR

Vitamin D utiče na aktivaciju približno 50 gena. Najznačajniji geni koji kontrolišu metabolizam kalcijuma, fosfora i remodeling kosti su: SPP1, TRPV6, LRP5, BGP, RANKL, OPG, CYP24A1, PTH, FGF23, PHEX, klotho).

- SPP1 (4q22.1) – ekspresiran u osteoblastima, kodira osteopontin koji dovodi do osifikacije kao odgovor na mehanički stres, frakture, utiče na resorpciju ektopične kosti, sprečava kalcifikaciju krvnih sudova, utiče na starenje (127,128,129)
- TRPV 6 (7q34) – posreduju intestinalnu apsorpciju kalcijuma, ekspresija deluje protektivno kod karcinom kolona i kože (130,131)
- BGP (1q25-q31) – kodira osteokalcin neophodan za formiranje kostiju otpornih na traum, povećava oslobađanje insulina u pankreasu i senzibilitet ciljnih tkiva (132,133)

- RANKL (13q14.11) – 5000 puta veća ekspresija pod uticajem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , stimuliše osteoklastogenezu i fiziološki remodeling kosti (128)

Da bi se sprečila hipervitaminoza D i posledična ekopična kalcifikacija, hiperkalcemija, hiperfosfatemija i druga dejstva posredovana  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  neophodna je transkripcija druge grupe gena sa mogućnošću prevencije kalcifikacije, razvoja vaskularne patologije, mišićne atrofije i prevencije prevremenog starenja: CYP24A1, PTH, i FGF23.

- CYP24A1 je enzim koji  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  najjače indukuje, eksprimira se u svim ćelijama sa VDR. Uloga mu je katabolička nakon što  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktivira VDREs. Null miševi za CYP24A1 uginu zbog toksičnosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .
- PTH (11p15.3-p15.1) – stimuliše produkciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kada nivo kalcijuma padne ispod fiziološke vrednosti. Negativnom povratnom spregom  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i kalcijum utiču na smanjenje sekrecije PTH. Reguliše nivo fosfata smanjivanjem resorpcije u bubrežnim tubulima, ali zbog uske povezanosti sa vitaminom D deluje kratkotrajno.
- FGF23 (12p13.3) – stvara se u osteoblastima i osteocitima, smanjuje resorpciju fosfora iz proksimalnih tubula bubrega, inicijalno deluje sinergistički sa PTH, ali zajedno sa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i kalcijumom smanjuje sekreciju PTH.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  povećava sekreciju FGF23 i sprečava ektopičnu depoziciju fosfora (134).

## 1.8. Antikancersko dejstvo

### 1.8.1. Epidemiološke studije antikancerskog dejstva vitamina D

U epidemiološkim studijama se prvo pojavljuju hipoteze koje koreliraju incidencu nekutanih malignoma i geografske širine (135,136,137). Pojedine studije su pored geografske širine posmatrale i druge parametre: zanimanje, ishranu, boju kože, gojaznost, sezonske varijacije PSA, fizičku aktivnost. (138,139,140,141,142). Pored velikog broja istraživanja koja govore u prilog protektivnom dejstvu vitamina D na razvoj karcinoma prostate postoji i mali broj studija koje ukazuju na inverzan odnos, tj. postojanje agresivnije bolesti kod viših nivoa vitamina D (143).

Adenokarcinom prostate je oboljenje starije životne dobi, najčešće se dijagnostikuje u 68 godini života, dok se 63% oboljenja dijagnostikuje posle 65 godine života (1). Starije osobe su često vitamin D deficijentne (144,145). MacLaughlin i Holick su 1985. ustanovili da jedan od razloga za vitamin D defcijenciju i insuficijenciju kod starijih može biti smanjenje produkcije vitamina D (146). Utvrdili su da se u koži mlađih osoba formira dvostruko veća količina D vitamina. Ova razlika se nije mogla objasniti smanjenjem debljine dermisa niti smanjem broja kapilarnih krvnih sudova u površnom sloju dermisa u grupi starijih ispitanika. Daljim ispitivanjem utvrđeno je da se kod starije populacije u koži nalazi  $\approx 25\%$  manje 7 – dehidroholesterol, što smanjuje sposobnost za sintezu vitamina D za  $\approx 75\%$  (147). Takođe starije osobe se manje izlažu UV zračenju i unose manju količinu vitamina D hranom. Danas se smanjena sinteza vitamina D u koži smatra fiziološkim delom procesa starenja. Na ovoj činjenici se baziraju preporuke IOM i WHO koje se tiču unosa veće količine vitamna D kod starijih. Količina vitamina D koji se stvori u koži zavisi i od nivoa melanina koji je izuzetan apsorber UVB zračenja (148). Istraživanja koja su poredila stvaranje vitamina D u koži belaca i pripadnika crne rase ustanovila su da je nakon ekspozicije kože belaca stvaranje vitamina D 5-10 puta veće (149). Negroidna rasa, zbog više melanina u koži, ne absorbuje dovoljnu količinu UV zraka te se češće razvija vitamin D deficijencija i insuficijencija (150,151). Epidemiološki podaci pokazuju da je incidenca i mortalitet za adenokarcinom prostate najviši kod ove populacije (1). Sa povećanjem geografske širine smanjuje se količina UVB zračenja i pojavljuju se sezonske varijacije u UVB zračenju (83,152). U rezultatima istraživanja objavljenog 2009. godine od strane Hagenau i saradnika utvrđeno je da geografska širina korelira sa nivoom vitamina D u beloj populaciji ( $-0.69 \pm 0.30$  nmol/l po stepenu geografske širine,  $p = 0.02$ ) dok kod pripadnika negroidne rase ovakva korelacija nije zapažena (153). Ova činjenica podudara se sa nižom incidencom adenokarcinoma prostate kod belaca koji žive bliže ekvatoru. Smatra se da kulturološki faktori, običaji (način odevanja, izlaganje suncu) i alimentarne navike umnogome menjaju zavisnost nivoa vitamina D od geografske širine.

Tabela 6. Incidenca i mortalitet prema rasama na 100 000 pacijenata, prilagođena godinama

Rasa	Incidenca	Mortalitet
Negroidna rasa	255.5	62.3
Bela rasa	161.4	25.6

Hispano	140.8	21.2
---------	-------	------

Ishrana takođe utiče na nivo vitamina D. Povišene vrednosti kalcijuma u ishrani negativnom povratnom spregom sprečavaju sintezu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u bubrezima, te na indirektan način mogu uticati na razvoj karcinoma prostate (154). Halthur i saradnici u studiji sa 1539 pacijenata obolelih od karcinoma prostate nije našao statistički značajnu vezu sa predijagnostičkim vrednostima kalcijuma u serumu (155). Niska incidenca karcinoma prostate u Japanu, i činjenica da se nakon migriranja u područja sa višom incidencom karcinoma prostate učestalost povećava, pripisuje se dijetetskim faktorima, uključujući i unos sveže ribe koja ima visok sadržaj vitamin D (156,157). Ustanovljeno je da i body mass indeks (BMI) takođe korelira sa učestalošću adenokarcinoma prostate. Ispitanici su podeljeni u grupe prema BMI (158,159):

Tabela 7. odnos BMI i učestalosti karcinoma prostate

BMI	18.5–24.9	25.0–29.9	30.0–34.9	35.0–39.9
Relativ risk (95% CI)	1.00	1.08 (1.01–1.15)	1.20 (1.06–1.36)	1.34 (0.98–1.83)

Smatra se da gojazne osobe imaju normalan metabolizam 7 – dehidroholesterola u koži i normalnu apsorpciju vitamina D u tankom crevu, ali da se insuficijencija javlja zbog pojačane depozicije u masno tkivo i smanjene biorasploživosti (160). De Vries i saradnici. su hipotetisali sa odnosom karcinoma kože i adenokarcinoma prostate tj. učestalost karcinoma kože korišćena je kao surogat ekspozicije sunčevom zračenju. Posebnu pažnju obratili su na učestalost karcinoma pglavine i vrata. Kod pacijenata koji su imali nemelanomski karcinom kože ustanovljeno je postojanje niže incidence karcinoma prostate ( incidence ratio 0.73; 95% CI 0.56 - 0.94) (161,162,163). Jonh i saradnici su pronašli nižu incidencu karcinoma prostate kod pacijenata koji su se bavili profesijom vezanom za veću izloženost spoljašnjim uticajima (164).

Epidemiološke studije generalno ukazuju na postojanje povezanosti između nivoa vitamina D u serumu i adenokarcinoma prostate. Smatra se da je pozitivna strana epidemioloških studija, pogotovo ako su kombinovane sa merenjem pigmentacije kože i korelirane sa učestalošću karcinoma kože, to što odražavaju habitualno izlaganje suncu tokom

čitavog života. Na ovaj način je izbegnuta dilema koja postoji kod seroloških studija a koja se tiče trenutka u odnosu na kancerogenezu u kojem je pacijent bio deficijentan ili suficijentan. Naime, merenjem nivoa 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, čiji je poluživot 288 sati ne dobijamo podatak o vrednostima u periodu kada je vitamin D mogao delovati u toku razvoja bolesti.

### 1.8.2. Serološke studije antikancerskog dejstva vitamina D

Kako su epidemiološki dokazi o pozitivnom dejstvu vitamina D na adenokarcinom prostate bili očigledniji pojavile su se i brojne serološke studije koje su se bavile predijagnostičkim nivoom vitamina D. Kod pacijenata koji su 1993. godine učestvovali u Kaiser Permanente Medical Care Plan ustanovljeno je postojanje statistički značajne razlike u nivou 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> između pacijenata koji su imali postavljenu dijagnozu adenokarcinoma prostate i kontrolne grupe. Ova razlika naročito je bila izražena kod pacijenata starijih od 57 godina. Takođe su ustanovili da nivo vitamina D ima prediktivnu ulogu kod palpabilne i kod anaplastiče forme bolesti. Prediktivna uloga vitamina D nije uočena kod T1a i T1b stadijuma (165). Ahonen i saradnici su kod pacijenata koji su učestvovali u Helsinki Heart Study uočili povezanost između predijagnostičkih vrednosti vitamina D i razvoja adenokarcinoma prostate. Nakon 13 godina praćenja 18966 ispitanika indentifikovali su 158 pacijenata sa karcinomom prostate i odredili nivo vitamina D u serumu. Dobili su sledeće podatke:

Tabela 8. verovatnoća razvoja karcinoma prostate prema nivou vitamina D

kvartile (nmol/l)	<30	31-40	41-54	>55
odds ratio	1.7	1.3	0.8	1

Poseban akcenat stavljen je na podatak da je adenokarcinom prostate bio tri puta učestaliji kod osoba koje su bile mlađe od 52 godine i imali nizak nivo vitamina D. Kod ovih pacijenata se takođe 6.3 puta češće javljala uznapredovala bolest (166).

U studiji iz 1995. godine Braun i saradnici posmatrali su nivo vitamina D u kohorti od približno 20 000 ispitanika. Ukupno 61 pacijent je imao dijagostikovani adenokarcinom prostate u periodu od 12 godina, kontrolna grupa su bili ispitanici iste starosne dobi i rase, zdravi. Nisu uočili značajnu razliku u nivou 25(OH)D<sub>3</sub>, niti 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, takođe nije bilo razlike kada je nivo vitamina D analiziran prema kvartilama niti prema starosnoj dobi pacijenata (167). Brändstedt i saradnici su u okviru Malmö Diet and Cancer Study



identifikovali 943 pacijenta sa incidentalnim adenokarcinomom prostate i isto toliko kontrola. Kada su nalazi vitamina D podeljeni u decile uočena je pozitivna korelacija za 7 i 8 decilu - vitamin D 91-97 nmol/L (HR 1.68; CI 1.06-2.68), i 98-106 nmol/L (HR 1.80; CI 1.13-2.85), za ostale decile nije uočena korelacija (168). Tuohimaa i saradnici su pronašli „U shaped“ odnos između nivoa vitamina D i incidence adenokarcinoma prostate. Ustanovili su da postoji povećana incidenca adenokarcinoma prostate kod pacijenata sa niskim vrednostima vitamina D u serumu kao i kod onih sa visokim vrednostima ( $\leq 19$  nmol/l i  $\geq 80$  nmol/l). Činjenicu da se i pri višim vrednostima vitamina D u serumu javlja veća učestalost karcinoma prostate objasnili su povećanom aktivnošću 24 hidrosilaze tj. pojačanom inaktivacijom vitamina D (169). I druge studije nisu našle korelaciju između nivoa vitamina D i učestalosti, stadijuma ili starosne dobi u kojoj se javlja adenokarcinom prostate (170,171,172,173).

### **1.8.3. Ispitivanja in vitro antikancerskog dejstva vitamina D**

- In vitro ispitivanja dejstva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vršena su na većem broju ćelijskih linija ali su najznačajniji rezultati dobijeni ispitivanjem PC3, DU145 i LNCaP ćelijskih linija.
- PC3 – ćelije dobijene iz koštane metastaze, ne reaguju na androgene, glukokortikoide, epidermalne ili fibroblastne faktore rasta, ispoljavaju  $5-\alpha$  reduktazu, VDR, androgeni receptor (AR) i kiselu fofsatazu (PAP) u malim količinama. Ne luče prostata specifični antigen (PSA) i negativne su za prostata specifični membranski antigen (PSMA), daju osteolitičke metastaze(174,175).
- LNCaP – ćelije dobijene iz metastaze u levu supraklavikularnu limfnu žlezdu, androgen senzitivne, ekspimiraju androgene i estrogene receptore, produkuju PSA i PAP, VDR ekspimiraju u manjoj količini nego LNCaP, daju osteoblastne metastaze (176).
- DU145 – ćelije dobijene iz metastaze u mozak, androgen rezistentne, slabo pozitivne za PAP, VDR ekspimiraju u manjoj količini nego LNCaP, ne ekspimiraju PSA (177).

Nakon otkrivanja VDR u malignom tkivu ustanovljeno je antiproliferativno, prodiferencijaciono i proapoptotsko dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Antiproliferativno dejstvo je najviše izučavan mehanizam dejstva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na maligne ćelije. Ustanovljeno je da dolazi

do zaustavljanja rasta u  $G_1$  fazi ćelijskog ciklusa. Najosetljivija ćelijska linija je LNCaP, nakon 6 dana primene  $1,25(OH)_2D_3$  dolazi do smanjenja rasta ćelija od 60%. Sedamdeset dva sata posle prestanka aplikacije  $1,25(OH)_2D_3$  50% manje ćelija je bilo u  $G_2/M+S$  uz akumulaciju u  $G_0/G_1$  fazi. Vreme udvostručavanje ćelija je povećano sa  $28 \pm 1.6$  h na  $61 \pm 0.6$  h (178). Ustanovljeno je postojanje antiproliferativnog dejstva na ćelijske linije PC3 i DU145 (124). Nakon aplikacije  $1,25(OH)_2D_3$  dolazi do nagomilavanja ćelija u  $G_{0/1}$  fazi ćelijskog ciklusa. Molekularni medijatori procesa ćelijskog aresta nakon primene kalцитriola su indentifikovani. Retinoblstoma protein (Rb) je jedan od ovih medijatora, predstavlja ključni regulator tranzicije iz  $G_1$  u S fazu ćelijskog ciklusa. Gubitak Rb može se često videti kod adenokarcinoma prostate te se dosta hipotetisalo sa njegovom ulogom u onkogenezi. Nakon transfekcije Rb plazmida DU145 ćelije nisu pokazivale bolji odgovor na vitamin D, iako su nakon ksenotransplantacije u miševе pokazivale manji stepen agresivnosti (179). Hiperfosforilacija Rb proteina  $G_1$  faze inaktivira Rb protein i oslobađa represiju E2F transkripcionih faktora te ćelija progredira iz G u S fazu. Prilikom dejstva kalцитriola na LNCaP ćelijsku liniju povećava se ekspresija inhibitora ciklin zavisne kinaze (Cdk) p21 te se smanjuje aktivnost Cdk i fosforilacija Rb. U hipofosforilisanom stanju Rb protein ne deluje na E2F transkripcione faktore i ne dolazi do progresije iz  $G_1$  u S fazu (178,180). Smatra se da je kod LNCaP indukcija p21 indirektna, tj. da je posredovana ekspresijom gena za insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) (178,181,182). Kod PC3 ćelija vitamin D ne dovodi do povećanja p21 ekspresije, što se podudara sa činjenicom da kalцитriol ne dovodi do akumulacije PC3 ćelija u  $G_1$  fazi. Kompleks ciklin/Cdk pored jedarne lokalizacije ima ulogu u regulaciji replikacije centrozoma (183). Da bi ostvario ulogu u jedru prilikom prelaska iz  $G_1$  u S fazu nepohodna je mobilizacija ciklin/Cdk iz citosola u jedro. Smatra se da vitamin D reguliše transport ciklin/Cdk iz citoplazme u jedro i na taj način dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa (178,184,185). Alteracije c-MYC onkogenā na hromozomu 8q24, odgovornog za ekspresiju 15% gena, uočene su kod lokalizovanog i metastatskog adenokarcinoma prostate. Smatra se da je ovaj gen odgovoran za prelazak iz  $G_1$  u S ćelijsku fazu.  $1,25(OH)_2D_3$  smanjuje eksprimiranje c-MYC gena kod LNCaP i povećava razgradnju proteina koji ovaj gen kodira (186,187). Kako je gubitak molekula koji regulišu ćelijski ciklus povezan sa agresivnijim oblicima adenokarcinoma prostate smatra se da vitamin D ima ulogu u hemoprevenciji delovanjem na c-MYC.

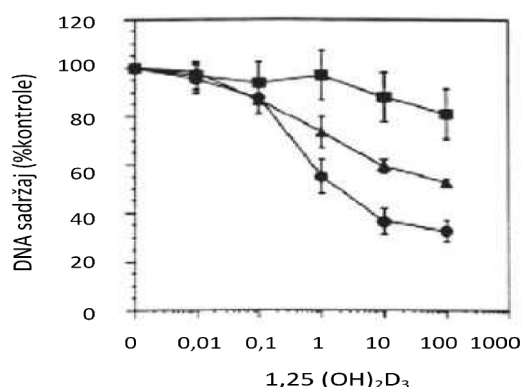
Izazivanje apoptoze nije univerzalno dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na sve ćelijske linije karcinoma prostate. Smatra se da do apoptoze dolazi smanjenjem permeabilnosti ćelijske membrane i otpuštanjem citohroma C uz posledično aktiviranje kaspaza (188). Najviše su ispitivane LNCaP ćelijske linije, međutim dobijeni rezultati nisu bili konzistentni. Zuang i saradnici su dobili rezultate koji su ukazivali na smanjenje aktivnosti Cdk2 i akumulaciju LNCaP u  $G_1$  fazi ali nisu uočili indukciju apoptoze (178). Primenom  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na LNCaP uočena je smanjena ekspresija antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-X. Dalje ispitivanje u kojem su LNCaP ćelijama preneli plazmid sa genom za Bcl-2 pokazalo je da pojačana ekspresija Bcl inhibira proapoptotska dejstva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (189,190,191). Pored ovih mehanizama indukcije apoptoze takođe je zapaženo da analog 24-chlorocalcipotriene-based vitamin D3 analog (BGP-15) aktivira prokaspazu-3 i posledičnu apoptozu.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indukuje apoptozu samo kod nekih ćelijskih linija, apoptoza se ne javlja se kod svih ćelijskih linija kod kojih dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa. Tačan supstrat koji diferencira ćelije kod kojih dolazi do apoptoze i onih kod kojih ne dolazi do apoptoze nije poznat.

Diferencijacija ćelija je proces kojim ćelije stiču specijalizovaniju formu ili oblik. Postoji veliki broj studija koje su posmatrale dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na stepen diferenciranosti ćelija adenokarcinoma prostate. Neke studije nisu pokazale postojanje korelacije. Peel i saradnici su merili ekspresiju keratina koji su markeri epitelne diferencijacije i nisu uočili njihovo pojačano ekspimiranje kada su primarne kulture adenokarcinoma prostate izlagali dejstvu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (125). Takođe jedan od markera diferencijacije prostatičnih ćelija je prostata specifični antigen (PSA). Prilikom transformacije normalne u malignu ćeliju prostate dolazi do smanjenja sekrecije PSA. Sa druge strane u serumu pacijenata sa karcinomom prostate povećava se nivo PSA zbog pojačanog otpuštanja nakon ćelijske smrti. Kod LNCaP uočeno je da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dovodi do povećane sekrecije PSA. Efekti pojačane sekrecije PSA su bili znatno manji nego nakon aplikacije androgena. Takođe je ustanovljeno da kombinacija  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i androgena dovodi do najveće sekrecije PSA, najverovatnije zbog povećanog ekspimiranja AR nakon dejstva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (192). Na osnovu ovoga može se zaključiti da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ima prodiferencijaciono dejstvo ali da tačan mehanizam dejstva nije poznat.

Faktori rasta su jedinjenja koja stimulišu rast, proliferaciju i diferencijaciju ćelija. Tokom razvoja parakrina i autorkina interakcija između strome i epitela prostate rezultira normalnim razvojem. Najvažniji faktori rasta koji regulišu rast prostatičnog epitela su: epidermalni faktor rasta (EGF), keratinocitni faktor rasta (KGF), bazični fibroblastni faktor rasta (bFGF),

transformišući faktori rasta (TGFs) i insulinu sličani faktori rasta (IGFs). Ekprimiranje i autokrino dejstvo faktora rasta koji potiču iz strome predstavlja potencijalni mehanizam razvoja i progresije adenokarcinoma prostate. Pored epitelnih ćelija i stromalne ćelije ekspimiraju VDR tako da se postavlja pitanje uloge i dejstva vitamina D preko strome i interakcije sa faktorima rasta. U istraživanju iz 2007. godine Belochitski i saradnici su posmatrali dejstvo cetuximaba i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na androgen rezistentne ćelije DU145. Posmatrane su karakteristike ćelijskog rasta, ciklusa i apoptoze. Ustanovljeno je da prilikom aplikacije jedne od ispitivanih supstanci dolazi do smanjenja ćelijskog rasta do 25%, povećanja apoptoze 1.5 do 1.7 puta, bez efekta na promene u distribuciji ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. Kombinacija cetuximaba i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dovele su do smanjenja proliferacije za 40%, apoptoza je bila povećana 2.5 puta, uz značajan ćelijski arrest u  $G_0/G_1$  fazi (193). Ustanovljeno je dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i na insulin growth factor (IGF) osovinu. Kod PC3 i LNCaP ćelija  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  smanjuje raspoloživost IGF stimulacijom ekspresije IGF binding proteina-3 (IGFBP-3) (182,194,195). Smatra se da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  deluje preko VDRE koji se nalazi u IGFBP-3 promotoru. Druge studije su pokazale da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dovodi do snižavanja koncentracije IGFBP-3, te se smatra da je povećanje nivoa IGFBP-3 specifično za pojedine ćelije. Transforming growth factor b (TGF b) je citokin sa antiproliferativnim dejstvom na epitelne ćelije. U PC3 ćelijskoj liniji nakon primene  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dolazi do inhibicije rasta PC3 ćelija, bez indukcije apoptoze (188,196,197).

Grafikon 3: odnos inhibicije rasta nakon aplikacije  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (137)



LNCaP – krug, PC3 – trougao DU145 – kvadrat

Stepen inhibicije rasta sa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ćelijskih linija prikazan je na grafikonu 3. Prilikom dejstva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ustanovljeno je da ćelijske linije u različitom stepenu ekspimiraju 25(OH)D24-hidroksilazu. Uloga ovog enzima je razgradnja  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nakon obavljanja fiziološkog dejstva. Kod DU145 postoji najjače ekspimiranje, kod PCA3 nešto manje, dok je kod LNCaP najmanje ekspimirana 25(OH)D24-hidroksilaza (134). Smatra se da postoji inverzan odnos između dejstva  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i indukcije 25(OH)D24-hidroksilaze, tj. ćelije koje jače stvaraju ovaj enzim brže inaktiviraju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a samim tim su podložnije malignoj alteraciji.

Takođe je posmatrano dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na ćelijske kulture dobijene iz preparata nakon radikalne prostatektomije – primarne ćelijske linije. Na ovaj način dobijene ćelijske linije realnije predstavljaju maligno tkivo prostate. U primarnim kulturama je uočena različita ekspimiranost VDR koja nije korelirala sa Gleason grade. Nakon primene vitamina D ćelije su pokazivale ireverzibilnu inhibiciju rasta. Mesto sa kojeg je uzet uzorak - periferija ili centralna zona prostate nije uticalo na nastanak inhibicije rasta. (125).

Androgeni su neophodni za normalan razvoj i fiziološke funkcije normalne prostate. LNCaP ćelijska linija ekspimirira AR, tj. reaguje na primenu androgena. Smatra se da postoji određena interakcija između androgena i vitamina D.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  povećava ekspimiranje AR gena (povećava se nivo mRNK i AR), takođe povećava sekreciju PSA (198,199,200). Bicalutamid koji je antagonist androgenih receptora blokira antiproliferativno dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kod LNCaP, čime se dokazuje uloga AR u antiproliferativnom dejstvu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . (201).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibira rast drugih ćelijskih linija koje ne ekspimiraju AR, te se interakcija između androgenih receptora i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  smatra specifičnošću LNCaP (202).

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) je hormon odgovoran za endohondralnu osifikaciju, smatra se jednim od uzroka hiperkalcemije kod paraneoplastičnog sindroma.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  smanjuje ekspresiju PTHrP (203,204).

#### **1.8.4. Ispitivajna in vivo antikancerskog dejstva vitamina D**

Terapijske doze  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  su toksične (hiperkalcemija), te se na animalnim modelima primenju analozi vitamina D koji su u in vitro studijama dokazali antiproliferativna i proapoptotska dejstva bez uticaja na nivo kalcijuma u serumu. Napravljen je veliki broj animalnih modela koji su težili da što realnije predstavje adenokarcinom prostate. Primenom  $1,25$ -dihidroksi-16-ene-23-yne-vitamin  $\text{D}_3$  na miševе sa PC3 ksenograftima tumorski

volumen je smanjena za 15% (205). Kod imunodeficientnih miševa (nude mice) analog EB1089 je aplikovan nakon formiranja tumora dobijenog ubrizgavanjem LNCaP subkutano u predelu leđa. Analog je aplikovan kada je volumen tumora bio cca 150 mm<sup>3</sup>. U grupi miševa tretiranih sa EB1089 volumen tumora je bio 165.2 ± 23.1 dok je kod kontrolne grupe bio 259 ± 33.7 nakon 19 dana (189). I u drugim istraživanjima uočeni su slični rezultati (206,207). Kod ćelijske linije adenokarcinoma prostate R3327-AT-2 umerenog metastatskog potencijala i MAT LyLu ćelijske sublinije adenokarcinoma prostate visokog metastatskog potencijala i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i analog RO 23-6760 pokazali su inhibiciju rasta (208).

Pored dejstva na maligne ćelijske linije proučavani su hemopreventivni efekti vitamina D i analoga. Ispitivani su transgenski organizmi kod kojih je genetskim inženjeringom stimulirana onkogeneza u prostati. Kod transgenski indukovanih adenokarcinoma prostate kod pacova (TRAMP) koristi se probasin promotor da bi se indukovala ekspresija V 40 large-T antigen kodirajućeg regiona. Kao rezultat dobijaju se životinje sa adenokarcinomom prostate koji histološki veoma podseća na humani oblik bolesti. Ordiniran je analog EB1089 pre indukcije malignog procesa (209). Nije primećeno da postoji odlaganje nastanka bolesti, ali je rast tumora usporen. Kod miševa sa mutacijom Nkx3.1; Pten gena razvija se sa visokom učestalošću PIN koji nakon godinu dana progredira u invazivni adenokarcinom prostate. Kod ove grupe životinja primena 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dovela je do smanjenja učestalosti PIN.

### **1.8.5. Uloga vitamina D u regulaciji zapaljenskih procesa**

Smatra se da je inflamacija uzrok približno 20% malignih alteracija u opštoj populaciji. Hronična inflamacija i hiperproliferacija sa svrhom zamene destruisanog tkiva prepoznata je kao jedan od potencijalnih uzroka karcinoma prostate (18,210). Regeneracija prostatičnog epitela nakon dejstva određenih faktora sredine dovodi do proliferativne inflamatorne atrofije (PIA) koja može progredirati u high grade prostatičnu intraepitelnu neoplaziju (HG PIN) (211,212,213). U PIA lezijama ustanovljena je povećana koncentracija prostaglandina kao i u tkivu adenokarcinoma prostate. Smatra se da PG igraju ulogu u razvoju i progresiji karcinoma prostate preko ciklooksigenaze 2 (COX<sub>2</sub>) koja je enzim odgovoran za njihovu sintezu (214). Enzim 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza (15-PGDH) je antagonist COX<sub>2</sub>, kao rezultat stvaraju se 15 keto derivati koji imaju znatno manju fiziološku aktivnost. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> deluje

na ćelije karcinoma prostate tako što smanjuje sintezu COX<sub>2</sub>, indukuje 15-PGDH i smanjuje ekspresiranje PG receptora (215).

Mitogen-activated protein (MAP) kinases su protein kinaze koje regulišu proliferaciju, gensku ekspresiju, ćelijsku diferencijaciju, mitozu, apoptozu i mnoge druge, značajne funkcije. Da bi postale aktivne prvo se fosforilišu. MKP5 je enzim koji defosforiliše i na taj način inaktivira MAP (216). U primarnim kulturama ćelija prostate 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> deluje tako što povećava ekspresiju MKP5 promoteru u VDRE. Dejstvo je ograničeno na ćelijske linije dobijene od lokalizovanog karcinoma prostate (217). Smatra se da do prestanka ekspresije MKP5 dolazi tokom onkogeneze i da na taj način maligna ćelija anulira tumor supresorno dejstvo MKP5 i 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>.

## **2. Materijal i metode**

### **2.1. Ispitanici**

Medicinska literatura opisuje veliki broj in vitro ćelijskih linija i in vivo eksperimentalnih modela na kojima je ispitivano dejstvo vitamina D. Svaki od ovih modela ima određen procenat sličnosti i razlike u odnosu na primarne ćelije karcinoma prostate. Kvalitet modela procenjuje se na osnovu sposobnosti da što realnije predstavljaju patološke uslove u kojima se razvija adenokarcinom prostate.

Efekti vitamina D najbolje se vide ukoliko se ispituje humana populacija. Tokom dijagnostike adenokarcinoma prostate moguće je formirati jasno definisane grupe sa različitim tokom bolesti i prognozom. Proučavanjem nivoa vitamina D kod različitih stadijuma oboljenja možemo dobiti informacije neophodne za definisanje uloge i značaja vitamina D.

#### **2.1.1. Konstrukcija i način izbora uzorka**

U ispitivanje su uključene dve grupe pacijenata:

- pacijenti sa dijagnostikovanom karcinomom prostate
- kontrolna grupa pacijenata

#### **2.1.2. Pacijenti sa dijagnostikovanom karcinomom prostate**

Kriterijumi za uključivanje bolesnika u ispitivanje su:

- starost 50 i više godina
- dijagnostikovan karcinom prostate
- potpisan Informisani pristanak
- ispunjen Upitnik

Kriterijumi za isključivanje bolesnika su:

- pacijenti koji uzimaju preparate vitamina D i kalcijuma
- pacijenti sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom ili metaboličkom bolesti kostiju

Dijagnoza karcinoma prostate kod ispitanika postavljena je na osnovu određivanja vrednosti PSA i f/tPSA u serumu, DRE, TRUS, TRUS vođene biopsije i patohistološkog



nalaza. Prema kliničkom stadijumu bolesti tj. prema modalitetu lečenja koji je indikovano na osnovu navedenih parametara pacijenti sa dijagnostikovanom karcinomom prostate podeljeni su u tri grupe:

- pacijenti kod kojih je urađena radikalna prostatektomija – pacijenti sa lokalizovanim oboljenjem pT2cN0M0, PSA  $\leq$  20 ng/ml, Gleason 2-7.
- pacijenti kod kojih je urađena hirurška kastracija – pacijenti sa metastatskim oboljenjem, pT3-4, N1, M 0,1(a,b,c), PSA  $\geq$  20 ng/ml, Gleason  $\geq$  8.
- pacijenti kod kojih je urađena medikamentozna kastracija (CAB – LHRH + cyproterone acetat 2x100 mg) - pacijenti sa metastatskim oboljenjem, pT3-4N1, M0,1(a,b,c), PSA  $\geq$  20 ng/ml, Gleason  $\geq$  8.

Pacijenti koji su hirurški ili medikamentozno kastrirani spadali su u D<sub>2</sub> grupu po Jewett klasifikaciji.

Ukupno 90 pacijenata sa dijagnostikovanom karcinomom prostate uključeno je u istraživanje: 30 pacijenata u grupu sa lokalizovanim oboljenjem kod kojih je urađena radikalna prostatektomija, 30 pacijenata sa metastatskim karcinomom prostate kod kojih je urađena hirurška kastracija i 30 pacijenata kod kojih je urađena medikamentozna kastracija. Grupe su obeležene su sa dva latinična slova od kojih prvo (B) označava da je u pitanju kohorta bolesnih, dok drugo slovo označava modalitet lečenja:

- prostatektomija – BP
- medikamentozna kastracija – BK
- hirurška kastracija – BH

### **2.1.3. Kontrolna grupa**

Kriterijumi za formiranje kontrolne grupe su:

- starost 50 i više godina
- ne boluju od karcinoma prostate, niti drugog malignog oboljenja
- potpisan Informisani pristanak
- ispunjen Upitnik

Kriterijumi za isključivanje iz kontrolne grupe su:

- pacijenti koji uzimaju preparate vitamina D i kalcijuma
- pacijenti sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom ili metaboličkim oboljenjem kostiju

Pre uvođenja u kontrolnu grupu kod svih subjekata urađen je DRE, USG bešike i prostate i PSA. Nalaz DRE je bio negativan, tj. prilikom palpacije pacijenti su imali prostatu mekanoelastične konzistencije, palpatorno bezbolnu, jasno ograničenu i jasno palpabilnog sulkusa, bez palpabilnih tumefakcija. USG pregledom bešike i prostate ispitanici su imali fiziološke dimenzije prostate (aproksimativno 4x3x2 cm) i volumen do 22 ml. PSA je:

- $\leq 2,6$  ng/ml ukoliko su subjekti bili starosne dobi od 50 – 60 godina i
- $\leq 4$  ng/ml ukoliko su subjekti bili stariji od 60 godina.

Kontrolna grupa je obeležena na sledeći način: Z.

## 2.2. Uticaj pigmentacije kože na apsorpciju UVB zraka

Pigmentacija kože utiče na prodiranje UVB zraka kroz kožu i produkciju vitamina D. Postoje dve skale po kojima se klasifikuju tipovi kože: Von Luschan-ova i Fitzpatrick-ova skala.

Tabela 9. Von Luschan-ova i Fitzpatrick-ova skala

Fitzpatrick-ova skala	von Luschan – ova skala	Deskriptivno
I	1–5	Veoma svetla ili bela, „Keltski tip“
II	6–10	Svetla ili svetli „Evropski tip“
III	11–15	Svetla, prelazna ili tamni „Evropski tip“
IV	16–21	Tamna, prelazna ili „Mediterranski tip“
V	22–28	Tamna ili „braon tip“
VI	29–36	Veoma tamna ili „crni tip“

Svi pacijenti koji su uključeni u ispitivanje kao i ispitanici koji sačinjavaju kontrolnu grupu imaju kožu tipa III po Fitzpatrick – u tj. tipa 11-15 po von Luschanu. Homogena grupa ispitanika po tipu kože značajna je zbog eliminacije uticaja različite količine melanina u koži na sintezu vitamina D.

### **2.3. Upitnik za procenu uticaja insolacije, ishrane i suplemenata**

Faktori koji mogu uticati na nivo vitamina D i kalcijuma u serumu su ekscesivno izlaganje suncu i unošenje veće količine vitamina D i kalcijuma hranom ili suplementima. Da bismo uočili pacijente čije navike odstupaju od navika ostalih ispitanika formirali smo Upitnik koji su pre uključivanja u ispitivanje popunili svi pacijenti.

#### **2.3.1. Uticaj vitamina D i kalcijuma**

Upitnik je formiran u saradnji sa specijalistima epidemiologije Centra za kontrolu i prevenciju bolesti u Novom Sadu. Sastoji se od 16 pitanja. Prosečan dnevni unos vitamina D u zemljama koje nemaju politiku fortifikacije hrane sa vitaminom D je:

- za vitamin D 100 – 160 IU/danu,
- za kalcijum 871-1266 mg (218,219).

Proučili smo Food Frequency Questionnaire (FFQ) koji se primenjuju za procenu unosa vitamina D i kalcijuma i modifikovali ga prema tipu ishrane koji je karakterističan za ispitivano područje. Kako u literaturi nismo našli podatke vezne za prosečan unos vitamina D i kalcijuma za populaciju koja naseljava teritoriju Vojvodine upitnik je popunilo 90 pacijenata koji su zadovoljavali kriterijum za uključivanje u kontrolnu grupu ali nisu učestvovali u ispitivanju. Na osnovu ovog ispitivanja dobili smo vrednosti unosa vitamina D od 105 IU/dan, dok je unos kalcijuma 910 mg.

U ispitivanje su bili uključeni samo pacijenti i ispitanici u kontrolnoj grupi koji nisu imali odstupanja od srednje vrednosti unosa kalcijuma i vitamina D za 50%.

### **2.3.2. Uticaj insolacije**

Svi ispitanici žive na području koje se prostire između 44° i 46° stepeni geografske širine, i izloženi su približno istoj količini sunčevog zračenja. Da bismo uočili razlike u insolaciji podelili smo godinu na dva dela:

- period od oktobar – april posmatrali smo kao zimski period
- period od maja do septembra posmatrali smo kao letnji period

Tokom zimskih meseci na latitudama većim od 40° nema dovoljno UVB zraka za sintezu vitamina D (152) te je važno indentifikovati pacijente koji su promenom sredine uticali na količinu UVB zraka (220). Pacijenti koji su uključeni u istraživanje dali su podatke vezane za izlaganje suncu (da li ispitanik praktikuje sunčanje, profesionalna ekspozicija tokom letnjih meseci, način odevanja prilikom izlaganja suncu, odlazak na zimovanje/letovanje). Pitanja vezana za izlaganje suncu imala su svrhu da indentifikuju pacijente sa navikama koje su odstupale od ostalih ispitanika. Iz ispitivane grupe isključeni su pacijenti koji su promenom latituda i nadmorske visine uticali na količinu sunčevog zračenja u letnjim i zimskim mesecima.

## **3. Metodologija rada**

Ispitivanje je sprovedeno kao prospektivna i otvorena studija sa 120 ispitanika u Klinici za urologiju i Centru za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog centra Vojvodine. Ispitivanje je trajalo dve godine. Svi pacijenti sa karcinomom prostate kod kojih je indikovano hirurško lečenje operisani su u Klinici za urologiju, medikamentozna kastracija je takođe ordinirana u Klinici za urologiju. Kontrolna grupa ispitanika bile su osobe iz opšte populacije.

Preoperativno tj. pre ordiniranja medikamentozne kastracije kod svih pacijenata uzeta je krv za neophodne analize – PSA i vitamin D. Korišćene su epruvete Venosafe 9ml, VF-109SP, cloc act. Nakon uzimanja krvi uzorci su odmah transporovani u Centar za laboratorijsku dijagnostiku. Nakon odvajanja seruma isti su zadržavani na -20 C° tokom 2 meseca. U serijama skladištenih uzoraka seruma određena je koncentracija PSA, vitamina D (25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) elektrohemiluminescentnom (ECLA) metodom na automatizovanom analizatoru

Elecsys 2010 proizvođača Roche Diagnostics. Prilikom inicijalnog pregleda pacijenti su popunili Upitnik i Informisani pristanak.

Operativni zahvati, radikalna prostatektomija i hirurška kastracija, urađeni su na standardan način. Radikalna prostatektomija podrazumeva uklanjanje prostate, semenih vezikula, prostatične uretre, proksimalnog dela duktusa deferensa i obostranu obturatornu i ilijačnu limfadenektomiju. Hirurška kastracija rađena je subkapsularnom tehnikom tj. tkivo testisa odstranjeno je bez tunike albuginee. Kod pacijenata koji su kastrirani medikamentoznim putem ordiniran je LHRH agonista i antiandrogen. LHRH agonista–Zoladex 3.6 mg (goserelin acetate) proizvođača AstraZeneca. U pitanju je depo preparat koji se ordinira subkutanom injekcijom u prednji trbušni svakih 28 dana. Da bi se blokirali adrenalni androgeni u sklopu CAB ordiniran je Androcur (cyproterone acetat), Schering LTD 2x50 mg, tokom godinu dana.

Ispitanici su praćeni tokom godinu dana, svaki pacijent je imao 2 kontrole: na 6 i 12 meseci od uvođenja u ispitivanje. Koncentracija vitamina D ima sezonsku oscilaciju, zbog pojačanog sunčevog zračenja više vrednosti se očekuju tokom i nakon letnjih meseci. Nakon inicijalnog merenja nivoa vitamina D i PSA prilikom uključivanja u istraživanje preostala dva merenja su raspoređena tako da su vrednosti kod svih pacijenata merene nakon letnjeg i zimskog perioda (ili obrnuto). Na kontrolnim pregledima urađena je analiza nivoa PSA i vitamina D. Prema dobijenim vrednostima pacijenti su dalje stratifikovani u grupe:

- Pacijenti kod kojih je urađena radikalna prostatektomija i koji su imali PSA na kontrolnom pregledu veći od 0,2 ng/ml svrstani su u grupu pacijenata kod kojih je došlo do progresije bolesti
- Pacijenti kod kojih je urađena hirurška i medikamentozna kastracija i koji su nakon navedenih intervencija imali vrednosti PSA u serumu manju do 0.2 ng/ml, 0.2-4 ng/ml i veću od 4 ng/ml (221) prema literaturi imaju različitu prognozu te se posmatraju kao tri zasebne grupe. Nivo manji od 0.2 ng/ml ne ukazuje na progresiju dok se za nivoe veće od ovog smatra da je došlo do progresije.

U odnosu na inicijalno započetu terapiju pacijenti nisu dobijali dodatne medikamente niti su rađeni drugi hirurški zahvati. Patohistološke analize obavljene su u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

## **4. Ciljevi i hipoteze**

### **4.1. Ciljevi**

Istraživanje je usmereno na ispitivanje odnosa između nivoa vitamina D u različitim stadijumima bolesti u četiri grupe (grupa pacijenata kod kojih je urađena radikalna prostatektomija, grupa hemijski kastriranih, grupa hirurški kastriranih i kontrolna grupa) i analizu relevantnih relacija između analiziranih parametara sa ciljem određivanja:

1. koncentracije vitamina D u grupama ispitanika (prema modalitetu lečenja tj. stadijumu bolesti) i utvrđivanje stepena povezanosti
2. odnosa nivoa vitamina D prema vrednostima PSA
3. stepena korelacije između koncentracije vitamina D i Gleason scor i grade
4. odnosa između PSA i vitamina D kod pacijenata sa progresijom bolesti
5. odnosa između promene nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapije i stepena povezanosti sa nivoom vitamina D
6. relacije između dinamske progresije bolesti (vreme do progresije) i nivoa vitamina D

### **4.2. Hipoteze rada**

Imajući u vidu brojne podatke o protektivnom i antikancerogenom efektu vitamina D, pretpostavlja se da će:

1. nivo vitamina D biti viši kod pacijenata koji imaju lokalizovanu bolest (grupa - radikalna prostatektomija) u odnosu na pacijente koji imaju uznapredovalu bolest (hormonski i hirurški kastrirani). Kod pacijenata u kontrolnoj grupi očekuje se da će nivo vitamina D biti najviši.
2. nivo vitamina D biti niži kod pacijenata koji su imali viši PSA.
3. nivo vitamina D biti niži kod pacijenata koji imaju više vrednosti Gleason scor i grade.
4. se kod pacijenata sa progresijom bolesti registrovati niži nivo vitamina D pri višoj koncentraciji PSA.

5. se kod pacijenata sa većim padom nivoa PSA nakon ordinirane terapije registrovati viši nivo vitamina D u serumu.
6. nivo vitamina D biti niži kod pacijenata kod kojih do biohemijske progresije dolazi ranije u odnosu na pacijente kod kojih do biohemijske progresije dolazi kasnije.

## 5. Rezultati

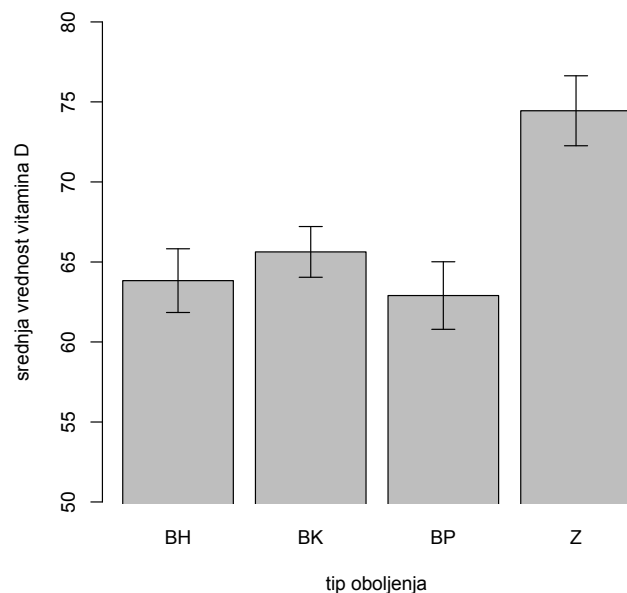
### 5.1. Nivo vitamina D u grupama ispitanika

Prosečne vrednosti pokazuju da postoji značajna razlika u nivou vitamina D u različitim grupama ispitanika. U kontrolnoj grupi (Z) pacijenti imaju viši nivo vitamina D, dok između tri grupe pacijenata kod kojih je dijagnostikovao karcinom prostate (BH, BK, BP) razlike nisu uočene (tabela 10, grafikon 4). Tabele prikazuju filtrirane vrednosti (uklonjene ekstremne vrednosti). Postupak se koristi u konzervativnoj analizi podataka.

Tabela 10. Aritmetička sredina vrednosti vitamina D i standardna devijacija

	BH	BK	BP	Z
aritmetička sredina (X)	63.83	65.63	62.90	74.45
standardna devijacija (SD)	18.87	15.03	20.02	20.74

Grafikon 4. Grafički prikaz aritmetičke sredine nivoa vitamina D sa 95% intervalom poverenja



Aritmetička sredina vrednosti vitamina D u grupi Z je 74.45 (CI 95% = 72.31 - 76.59). Kod pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom prostate aritmetička srednja vrednost vitamina D je 64.12 (CI 95% = 62.26 - 65.98).

Rezultati jednosmerne analize varijanse potvrđuju da je nivo vitamina D kod grupe Z statistički značajno viši ( $p = 0.006$ ), dok se u ostale tri grupe nivo vitamina D međusobno ne razlikuje (tabela 11).

Tabela 11. Značajnost razlika u nivou vitamina D u grupama

	nivo vitamina D (odsečak)	Std. greška ocene	t vrednost	p
BP	61.012	3.411	17.886	< 0.001
BH	2.821	4.784	0.590	0.557
BK	4.617	4.784	0.965	0.336
Z	13.438	4.784	2.809	0.006

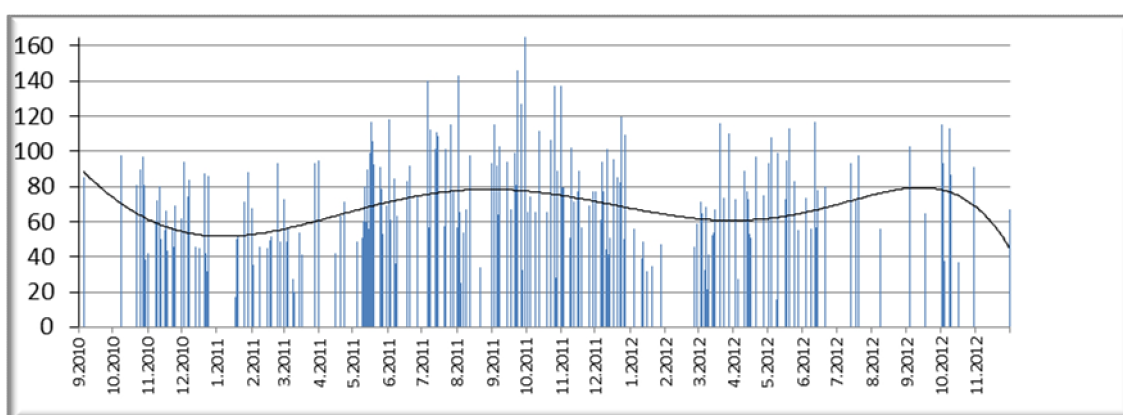


Od ukupno 360 merenja (inicijalno i dva kontrolna) kod sve četiri ispitivane grupe 102 merenja bila su deficitarna, 118 insuficijentno dok je 140 merenja bilo suficijentno.

## 5.2. Uticaj insolacije na vrednosti vitamina D i korelacija sa vrstom oboljenja

Sezonska oscilacija nivoa vitamina D karakteristična je za ispitivano podneblje (44 – 46° severne geografske širine). Posmatrali smo nivo vitamina D kod svih pacijenata u ispitivanom periodu (09.2010 – 11.2012). Rezultati su prikazani na grafikonu 5.

Grafikon 5. Oscilacija nivoa vitamina D u ispitivanom periodu



Grafikon 5 pokazuje da postoji sezonska oscilacija nivoa vitamina D, postepen porast se vidi u 4. mesecu, najviši nivo je u 9. mesecu nakon čega postepeno nivo vitamina D počinje da opada.

Da bismo procenili efekat godišnjeg doba u kojem je uzorak uzet formirali smo dvanaest grupa prema modalitetu lečenja: Z\_1, Z\_2, Z\_3, BH\_1, BH\_2, BH\_3, BK\_1, BK\_2, BK\_3, BP\_1, BP\_2, BP\_3.

Grupe se se razlikuju prema stadijumu bolesti i periodu u kojem su uzorci uzeti:

- period sa manje insolacije: 10 – 04 meseca
- period sa više insolacije: 05 – 09 meseca.

Prvo i treće merenje uzeti su u periodu sa manje insolacije, drugo u periodu sa više insolacije. Tabela 12 prikazuje broj uzetih merenja u ovim periodima.

Tabela 12. odnos merenja u periodu sa više i manje insolacije kod grupa Z, BP, BH, BK

	Period sa više insolacije	
	NE	DA
1	88	32
2	35	85
3	83	37
Σ	206	154

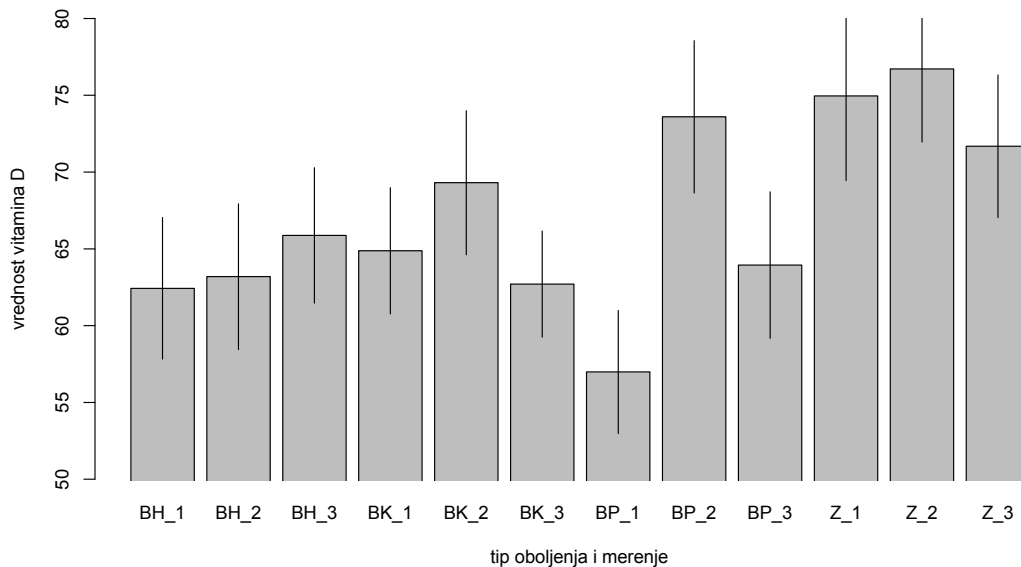
Pacijenti u grupi Z imali su najviši nivo u sva tri merenja (Z\_1, Z\_2, Z\_3). Merenje Z\_2 ima statistički značajno viši nivo vitamina D u odnosu na Z\_1 i Z\_3 (p = 0.004). Dodatno, analiza varijanse pokazuje da se dve grupe obolelih, takođe, izdvajaju po značajno višem nivou vitamina D. To su pacijenti iz grupe BK i BP, u drugom merenju - BK\_2 i BP\_2 (tabela 13, grafikon 6). Povišene vrednosti u drugom merenju kod ove dve grupe i kod ispitanika iz grupe Z javljaju se u periodu sa više insolacije. Najniži nivo vitamina D uočen je kod pacijenata u BP\_1 grupi. Kada se u obzir uzme i redosled obavljenog merenja, rezultati potvrđuju prethodne nalaze, tj. u grupi Z postoje više vrednosti nego kod ostalih ispitivanih grupa.

Tabela 13. Vrednosti vitamina D prema periodu u kojem je uzorak uzet

	nivo vitamina D (odsečak)	Std. greška ocene	t vrednost	p
BP_1	56.987	4.251	13.406	< 0.001
BH_1	5.443	6.012	0.905	0.366
BH_2	6.203	6.012	1.032	0.303
BH_3	8.890	6.012	1.479	0.140
BK_1	7.891	6.012	1.313	0.190
BK_2	12.319	6.012	2.049	0.041
BK_3	5.717	6.012	0.951	0.342
BP_2	13.389	6.063	2.208	0.028

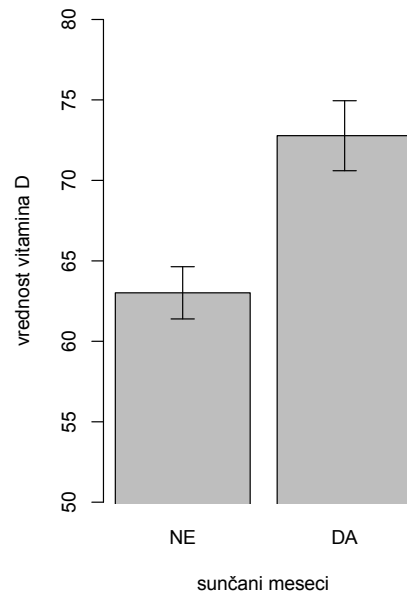
BP_3	4.127	6.063	0.681	0.497
Z_1	10.965	6.177	1.775	0.077
Z_2	17.441	6.063	2.876	0.004
Z_3	14.697	6.012	2.445	0.015

Grafikon 6. Nivo vitamina D prema periodu u kojem je uzorak uzet



Nakon što je uočeno da u pojedinim grupama postoji viši nivo vitamina D tokom meseci sa većom insolacijom, dok se u drugim grupama ovo ne uočava analizirali smo uticaj sunčevog zračenja. Formirane su dve grupe u zavisnosti da li je uzorak uzet u periodu sa većom ili manjom insolacijom. Dopunska analiza varijanse pokazala je da efekat sunčanih (letnjih) meseci ima nezavisni efekat na nivo vitamina D i da nije u interakciji sa tipom oboljenja i merenjem. Efekat sunčanih meseci je visoko značajan i pozitivan (Ocena = 8.801; Std. greška ocene = 2.507;  $t = 3.510$ ;  $p = 0.001$ ). Tokom perioda godine sa većom insolacijom (5 – 9 mesec), nivo vitamina D je značajno viši (grafikon 7).

Grafikon 7. Efekta sunčanih meseci na nivo vitamina D



### 5.3. Nivo vitamina D prema nivou PSA

Nakon grafičkog prikaza nivoa PSA uočeno je da postoji znatno odstupanje od normalne raspodele. Tabele sa rezultatima prikazuju vrednosti iz analiza sa eliminisanim ekstremnim rezidualnim vrednostima (većim od 2.5 standardnih jedinica). Na ovaj način 95% navedenih vrednosti je uzeto u obzir dok je 5% ekstremnih rezidualnih vrednosti odbačeno. Postupak je primenjivan uvek kada rezidualne vrednosti nisu pratile normalnu raspodelu. Rezultati sa uklonjenim vrednostima reziduala provereni su kritikom modela kojom se proverava robusnosti nalaza i sledi konzervativan (strogi) pristup u obradi podataka. Kritikom modela dokazano je da svi ovde prikazani statistički modeli imaju verodostojne nalaze.

Rezultati su pokazali da insolacija ima značajan uticaj na nivo vitamina D te je statističkim putem isključen ovaj uticaj. Formiran je model u kojem su sunčani meseci (DA ili NE) prediktor i izračunati su rezidualni nivoi vitamina D. Zatim su tako dobijene vrednosti sabrane sa opštim, prosečnim nivoom vitamina D ( $M = 66.70$ ). Originalne vrednosti, tj. sirovi nivo vitamina D i nove vrednosti stoje u visokoj pozitivnoj korelaciji ( $r = 0.982$ ;  $t = 97.416$ ;  $p < 0.000$ ). To znači da se u osnovi operiše sa istom varijablom, što olakšava interpretaciju nalaza i razumevanje relacija sa ostalim varijablama. Rezidualne vrednosti nivoa vitamina D,

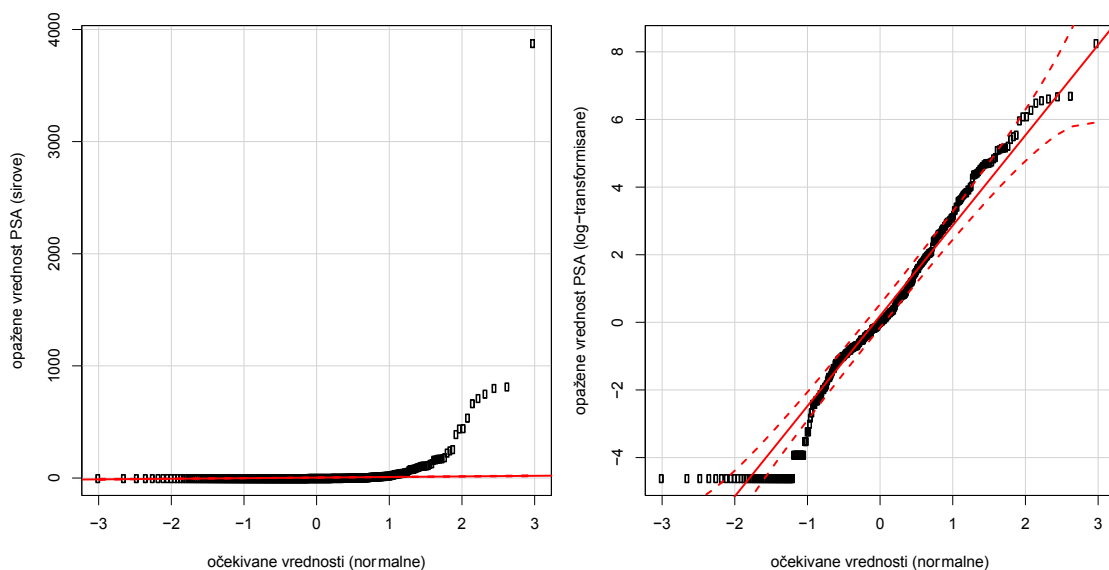
centrirane na vrednost aritmetičke sredine, predstavljaju istu varijablu kao i originalni nivo vitamina D, iz koje je eliminisan uticaj insolacije.

Dalje analize su radene na ovako pripremljenim vrednostima nivoa vitamina D, glavne kriterijumske varijable.

Proučavan je odnos vitamina D i PSA kao jednog od glavnih pokazatelja stadijuma bolesti. Analiza distribucije vrednosti PSA pokazuje zakošenost u pozitivnu stranu, tj. veoma razvučen desni kraj distribucije. Ovakva distribucija se javlja zbog postojanja visokog nivoa PSA kod pacijenata sa metastatskim oboljenjem. Da bi bile zadovoljene pretpostavke za uključivanje ove varijable u analize zahtevani oblik raspodele je normalna (Gauss-ova) raspodela. Kao što se vidi na grafikonu 8 sirovi PSA ima distribuciju koja dramatično odsupa od normalne. Zbog toga je umesno pretpostaviti da se vrednosti PSA distribuiraju log-normalno. To znači da, ukoliko se sirove vrednosti pretvore u logaritamske postoji normalna distribucija. Kako grafikon 9 pokazuje, prethodna pretpostavka je opravdana. Log-vrednosti PSA daju raspodelu koja je daleko sličnija normalnoj raspodeli.

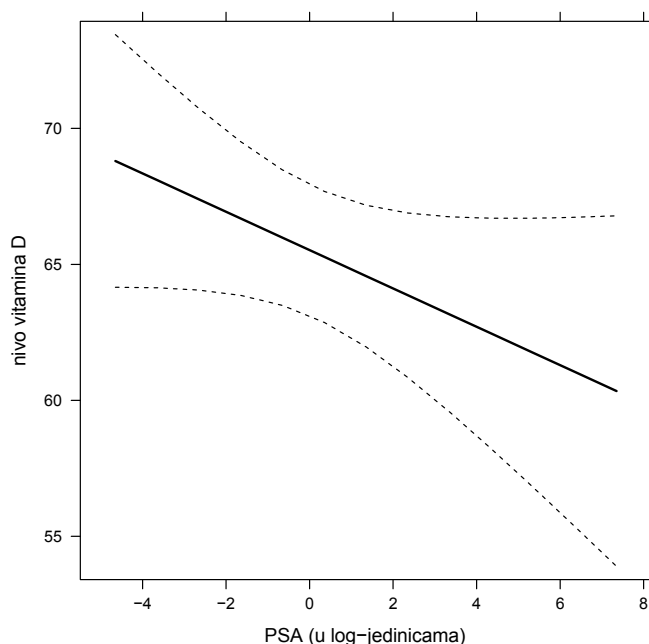
Zbog toga su sirove vrednosti PSA transformisane u logaritamske vrednosti ( grafikon 8 i 9). Tako je dobijena distribucija koja ima veću simetriju i približava se normalnoj raspodeli vrednosti.

Grafikon 8 i 9. Distribucija PSA i distribucija PSA nakon log transformacije



Nakon analize podataka može se zaključiti da kod svih ispitanika (Z, BP, BH, BK) log-transformisani PSA stoji u značajnoj i negativnoj korelaciji sa (rezidualizovanim i centriranim) nivoom vitamina D ( $r = -0.114$ ;  $t = -2.178$ ;  $p = 0.030$ ). To znači da je nivo vitamina D niži kod pacijenata sa višim PSA nakon isključivanja uticaja insolacije (grafikon 10).

Grafikon 10. Korelacija log vrednosti PSA i nivoa vitamina D sa 95% intervalom proverenja

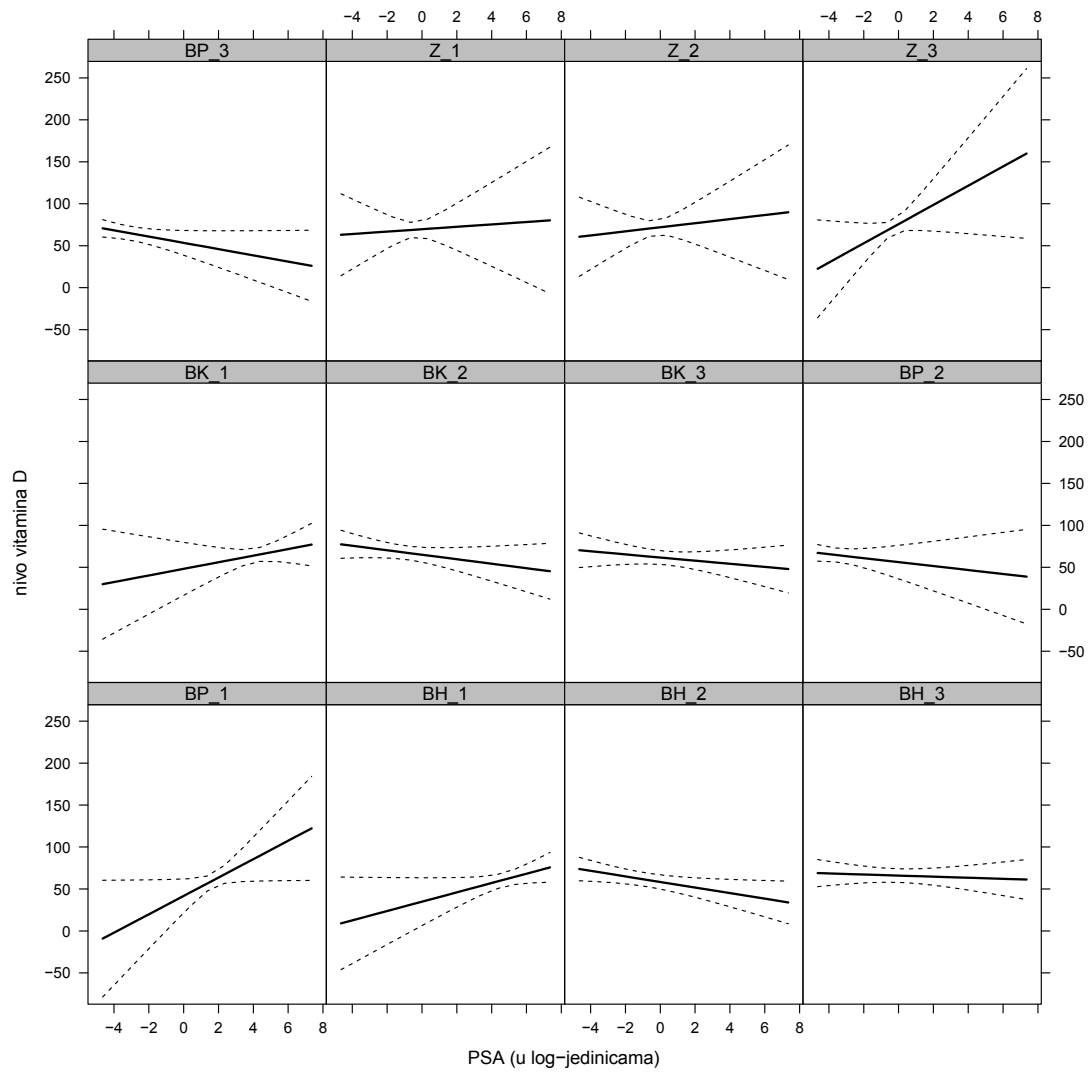


Da bi se detaljnije odredio stepen povezanosti između nivoa vitamina D i PSA posmatrani su nivoi PSA i vitamina D u sva tri uzorka, kod svih grupa. Na ovaj način omogućeno je određivanje stepena korelacije nivoa vitamina D i PSA pre i nakon ordinirane terapije. Analizom dobijenih podataka uočeno je da postoje razlike u ovom odnosu koje su specifične za grupe pacijenata i konkretno merenje (tabela 14, grafikon 11). Rezultati analize kovarijanse pokazuju da, u odnosu na pacijente iz grupe BP u prvom merenju, kod više grupa pacijenata nakon ordinirane terapije, sa porastom PSA, nivo vitamina D statistički značajno više opada. To su sledeće grupe: BH u drugom i trećem merenju, BK u drugom i trećem merenju i BP u drugom i trećem merenju.

Tabela 14. Korelacija nivoa vitamina D i PSA po grupama ispitanika i prema određenom uzorku

	Nivo vitamina D (odsečak)	Std. greška ocene	t vrednost	p
BP1	41.731	10.263	4.066	< 0.000
BH_1	-6.890	17.769	-0.388	0.698
BH_2	16.621	11.120	1.495	0.136
BH_3	24.229	11.054	2.192	0.029
BK_1	6.478	19.042	0.340	0.734
BK_2	23.289	11.202	2.079	0.038
BK_3	19.961	11.067	1.804	0.072
BP_2	14.503	14.438	1.004	0.316
BP_3	11.653	12.707	0.917	0.360
Z_1	27.913	11.340	2.461	0.014
Z_2	30.220	11.150	2.710	0.007
Z_3	33.961	11.217	3.028	0.003
log PSA	10.956	5.533	1.980	0.049
BH_1 : log PSA	-5.398	6.284	-0.859	0.391
BH_2 : log PSA	-14.273	5.734	-2.489	0.013
BH_3 : log PSA	-11.596	5.744	-2.019	0.044
BK_1 : log PSA	-7.026	6.700	-1.049	0.295
BK_2 : log PSA	-13.630	5.879	-2.319	0.021
BK_3 : log PSA	-12.821	5.870	-2.184	0.030
BP_2 : log PSA	-13.314	6.112	-2.178	0.030
BP_3 : log PSA	-14.677	5.893	-2.491	0.013
Z_1 : log PSA	-9.527	7.957	-1.197	0.232
Z_2 : log PSA	-8.526	7.695	-1.108	0.269
Z_3 : log PSA	0.498	8.706	0.057	0.954

Grafikon 11. Matrični dijagram korelacije nivoa vitamina D i PSA po grupama ispitanika i prema određenom uzorku



\* isprekidana linija – 95% interval poverenja



#### 5.4. Korelacija nivoa vitamina D i Gleason grade i scor

Efekat vitamina D na primarni i sekundarni Gleason grade i scor ispitan je višestrukom regresionom analizom. Analiza je pokazala statistički značajne osnovne efekte primarnog i sekundarnog Gleason grade i njihovu statistički značajnu interakciju. Gleason skor nije dostigao značajnost, čak ni kada je visoka korelacija koju ova varijabla ima sa primarnim i sekundarnim merenjem stavljena pod statističku kontrolu. Naprosto, ovaj prediktor nema nezavisni doprinos u predikciji nivoa vitamina D kada su primarni i sekundarni Gleason scor određeni kao prediktori u modelu (Ocena = 1.050; Std. greška ocene = 3.875; t = 0.061; p = 0.951).

S obzirom da obični linearni modeli, kao statistički postupak, ne mogu na adekvatan način modelovati i prikazati interakciju kontinuiranih prediktora – kovarijabli, odlučili smo se za adekvatniji postupak generalizovanih aditivnih modela. Interakciju primarnog i sekundarnog Gleason grade prikazali smo kao proizvod tenzora, koji daje najprirodnije procene združenog uticaja numeričkih prediktora na numerički kriterijum. Dodatno, pomenuti združeni efekat posmatrali smo posebno za svaki tip pacijenata.

Tabela 15. Interakcija vitamina D i Gleason grade

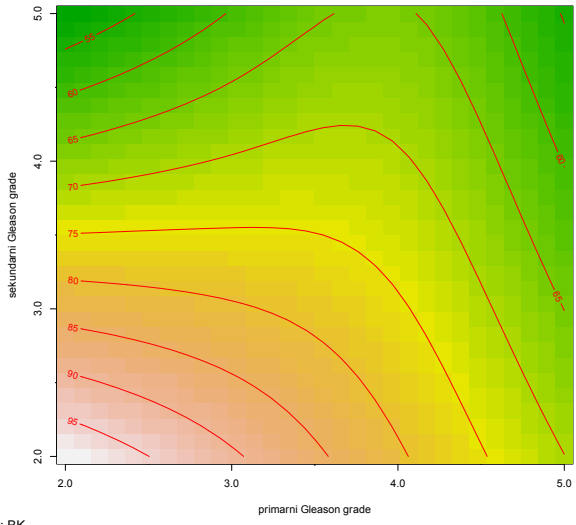
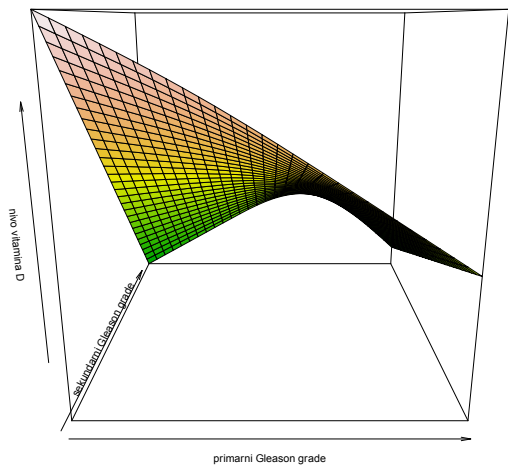
Parametarski koeficijenti				
Efekat	Ocena	Std. greška ocene	t vrednost	p
odsečak	68.569	6.765	10.130	< 0.001
Procenjena značajnost prilagođenih vrednosti				
	edf	Ref.df	F	p-value
BP : primarni i sekundarni Gleason grade	4.542	4.876	2.214	0.055
BH : primarni i sekundarni Gleason grade	3.620	3.916	6.308	< 0.001
BK : primarni i sekundarni Gleason grade	3.668	4.015	2.243	0.065

\* Edf - procenjeni stepen slobode, ref.df. - korigovani procenjeni stepen slobode.

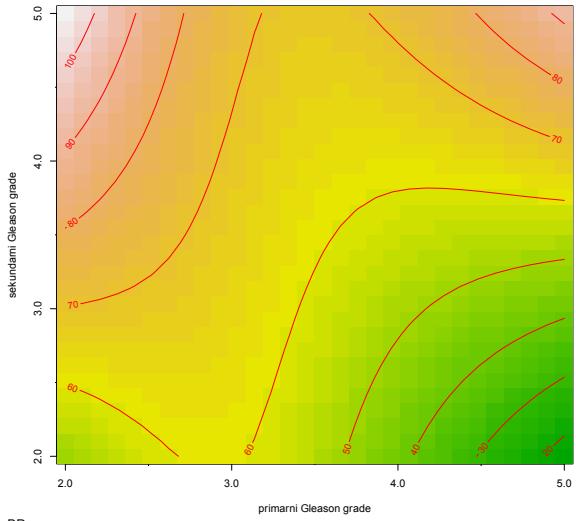
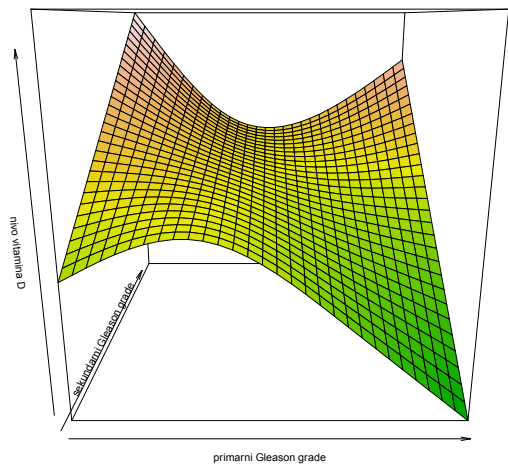
Kao što rezultati u tabeli 15 pokazuju, interakcija primarnog i sekundarnog Gleason grade za grupe pacijenata BK i BP jesu slabe, odnosno, marginalno značajne. Međutim, za grupu

pacijenata BH, interakcija primarnog i sekundarnog Gleason grade na nivo vitamina D ostvaruje veoma jak efekat. Da bismo razumeli šta ovaj odnos znači, moramo konsultovati grafički prikaz (grafikon 12).

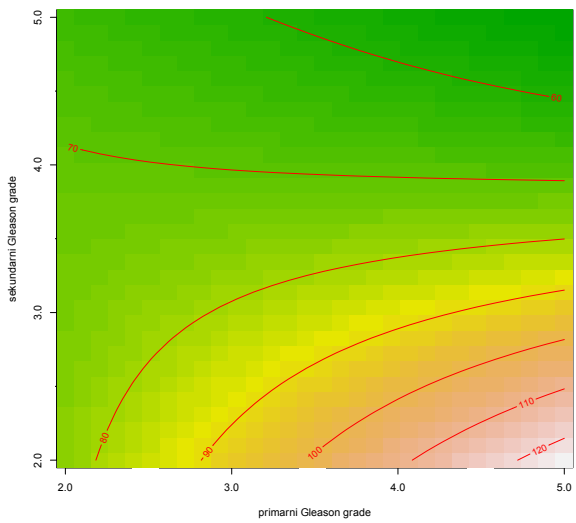
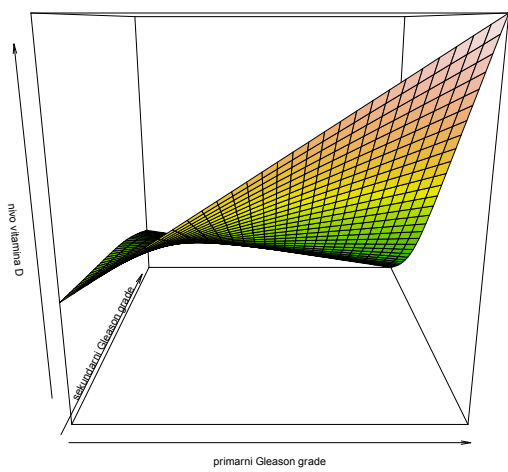
Grafikon 12. Grafički prikaz interakcije nivoa vitamina D i Gleason grade



tip: BK



tip: BP



tip: BH

Gornji par grafikona predstavlja efekat interakcije vitamina D i primarnog i sekundarnog Gleason grade u BK grupi. Za grupu pacijenata BK efekat interakcije jeste samo marginalni. Na osnovu grafičkog prikaza vidimo da je nivo vitamina D najviši kada su i primarni i sekundarni Gleason grade na najnižim vrednostima, što je u skladu sa postavljenom hipotezom. Kada je primarni Gleason grade niže vrednosti, sa porastom vrednosti sekundarnog Gleason grade nivo vitamina D najbrže opada. Za srednje vrednosti primarnog Gleason grade, promene u vrednosti sekundarnog Gleason grade pokazuju neznatno niže vrednosti vitamina D. Kod visokih vrednosti primarnog Gleasona grade sa povećanjem vrednosti sekundarnog Gleason grade vrednosti vitamina D opadaju što se takođe može očekivati. Taj pad vrednosti je manji nego u slučaju niskih vrednosti primarnog Gleason grade, ali je izrazitiji nego u slučaju umerenih vrednosti.

Srednji par grafikona predstavlja efekat interakcije vitamina D i primarnog i sekundarnog Gleason grade u BP grupi. Za pacijente iz grupe BP efekat interakcije primarnog i sekundarnog Gleason grade je granično značajan ( $p = 0.055$ ). Interakcija se ponaša gotovo obrnuto od one koju smo videli kod grupe pacijenata BK. Sada, za niske vrednosti primarnog Gleason grade sa porastom vrednosti sekundarnog Gleason grade raste vrednost vitamina D. Slično kao i u slučaju pacijenata iz grupe BK, ako su vrednosti primarnog Gleason grade srednje, porast vrednosti sekundarnog Gleason grade ne proizvodi veće promene u nivou vitamina D. U slučaju visokih vrednosti primarnog Gleason grade sa porastom vrednosti sekundarnog Gleason Grade rastu i vrednosti vitamina D.

Donji par grafikona prikazuje efekat interakcije vitamina D i primarnog i sekundarnog Gleason grade za grupu pacijenata BH. Može se videti da je nivo vitamina D konstantno nizak. Sa porastom primarnog Gleasona povećava se vrednosti vitamina D. Ukoliko je vrednosti primarnog Gleason grade niska sa povećanjem vrednosti sekundarnog Gleason grade neznatno se smanjuje vrednost vitamina D. U slučaju kada se posmatra srednja i visoka vrednost primarnog Gleason grade sa povećanjem sekundarnog Gleason grade vrednost vitamina D pada. Dakle, veća koncentracija vitamina D postoji samo kod najviših vrednosti primarnog Gleason grade, kada su, istovremeno, vrednosti sekundarnog Gleason grade najniže. Drugim rečima, sa najvećom pozitivnom promenom – najvećom razlikom između vrednosti primarnog i sekundarnog Gleason scora najveći je i porast vrednosti vitamina D.

### 5.5. Nivo vitamina D kod pacijenata kod kojih je došlo do progresije bolesti

Analiza grupe obolelih pokazala je da je da progresija postoji kod ukupno 51 ispitanika. Učestalost progresije prema grupama prikazana je u tabeli 16.

Tabela 16. Učestalost progresije prema grupama ispitanika

	progresija	
	NE	DA
BP	25	5
BH	9	21
BK	5	25

Razlika koja se uočava u tabeli 16 potvrđena je i hi-kvadrat testom za kontingencijske tabele (pritom su specifične vrste progresije spojene u jednu kategoriju (progresija) da bi se eliminisale nulte ćelije). Postoji statistički značajna razlika u broju slučajeva sa i bez progresije bolesti, između pacijenata iz grupe BP i pacijenata grupa BH i BK (hi-kvadrat = 30.407;  $df = 2$ ;  $p < 0.001$ ). U tabeli 7 se može primetiti da postoji razlika i između grupa BH i BK, jer je kod ove poslednje broj slučajeva sa progresijom čak i veći. Hi-kvadrat test (sa korekcijom za tabele 2x2), međutim, pokazuje da ova razlika nije značajna (hi-kvadrat = 0.838;  $df = 1$ ;  $p = 0.360$ ). Zato su u daljoj analizi grupe BH i BK posmatrane kao jedna grupa. Ovako dobijeni podaci važe i za pojedinačne grupe BH i BK, zbog statističke logike grupe su posmatrane zajedno.

### 5.6. Promena nivoa PSA nakon lečenja i određivanje stepena povezanosti sa nivoom vitamina D

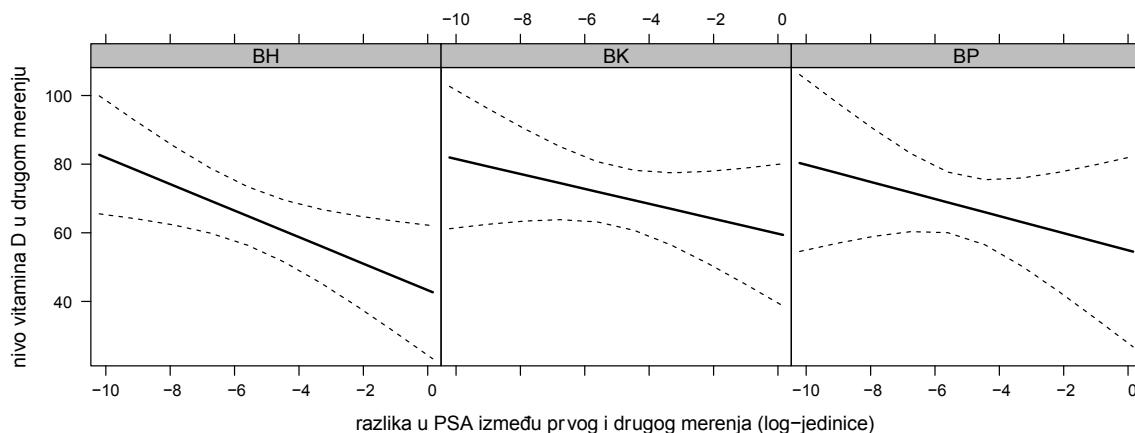
U ovoj analizi najpre su uklonjeni zdravi ispitanici. Zatim su vrednosti PSA transformisane u log-jedinice. Na takvim, log-vrednostima PSA, izračunata je razlika (promena; najčešće pad vrednosti) PSA između prvog i drugog merenja. Izračunate su rezidualne vrednosti nivoa vitamina D u drugom merenju, tj. uklonjen je efekat sunčanih meseci. Kao i prethodno, te rezidualne vrednosti su centrirane na prosečnu vrednost nivoa vitamina D.

Testiran je model u kojem su ispitivani efekti razlike u PSA između prvog i drugog merenja i tipa oboljenja na nivo vitamina D u drugom merenju. Rezultati su pokazali da je sa većom razlikom (većim padom nivoa PSA) veći i nivo vitamina D. Međutim, ova promena je ista za sve tri grupe ispitanika, tj. možemo zaključiti da je ovaj trend opšti, a ne specifičan za određene tipove bolesnika. Rezultati su prikazani u tabeli 17 i grafikonu 13.

Tabela 17. Promena vrednosti nivoa vitamina D pre i nakon terapije

	Nivo vitamina D	Std. greška ocene	t vrednost	p
odsečak	51.821	6.164	8.407	< 0.000
BH : razlika u log PSA	-2.608	1.148	-2.272	0.02562
BK : razlika u log PSA	-3.476	1.27	-2.736	0.00758
BP : razlika u log PSA	-3.022	1.315	-2.298	0.02404

Grafikon 13. Korelacija promene vrednosti PSA nakon lečenja i nivoa vitamina D



### 5.7. Nivo vitamina D i vreme do progresije

Da bi se ispitala interakcija progresije bolesti i nivoa vitamina D, najpre su izračunate prosečni nivoi rezidualnog vitamina D za drugo i treće merenje, za svakog ispitanika posebno. Zatim su posmatrani efekti progresije za grupe pacijenata BH i BK, kao i za grupu pacijenata BP, posebno. Formirana je grupa ispitanika kod koje je došlo do progresije prilikom prve

kontrole i označili je sa I, dok su pacijenti kod kojih je do progresije došlo prilikom druge kontrole označeni sa II. Kako se prema literaturi prognoza bolesti razlikuje kod grupe BH i BK u zavisnosti da li je nivo PSA od 0,2 – 4ng/ml ili veći od 4 ng/ml formirane su još dve grupe u zavisnosti od ovih parametara i označili ih 0,2-4 i >4. Na ovaj način dobijene su četiri podgrupe ispitanika:

- **I 0,2-4** pacijenti kod kojih je prilikom prve kontrole došlo do porasta nivoa PSA od 0,2 – 4 ng/ml
- **I > 4** pacijenti kod kojih je prilikom prve kontrole došlo do porasta nivoa PSA većeg od 4 ng/ml
- **II 0,2-4** pacijenti kod kojih je prilikom druge kontrole došlo do porasta nivoa PSA od 0,2 – 4 ng/ml
- **II > 4** pacijenti kod kojih je prilikom druge kontrole došlo do porasta nivoa PSA većeg od 4 ng/ml

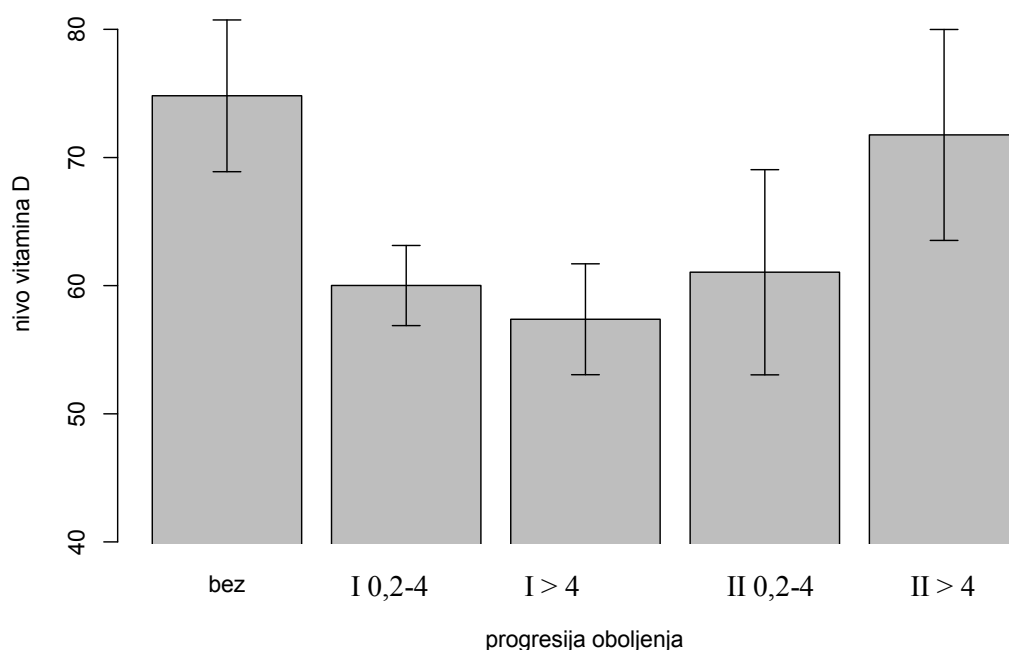
Za grupu pacijenata BH i BK, nivo vitamina D jeste statistički značajno niži ukoliko postoji progresija bolesti (tabela 18, grafikon 14). Progresija označena sa I (na prvoj kontroli) je povezana sa značajnim padom u nivou vitamina D. Takođe, u načelu, grupa ispitanika označena kao II (na drugoj kontroli) ne dovodi do značajnijeg pada nivoa vitamina D.

Posmatranjem formiranih podgrupa možemo zaključiti da je progresija I 0,2-4 i I > 4 povezana sa nižim nivoom vitamina D. Kod ispitanika u podgrupi II 0,2-4 postoji statistički slaba povezanost između nivoa vitamina D i progresije, dok se za grupu II > 4 ovakva korelacija ne može ustanoviti. U grupi II postoji veća greška ocene za kategorije kasnijih progresija, u kojima ima manje ispitanika. Razlike između podgrupa pacijenata sa progresijom nisu značajne.

Tabela 18. Nivo vitamina D u slučaju progresije prilikom prve ili druge kontrole u zavisnosti od nivoa PSA

	Nivo vitamina D	Std. greška ocene	t vrednost	p
bez progresije	78.978	4.466	17.684	< 0.001
I 0,2-4	-18.967	5.470	-3.467	0.001
I > 4	-21.599	6.773	-3.189	0.002
II 0,2-4	-17.930	7.948	-2.256	0.028
II > 4	-7.215	9.207	-0.784	0.437

Grafikon 14. Nivo vitamina D u slučaju progresije prilikom prve ili druge kontrole u zavisnosti od nivoa PSA



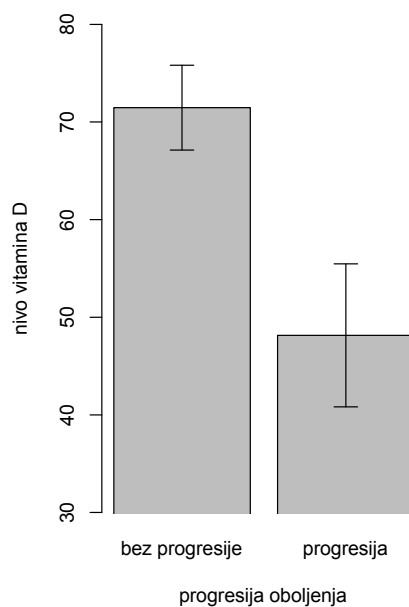
Grafikon 14 pokazuje da je pad nivoa veći prilikom prve kontrole u odnosu na drugu kontrolu.

Sličan odnos postoji i kod pacijenata iz grupe BP, ali je pad nivoa vitamina D nešto manji, odnosno slabije značajnosti (Ocena = -20.929; Std. greška ocene = 8.958; t = -2.336; p



= 0.027). I ponovo se uočava veća greška ocene za podgrupu pacijenata sa progresijom (Grafikon 15).

Grafikon 15. Nivo vitamina D u slučaju progresije prilikom prve i druge kontrole



## **6. Diskusija**

### **6.1. Nivo vitamina D kod kontrolne grupe (Z)**

Da bi se ustanovilo da li nivo vitamina D u grupi Z korelira sa nivoom vitamina D u literaturi rezultati ove analize komparirani su sa drugim istraživanjima kojima je definisan nivo vitamina D kod muškaraca starijih od 50 godina, rezidenata područja oko 45° geografske širine.

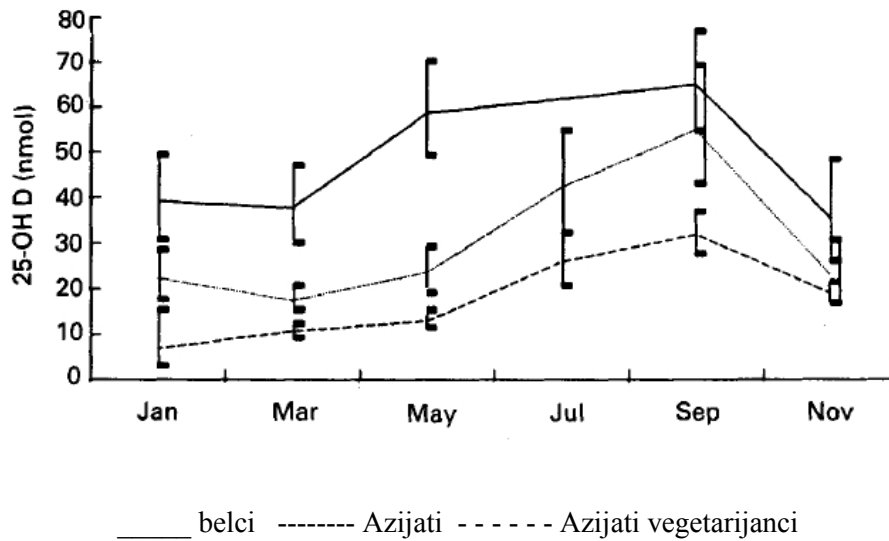
Postoji veliki broj studija koje su se bavile ispitivanjem nivoa vitamina D u opštoj populaciji. Orwoll i saradnici su 2009. proučavali nivo vitamina na teritoriji Severne Amerike i ustanovili da je srednja vrednost vitamina D 62,75nmol/l (SD = 19.8). Ukupno 28.6% ispitanika je imalo vrednosti vitamina D manje od 50 nmol/l, tj. bilo je deficitarno (222). Analizom rezultata ispitanika uključenih u treći National Health and Nutrition Examination Survey (NHANESIII) i NHANES 2001-2004 Ginde i saradnici su 2009. godine ustanovili da je prosečan nivo vitamina D 60 nmol/l, takođe su primetili da se broj ispitanika sa vrednostima manjim od 25 nmol/l povećao sa 2 na 6 % u odnosu na ranija istraživanja (223). Druge studije su pokazale da se nivo vitamina D kreće oko 70 nmol/l (99,224).

Aritmetička sredina nivoa vitamina D u ovom ispitivanju u grupi Z je 74.45 (CI 95% = 72.31 do 76.59). Na osnovu poređenja rezultata ovog istraživanja i rezultata drugih studija možemo konstatovati da ispitanici u grupi Z imaju nivo vitamina D koji ne odstupa od vrednosti u literaturi.

### **6.2. Uticaj insolacije na vrednosti vitamina D - sezonska oscilacija nivoa vitamina D**

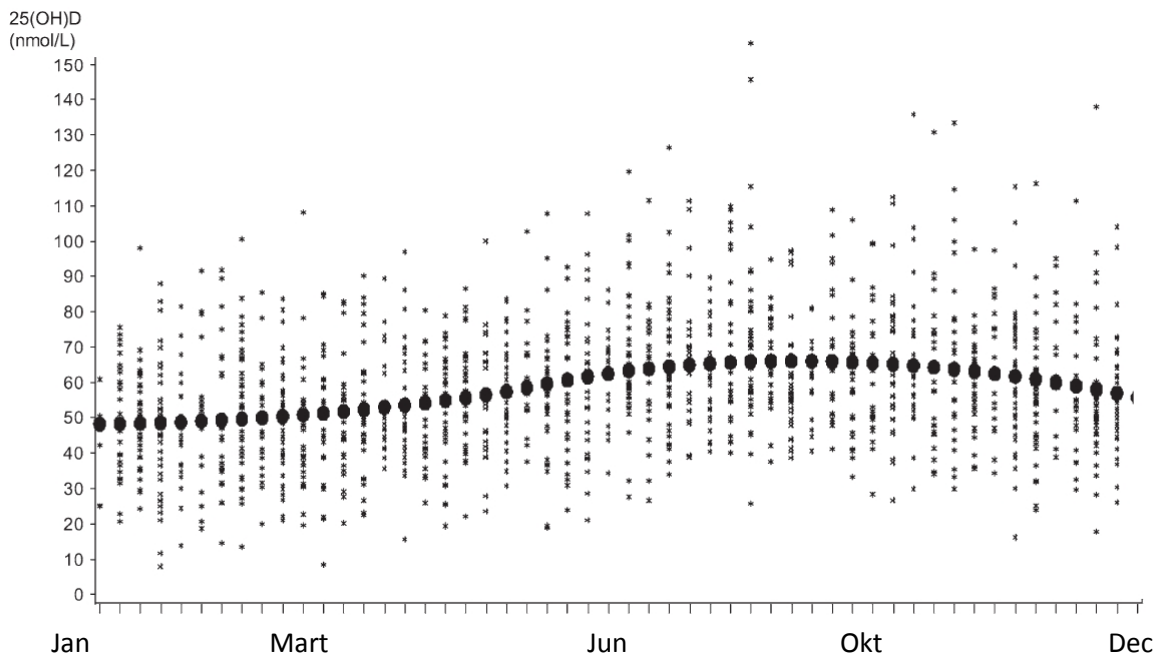
Sinteza vitamina D u koži je pod uticajem insolacije. Istraživanja koja su se bavila ispitivanjem oscilacije nivoa vitamina D na geografskoj širini 44 -46 ° ustanovila su da postoji promena koncentracije vitamina D u serumu u zavisnosti od godišnjeg doba. U periodu 10. – 04. meseca nema dovoljno UVB zračenja koje bi dovelo do formiranja adekvatne količine vitamina D u koži. Zato se u opštoj populaciji može uočiti fiziološka oscilacija nivoa vitamina D sa vrednostima koje su najviše tokom 9. i 10. meseca (posle perioda najjače insolacije), nakon čega postepeno opadaju te se najniže vrednosti mogu uočiti u 3. mesecu. Ispitivanje koje je sproveo Maxwell kod belaca, Azijata i Azijata vegetarijanaca predstavljeno je grafikonom 16 (225).

Grafikon 16. Sezonska oscilacija vitamina D (Corder i saradnici)



Corder i saradnici su ustanovili da kod pacijenata kod kojih je dijagnostikovano karcinom prostate postoji anualna oscilacija nivoa vitamina D, te su ovom činjenicom pokušali da objasne druge studije u kojima istraživači nisu dobili korelaciju između nivoa PSA i vitamina D (226). Ahn i saradnici su takođe uočili postojanje sezonske oscilacije nivoa vitamina D kod pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate (grafikon 17)(143).

Grafikon 17. oscilacija nivoa vitamina D kod pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom prostate (Ahn i saradnici)



Analizom nivoa vitamina D kod svih ispitanika (Z, BP, BH, BK) uočeno je da u ovom ispitivanju takođe postoji godišnja oscilacija nivoa vitamina D (grafikon 5). Od 4. meseca dolazi do postepenog porasta nivoa, najviše vrednosti su u 9. mesecu nakon čega nivo vitamina D postepeno počinje da opada, te se najniže vrednosti mogu uočiti u 3. mesecu.

Poređenjem rezultata ovog ispitivanja i rezultata u literaturi uočavamo da postoji visok stepen podudarnosti. Možemo zaključiti da u ovom ispitivanju postoji očuvana sezonska oscilacija vrednosti vitamina D kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma prostate.

### **6.3. Nivo vitamina D u grupama ispitanika**

Vitamin D pokazuje antiproliferativno, proapoptotsko i prodiferencijaciono dejstvo te je postavljena hipoteza da će nivo vitamina D biti viši kod pacijenata koji imaju lokalizovanu bolest u odnosu na pacijente koji imaju metastatsko oboljenje. Kod pacijenata u kontrolnoj grupi očekuje se da će nivo vitamina D biti najviši. Pregledom literature uočen je veliki broj studija koje su proučavale odnos nivoa vitamina D i adenokarcinoma prostate. Rezultati ovih studija nisu konzistentni, neke pokazuju pozitivnu dok druge ukazuju na postojanje negativne korelacije.

Neposredno nakon postavljanja prve hipoteze koja je ukazala na postojanje povezanosti između nivoa vitamina D i adenokarcinoma prostate Corder i saradnici su 1993. godine posmatrali 181 pacijenta sa dijagnostikovanom adenokarcinomom prostate. Ispitivali su nivo  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i našli da najveća verovatnoća za razvoj adenokarcinoma prostate postoji kod niskih vrednosti oba merena parametra. Vrednosti samog  $25(\text{OH})\text{D}_3$  nisu bile statistički značajno različite između ispitanika i kontrolne grupe pacijenata (165).

Ahonen i saradnici su u studiji završenoj 2000. godine ispitivali povezanost vitamina D i adenokarcinoma prostate kod 19000 pacijenata koje su pratili tokom 13 godina. Ustanovili su da postoji inverzan odnos između nivoa vitamina D i PSA, tj. da su pacijenti sa nivoom vitamina D ispod medijane imali relativni rizik za nastanak oboljenja 1.7 (za nivo vitamina D  $< 30 \text{ nmol/l}$ ) i 1.3 (za nivo vitamina D  $31 - 40 \text{ nmol/l}$ ) u odnosu na pacijente koji su imali vrednost iznad medijane. Takođe su indentifikovali grupu pacijenata koji su oboleli u ranijoj životnoj dobi ( $< 52$  godine). U ovoj grupi ispitanika nivo vitamina D je bilo niži. Preme ovom istraživanju, kod ispitanika mlađih od 52 godine, relativni rizik za nastanak oboljenja je 3.5 a

rizik za razvoj uznapredovale bolesti 6.3. Pacijenti u ovoj grupi su imali srednju vrednost izmerenih nivoa vitamina D od 37.1 nmol/l (SD 15nmol/l, range 13 – 80 nmol/l). Prema stepenu proširenosti oboljenja formirane su još dve podgrupe:

- Pacijenti sa lokalizovanim adenokarcinomom prostate
- Pacijenti sa uznapredovalim adenokarcinomom prostate

Kod pacijenata sa lokalizovanim oboljenjem srednja vrednost nivoa vitamina D je bila viša (38.3nmol/l, SD = 14.4), dok je kod pacijenata sa uznapredovalim karcinomom prostate srednja vrednost nivoa vitamina D bila niža (32.7 nmol/l, SD = 14.5) (166).

Nivo vitamina D kod pacijenta sa dijagnostikovanim karcinomom prostate odredio je i Tretli u studiji iz 2009. godine kod 160 pacijenata koji su donirali serum u JANUS banku. Studija je analizirala odnos nivoa vitamina D i ishoda bolesti u dve grupe ispitanika:

- Sa lokalizovanim adenokarcinomom prostate
- Sa metastatskim adenokarcinomom prostate

Aritmetička sredina nivoa vitamina D u ovoj studiji je 72.0 nmol/l ( range 19 –162). Ukoliko je izmeren nivo vitamina D bio od 50 do 80 nmol/l i veći od 80 nmol/l kod pacijenata sa lokalizovanim oboljenjem postojala je bolja prognoza (RR 0.33; 95% CI = 0.14–0.77, RR 0.16; 95% CI = 0.05–0.43) u odnosu na pacijente koji su imali nivo vitamina D ispod 50 nmol/l. Kod pacijenata sa metastatskim oboljenjem korelacija je bila jača (227).

U studiji iz 2004. godine Tuohimaa i saradnici su posmatrali nivo 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kod 622 pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom prostate i poredili dobijene vrednosti sa 1451 kontrolom. Ustanovili su da se veća verovatnoća za javljanje karcinoma prostate može uočiti kod niskog nivoa vitamina D ( $\leq 19$  nmol/l) ali i kod visokog nivoa vitamina D ( $\geq 80$  nmol/l). Korelacija je pokazivala „U shape“ krivu. Nalaz veće učestalosti adenokarcinoma prostate kod pacijenata sa nižim nivoom vitamina D je saglasan sa nalazom Ahonena i drugih istraživača, dok se podatak o većoj verovatnoći za razvoj adenokarcinoma prostate pri visokom nivou vitamina D prvi put nalazi u ovom istraživanju. Istraživači su dali sledeće objašnjenje za ovu korelaciju između vitamina D i adenokarcinoma prostate: hrana bogata vitaminom D sadrži i visok nivo vitamina A koji ima antagonističko dejstvo. Drugo objašnjenje je da visok nivo vitamina D aktivira 24 hidroksilazu, te i pored visokog nivoa dolazi do brze inaktivacije i izostanka fiziološkog dejstva (169).

U istraživanju koje je sproveo Platz sa saradnicima, završenom 2004. godine, ispitivano je 460 pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarinomom prostate u okviru Health Professionals Follow-up Study i poređeno sa zdravim subjektima. U ispitivanje su uključeni pacijenti sa lokalizovanim, lokalno uznapredovalim i metastatskim oboljenjem. Nivo 25(OH)D<sub>3</sub> bio je neznatno viši kod pacijenata sa lokalizovanim i lokalno uznapredovalim oboljenjem, bez statističke značajnosti ( $p = 0.2$ ). Kod pacijentata sa metastatskim oboljenjem nije uočena statistički značajna korelacija između nivoa vitamina D i posmatranog oboljenja ukoliko su posmatrani stadijum i Gleason grade posebno ili kombinovano. U ovoj studiji nije ustanovljeno postojanje povezanosti između nivoa 25(OH)D<sub>3</sub> i adenokarcinoma prostate (172).

U okviru Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO) Ahn i saradnici su ispitivali nivo vitamina D kod 1200 pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate u lokalizovanom i uznapredovalom stadijumu. Aritmetička sredina vrednosti nivoa vitamina D je 55.9 nmol/l. Postojala je jasno izražena anualna oscilacija ispitivanog parametra, uz najviši nivo u uzorcima prikupljenim tokom leta i jeseni. Analiza nivoa vitamina D prema kvintilama nije pokazala da povećanje kvintile nosi i povećan rizik od razvoja karcinoma prostate. U ovom ispitivanju je konstatovano i postojanje pozitivne korelacije između nivoa vitamina D i razvoja agresivne forme bolesti. Sa porastom kvintile uočeno je da se povećava i broj agresivnih karcinoma prostate (Gleason  $\geq 7$ , stadijum III i IV) (143).

Na osnovu podataka iz literature možemo konstatovati da ne postoji definisan nivo vitamina D koji bi se mogao uzeti kao granični, tj. povezati sa povećanom učestalošću adenokarcinoma prostate. Većina studija sugeriše da se pri niskom nivou vitamina D ( $< 40$  nmol/l) javlja povećana učestalost adenokarcinoma prostate. Pored „U“ shape distribucije možemo konstatovati da postoje i studije koje ukazuju na postojanje pozitivne korelacije između posmatranih parametara.

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da je aritmetička sredina nivoa vitamina D u grupi obolelih (kombinovao BH, BK, BP) 64.12 nmol/l (CI 95% =62.26 do 65.98). Bilo da su grupe obolelih pacijenata posmatrane kombinovano ili pojedinačno možemo konstatovati da su sve tri grupe obolelih bile vitamin D insuficijentne. Posmatrano pojedinačno grupe BH, BK, BP imaju nivo vitamina D:

Tabela 19. nivo vitamina D u grupama obolelih

	BH	BK	BP
nivo vitamina D	63.83	65.63	62.90
SD	18.87	15.03	20.02

Druge studije koje su se bavile ovom problematikom uočile su da nivo vitamina D koji korelira sa povećanom incidencom adenokarcinoma prostate znatno varira (tabela 20). Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da pacijenti sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate nemaju apsolutno niske vrednosti vitamina D.

Tabela 20. Nivo vitamina D u studijama koje ukazuju na povezanost sa razvojem adenokarcinoma prostate

autori	nivo vitamina D (nmol/l)	RR	aritmetička sredina (nmol/l)
Ahonen i saradnici	< 30	1.7	
	31 – 40	1.3	
Tretli i saradnici	<50	1	72
	50 – 80	0.33	
	>80	0.16	
Tuhimaa i saradnici	≤19	1.5	
	20 -39	1.3	
	40 – 59 (ref.)	1	
	60 -79	1.2	
	≥ 80	1.7	
Anh i sardnici	<42.5	1	55.9
	42.5 – 51.3	1.12	
	51.4 - 60.5	1.61	

	60.6 – 71.7	1.41	
	>71.8	1.32	

RR - relativni rizik, ref. – referentna vrednost

Kako nisu uočeni apsolutno niski nivoi u grupama obolelih ispitanika posmatrani su relativni odnosi nivoa vitamina D između grupa. Rezultati jednosmerne analize varijanse potvrđuju da je nivo vitamina D kod grupe Z (74.45 nmol/l) statistički značajno viši ( $p = 0.006$ ) u odnosu na grupu obolelih (kombinovano BH, BK, BP - 64.12 nmol/l).

Između grupa obolelih nisu postojale statistički značajne razlike u nivou vitamina D.

Grupa ispitanika BH i BK, koju sačinjavaju pacijenti sa metastatskim adeokarcinomom prostate nema statistički značajno odstupanje u nivou vitamina D u odnosu na BP, te se može zaključiti da između grupa ispitanika sa metastatskim i lokalizovanim oboljenjem ne postoji statistički značajna razlika u nivou vitamina D.

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da grupa obolelih nema apsolutno niske vrednosti nivoa vitamina D, već da postoji statistički značajna razlika u nivou vitamina D između obolelih i kontrolne grupe. Razlike između pojedinih grupa obolelih nisu ustanovljene ovom analizom.

Postavljena hipoteza da će kod pacijenata sa dijagnostikovanim metastatskim karcinomom prostate nivo vitamina D biti niži nego kod pacijenta sa lokalizovanim oboljenjem nije tačna. Hipoteza da će ispitanici u kontrolnoj grupi (Z) imati viši nivo vitamina D nego oboleli ispitanici je tačna. Može se zaključiti da ispitanici sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate imaju nižu vrednost vitamina D u odnosu na zdrave subjekte, bez uticaja stadijuma bolesti na nivo vitamina D.

#### **6.4. Nivo vitamina D prema nivou PSA**

Granični nivo PSA koji je ranije bio široko prihvaćen u dijagnostici i praćenju adenokarcinoma prostate u više navrata je menjan. Danas se smatra da je PSA kontinualni parametar tj. da se adenokarcinom prostate može javiti i pri niskom nivou PSA. Dvadeset sedam procenata pacijenata sa nivoom PSA nižim od 4 ng/ml ima karcinom prostate od kojih će 6,7% imati Gleason  $\geq 7$ , što ukazuje na postojanje klinički značajnih adenokarcinoma



prostatae pri niskom nivou PSA. Pretragom literature ustanovili smo da postoji mali broj studija koji se bavi korelacijom PSA i nivoa vitamina D.

Salama i saradnici su u ispitivanju u okviru European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) ustanovili da postoji pozitivna korelacija između insolacije i nivoa PSA tj. da se viši nivo PSA javlja u mesecima sa više insolacije. Zaključili su da čak 23% biopsija leti može biti uzrokovano ovom oscilacijom. (138).

Ispitivanja na ćelijskim linijama karcinoma prostate su pokazala da vitamin D stimuliše ekspresiju PSA zavisnih gena uz pomoć translokacije androgenog receptora iz citosola u jedno. Takođe je uočeno da povišen nivo vitamina D dovodi do povećanja ekspresije mRNK - PSA do 2.5 puta, što jasno ukazuje da je povišen nivo PSA posledica translokacije androgenog receptora, njegove interakcije sa DNK i konsekvantne transkripcije mRNK -PSA. Vitamin D deluje na pojačanu ekspresiju androgenog receptora. Da bi se aktivirali odgovarajući geni pored androgenog receptora neopodan je i testosteron. Ukoliko nema testosterona porast nivoa vitamina D ne dovodi do porasta vrednosti PSA (228,229,230).

Vieth i saradnici su ispitivali odnos vitamina D i porasta PSA kod pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate (nizak i srednji rizik prema D'Amicovim kriterijumima). Posmatrani period (godinu dana) podelili su na kvartale (Q1, Q2, Q3, Q4). Najveća insolacija zabeležena je tokom Q2 perioda. Ustanovljeno je da Q2 ima statistički značajno nižu stopu porasta PSA, bez statistički značajne razlike u porastu nivoa PSA između ostalih posmatranih kvartala. Zaključili su da postoji značajan uticaj vitamina D na nivo PSA (231).

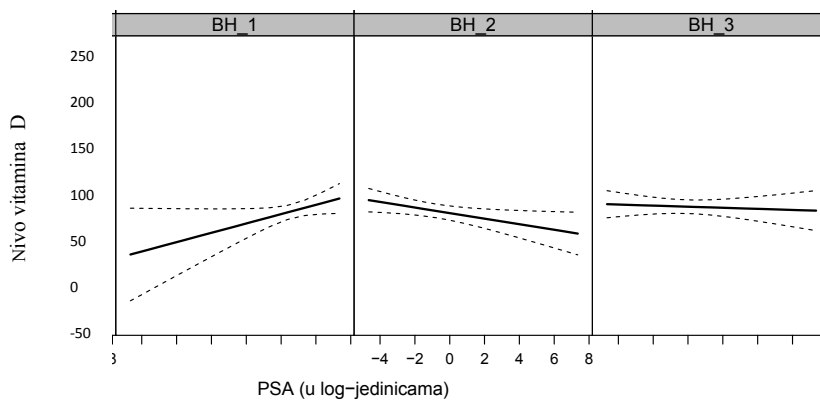
Ispitivanje koje se bavilo određivanjem korelacije između vitamina A, E, D, a sprovedeno u okviru Prostate Testing for Cancer and Treatment ( ProtecT) studije, nije ustanovilo postojanje povezanosti između nivoa vitamina D i PSA (232).

Malobrojni rezultati u literaturi daju različite podatke o korelaciji nivoa vitamina D i PSA.

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da, ukoliko se posmatraju dobijeni rezultati za sve ispitanike (Z, BP, BH, BH) nakon isključivanja uticaja insolacije, postoji negativna korelacija između nivoa vitamin D i PSA ( $r = -0.114$ ;  $t = -2.178$ ;  $p = 0.030$ ). Korelacija je prikazana na grafikonu 10.

Da bi se ustanovio stepen korelacije između vitamina D i PSA pre i nakon ordinirane terapije posmatrane su sve četiri grupe u sva tri merenja. Kod ispitanika u grupi pacijenata BH (hirurški kastrirani) na inicijalnom merenju postoji pozitivan odnos između posmatranih parametara pre ordinirane terapije (grafikon 18 – BH\_1). Ovakva korelacija je u skladu sa podacima u literaturi da između PSA i vitamina D postoji pozitivna korelacija. Vitamin D ima ulogu u translokaciji androgenog receptora u jedro nakon čega u slučaju prisustva androgena dolazi do porasta PSA (227). Nakon ordinirane terapije (hemijska kastracija) pacijenti nisu imali androgene te je dejstvo kompleksa androgeni receptor/androgen izostalo. Kod ove grupe ispitanika nakon androgene ablacije uočena je negativna korelacija između vitamina D i PSA (grafikon 18 BH\_2 i 3).

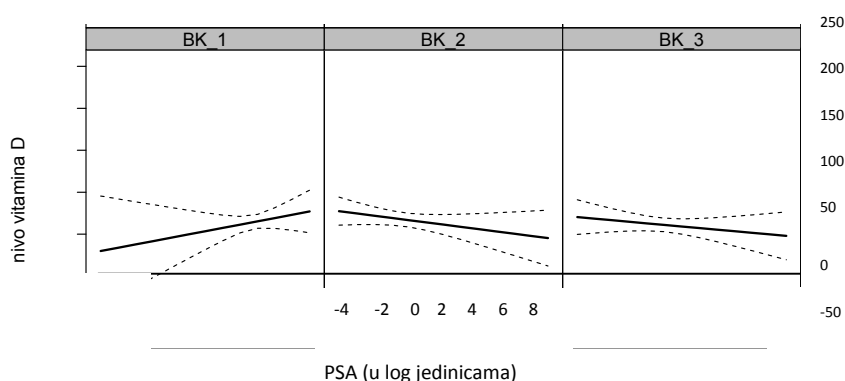
Grafikon 18. Odnos nivoa vitamina D i PSA kod grupe BH, pre i nakon terapije



\* isprekidana linija – 95% interval poverenja

Kod pacijenata iz grupe BK (medikamentozno kastrirani) pre ordinirane terapije postoji pozitivna korelacija između vitamina D i PSA (grafikon 19 BK\_1). Isto kao i kod prethodne grupe nakon ordinirane terapije, tj. nakon androgene ablacije, dolazi do promene u odnosu nivoa vitamina D i PSA koji dobija karakteristike negativne korelacije (grafikon 19 BK\_2, BK\_3). Ovakva korelacija je takođe u skladu sa podacima u literaturi koji govore da vitamin D deluje na povećanje vrednosti PSA samo u slučaju prisustva androgena.

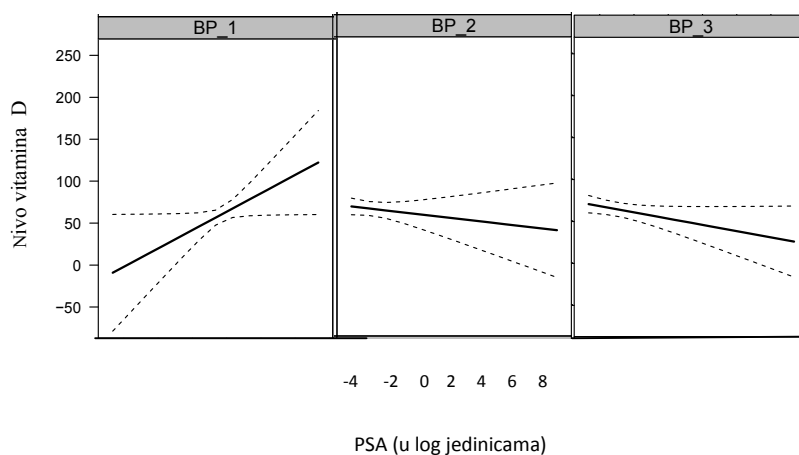
Grafikon 19. Odnos vrednosti vitamina D i PSA kod grupe BK, pre i nakon terapije



\* isprekidana linija – 95% interval poverenja

Grupa ispitanika BP pokazuje sličnu korelaciju između vrednosti nivoa vitamina D i PSA iako pacijenti i nakon terapije imaju očuvanu androgenu sekreciju. Možemo konstatovati da pre ordinirane terapije postoji pozitivna korelacija (grafikon 20 BP\_1), nakon ordinirane terapije postoji negativna korelacija u oba merenja (grafikon 20 BP\_2, BP\_3).

Grafikon 20. Odnos vrednosti vitamina D i PSA kod grupe BP, pre i nakon terapije

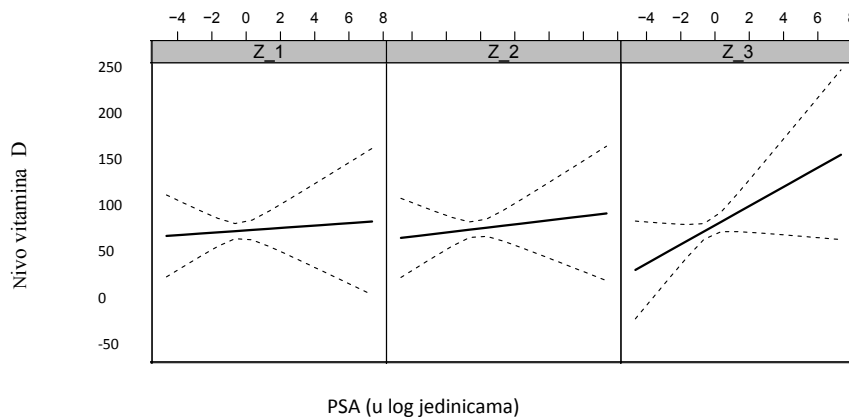


\* isprekidana linija – 95% interval poverenja

U sve tri grupe obolelih (BP, BH, BK) pre ordiniranja terapije postoji pozitivna korelacija između nivoa vitamina D i PSA pre lečenja. Ordiniranje terapije (bilo da je u pitanju medikamentozna, hirurška kastracija ili radikalna prostatektomija) predstavlja faktor koji kod sve tri grupe dovodi do promene korelacije u negativnu.

Grupa u kojoj su bili zdravi ispitanici pokazuje postojanje pozitivne korelacije između nivoa vitamina D i nivoa PSA u sva tri merenja (grafikon 21). Nalaz za grupu zdravih je u saglasnosti sa drugim studijama u kojima postoji pozitivna korelacija između ispitivanih parametara (226,143,99,224)

Grafikon 21. Odnos vrednosti vitamina D i PSA kod grupe Z



\* isprekidana linija – 95% interval poverenja

Činjenica da u grupi Z u sva tri merenja postoji pozitivna korelacija dalje ukazuje na uticaj vitamina D na endonuklearnu translokaciju AR i, uz prisustvo androgena, na uticaj na povećanje nivoa PSA.

### 6.5. Nivo vitamina D prema Gleason grade i scor

Gleason grade i scor predstavljaju stepen dediferenciranosti ćelija adenokarcinoma prostate. Više vrednosti Gleason scora predstavljaju agresivniju bolest, tako da možemo očekivati niži nivo vitamina D pri višim vrednostima Gleason grade i scor.

Fang i saradnici su u studiji završenoj 2011. godine posmatrali 1822 ispitanika sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate u okviru Health Professionals Follow-up Study i Physicians' Health Study ustanovili da su pacijenti sa najnižom kvartilom vs. najvišom kvartilom 25(OH)D<sub>3</sub> nivoa vitamina D imali veću verovatnoću letalnog ishoda (HR: 1.59; 95% CI: 1.06, 2.39) (233).

Gilbert i saradnici su u studiji objavljenoj 2012. godine odredili stepen povezanosti između nivoa vitamin D i PSA u okviru ProtecT studije. U ovoj prospektivnoj case - control studiji uključeno je 1500 obležih i isto toliko kontrola kod kojih je dijagnostikovan

lokalizovan (T1,2) ili lokalno uznapredovali (T2,3) karcinom prostate. Prema Gleason scor formirane su dve grupe:

- visok Gleason scor  $\geq 7$
- nizak Gleason scor  $< 7$

Ova studija je pokazala da postoji inverzna korelacija između Gleason scor – a i nivoa vitamina D. Kod pacijenata koji su bili vitamin D deficijentni verovatnoća za Gleason scor  $\geq 7$  bila je 1.78 puta veća nego kod vitamin D suficijentnih ispitanika (95% CI = 1.15, 2.77 ). Studija je takođe pokazala da kod pacijenata koji su vitamin D deficijentni postoji 2.33 puta veća verovatnoća za razvoj lokalno uznapredovale bolesti (95% CI = 1.26, 4.28) (138).

Barnett i saradnici su tokom ispitivanju nivoa vitamina D u okviru Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) kod 297 ispitanika koji su imali incidentalno otkriven adenokarcinom prostate posmatrali odnos vitamina D i Gleason scora. Prema Gleason scoru pacijenti su podeljeni u dve grupe :

- nizak Gleason scor  $< 7$
- visok Gleason scor  $\geq 7$

Nije uočen trend u kvartilama vitamina D, što je prikazano u tabeli 21.

Tabela 21. Korelacija nivoa vitamina D i Gleason scora

		nivo vitamina D (nmol/l)			
		3.1–19.9	20.0–24.9	25.0–29.9	30–75.6
HIR (95% CI)	Gleason scor $< 7$	1	1.37 (0.83–2.26)	0.79 (0.45–1.38)	1.52 (0.93–2.47)
	Gleason scor $\geq 7$	1	1.33 (0.83–2.16)	0.74 (0.43–1.27)	1.07 (0.65–1.75)

Ispitivanje nije rezultiralo statistički značajnom interakcijom između vitamina D i Gleason scora (173).

Ispitivanje koje je sproveo Albanes sa saradnicima u okviru  $\alpha$  tokoferol,  $\beta$  karoten (ATBC) studije dalo je rezultate koji su ukazivali na postojanje povišene vrednosti vitamina D kod pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate. Takođe su uočili da se

kod pacijenata sa višim nivoom vitamina D češće javlja viši Gleason scor i viši stage. Verovatnoća za Gleason > 7 prema nivou vitamina D prikazana je u tabeli 22:

Tabela 22. OR i 95% CI za verovatnoću Gleason scora > 7

I	II	III	IV	V	P <sub>trend</sub>
1.00	1.28	1.34	1.59	1.70	0.02
95% CI	(0.82–2.01)	(0.85–2.09)	(0.98–2.60)	(1.05–2.76)	

Zaključak ove studije je da kod pacijenata sa višim nivoom vitamina D postoji veća šansa za razvoj adenokarcinoma prostate sa većim Gleason scor –om (234).

Ahn i saradnici su u pomenutoj studiji u okviru PLCO studije ispitivali i povezanost između nivoa vitamina D i Gleason scora. Grupe su formirane prema Gleason scor i TNM stadijumu:

- nizak Gleason scor < 7 i TNM stadijum I ili II
- visok Gleason scor  $\geq 7$  i TNM stadijum III ili IV

Nivo vitamina D nije bio povezan sa razvojem lokalizovanog i diferenciranog tipa oboljenja (nizak Gleason scor < 7 i TNM stadijum I ili II). Nivo vitamina D veći on najmanje kvintile bio je povezan sa razvojem agresivnije i uznapređovalije bolesti (Gleason scor  $\geq 7$  i TNM stadijum III ili IV). Ova povezanost je ustanovljena ukoliko su dva parametra posmatrana kombinovano ili separatno. Nakon modifikacije kriterijuma za uznapređovalu bolest (Gleason  $\geq 8$ , TNM stadijum III ili IV) korelacija je ostala nepromenjena. Dalja analiza modela koji je isključio uticaj insolacije, unosa kalcijuma, godina starosti, pozitivne porodične anamneze takođe nije rezultirala promenom dobijene korelacije (143).

Ahonen i saradnici su kod ispitanika iz Helsinki Heart Study hipotetisali sa odnosom nivoa vitamina D i Gleason scor. Pacijenti su podeljeni u grupu sa lokalizovanim i uznapređovalim oboljenje, bez više odrednica o stadijumu ili Gleason scor - u. Rezultati ispitivanja su pokazali da se kod pacijenata kod kojih je oboljenje dijagnostikivano u mladoj životnoj dobi (< 52 godine) i nižim vrednostima vitamina D postoji veća verovatnoća za razvoj uznapređovalog adnokarcinoma prostate (OR 6.3) (166).

Li i saradnici su u studiji koja je analizirala pacijente iz Physicians' Health Study (PHS) posmatrali nivo vitamina D kod pacijenata sa dijagnostikovanom karcinomom prostate. Korisili su Gleason scor i Whitmore-Jewett staging sistem da bi korelirali ispitivane parametre. Grupe su formirane na sledeći način:

- indolentna bolest (Gleason scor  $\leq 6$  ili Whitmore-Jewett stadijum A i B)
- agresivna bolest (Gleason scor  $\geq 7$  ili Whitmore-Jewett stadijum C i D)

Rezultati studije pokazali su da postoji inverzna korelacija između nivoa vitamina D i višeg stadijuma Gleason scora. Ukoliko je nivo vitamina D bio ispod 80 nmol/l u periodu sa više insolacije ili ispod 60 nmol/l u periodu sa manje insolacije OR za razvoj agresivnog oblika oboljenja iznosi 2.06 (95% CI = 1.24–3.43). Kod pacijenata starijih od 65 godina korelacija je bila još izraženija OR 2.47 (95% CI = 1.29 – 75) (235).

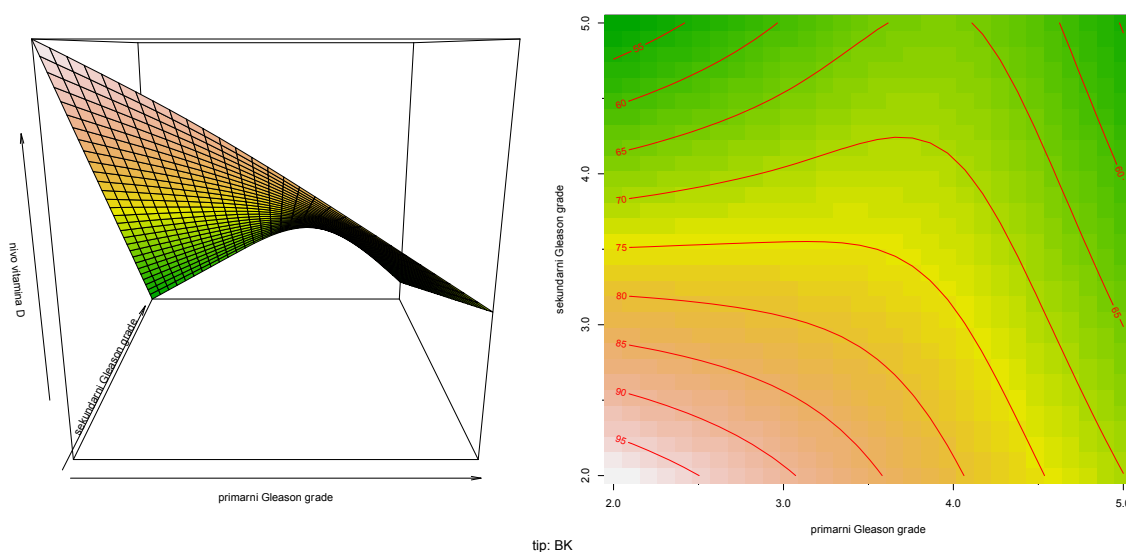
Kod ispitanika uključenih u Health Professionals Follow-up Study Platz i saradnici su analizirali 460 pacijenata. Devedeset i dva procenta ispitanika su imali lokalizovanu bolest (T1b – T3a), ostali pacijenti su imali uznapredovalu bolest. Nije ustanovljena statistički značajna korelacija između nivoa vitamina D i Gleason grade i scor. Modeli koji su uključili i rizikofaktore (pozitivna porodična istorija, godine starosti prilikom dijagnoze i dr.) nisu doprineli uspostavljanju korelacije između ispitivanih parametara (172).

Evidentno je da rezultati studija koje su do sada objavljene ne daju jednosmislene nalaze vezane za stepen povezanosti nivoa vitamina D i Gleason grade i scor – a. Na osnovu dela prezentovanih seroloških studija i in vitro studija koje ukazuju na antiproliferativno, proapoptotsko i prodiferencijaciono dejstvo vitamina D kao polaznu tačku ispitivanja uzeli smo pretpostavku da agresivnije forma adenokarcinoma koreliraju sa nižim vrednostima vitamina D.

U ovoj analizi korišćena je višestruka regresiona analiza radi određivanja odnosa između ispitivanih parametara. Analiza je pokazala statistički značajne osnovne efekte primarnog, sekundarnog Gleason grade i vitamina D kao i njihovu statistički značajnu interakciju. Rezultati su prikazani pomoću generalizovanih aditivnih modela. Interakcija primarnog i sekundarnog Gleason grade prikazana je kao proizvod tenzora, koji daje najprirodnije procene združenog uticaja numeričkih prediktora na numerički kriterijum. Dodatno, pomenuti združeni efekat posmatran je posebno za svaki tip pacijenata.

Tabela 15 prikazuje interakciju vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleason grade. Za grupu ispitanika BK i BP interakcija postoji ali je statistički marginalno značajna ( $p = 0.55$ ,  $p = 0.65$ ). Za grupu ispitanika BH postoji statistički značajna povezanost interakcije primarnog i sekundarnog Gleason grade i uticaj na nivo vitamina D ( $p = 0,001$ ). Grafičkim prikazom dobijenih podataka dobija se jasnija slika o interakciji primarnog i sekundarnog Gleason grade i uticaju na vrednost vitamina D.

Grafikon 22. Interakcija vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleason grade grupa BK

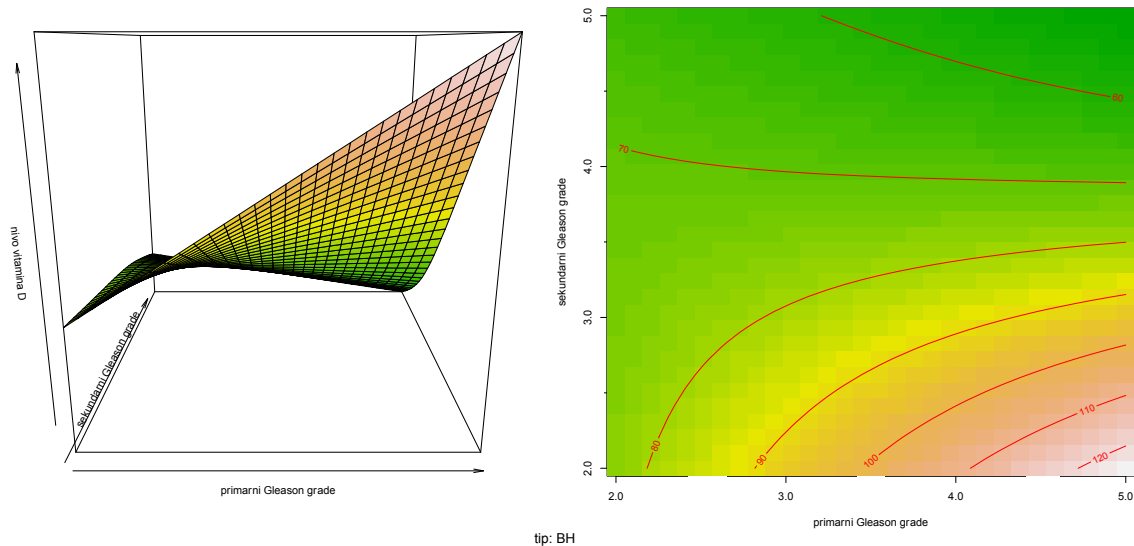


Statistička analiza rezultata grupe BK pokazala je da je efekat interakcije između vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleason grade i samo marginalni. Ukoliko posmatramo izolovane vrednosti primarnog i sekundarnog Gleason grade uočavamo da se sa porastom oba parametra smanjuje nivo vitamina D. Takođe se uočava da porast vrednosti sekundarnog Gleason grade dovodi do većeg pada nivoa vitamina D nego porast vrednosti primarnog Gleason grade (grafikon 22). Nivo vitamina D je najviši kada su i primarni i sekundarni Gleason grade na najnižim vrednostima. Najizraženiji pad nivoa vitamina D se uočava kada primarni Gleason grade ima nisku vrednosti uz porast sekundarnog Gleason grade. Za srednje vrednosti primarnog Gleason grade, promene u vrednosti sekundarnog Gleason grade pokazuju neznatno niži nivo vitamina D. Kod visokih vrednosti primarnog Gleasona grade sa povećanjem vrednosti sekundarnog Gleason grade nivo vitamina D opada. Hipoteza vezana za odnos vitamina D i Gleason grade pretpostavlja da postoji inverzan odnos između nivoa vitamina D i Gleason grade. Analiza dobijenih rezultata ukazuje da postoji statistička



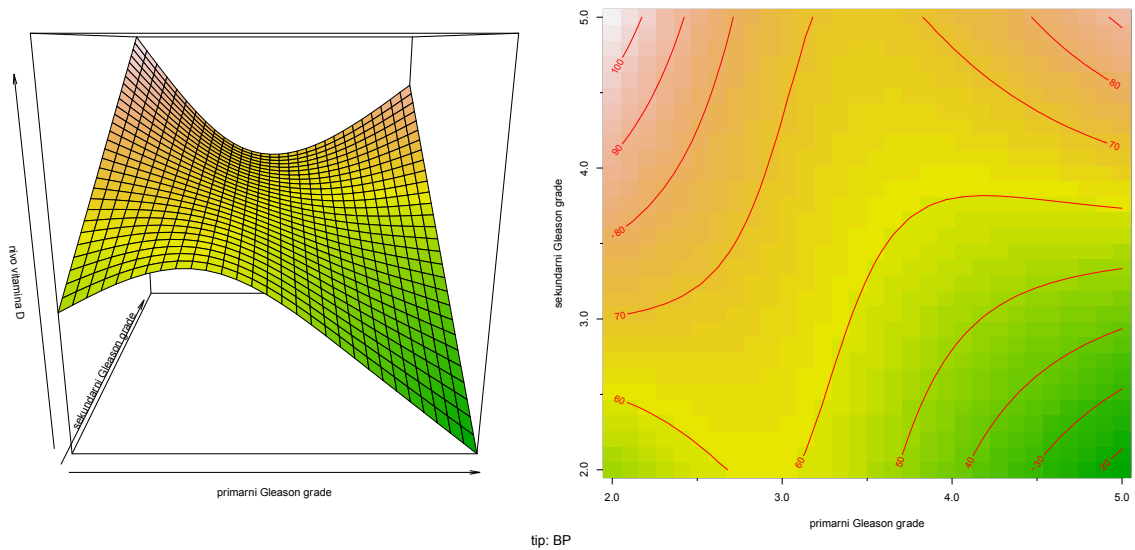
povezanost između ispitivanih parametara u grupi BK ali da je marginalno značajna ( $p = 0.065$ ).

Grafikon 23. Interakcija vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleason grade grupa BH



Grafikon 23 prikazuje interakciju između vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleasona grade u grupi BH. Ukoliko posmatramo primarni i sekundarni Gleason grade separatno, uočavamo da se sa porastom primarnog Gleason grade povećava nivo vitamina D, dok se sa porastom sekundarnog Gleason grade nivo smanjuje. Nalaz da se sa porastom sekundarnog Gleasona nivo vitamina D smanjuje u saglasnosti je sa nalazom u grupi BK. Međutim nalaz da se sa porastom vrednosti primarnog Gleason grade nivo vitamina D povećava u suprotnosti je sa nalazima u grupi BK i sa postavljenom hipotezom. Ukoliko je vrednosti primarnog Gleason grade niska sa povećanjem vrednosti sekundarnog Gleason grade neznatno se smanjuje nivo vitamina D. U slučaju kada se posmatra srednja i visoka vrednost primarnog Gleason grade sa povećanjem sekundarnog Gleason grade nivo vitamina D opada. Nalaz da prilikom porasta sekundarnog Gleason grade dolazi do smanjenja nivoa vitamina D u skladu je sa nalazima u grupi BK i postavljenom hipotezom. Pozitivna promena nivoa vitamina D sa porastom primarnog Gleason grade nije mogla biti objašnjena ovom analizom.

Grafikon 24. Interakcija vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleason grade grupa BP



Grafikon 24 predstavlja interakciju između nivoa vitamina D, primarnog i sekundarnog Gleason grade u BP grupi. Uočava se interakcija koja je obrnuta u odnosu na onu koju smo videli kod grupe pacijenata BK. Ukoliko posmatramo pojedinačno korelaciju vitamina D prema primarnom i sekundarnom Gleason grade uočava se smanjenje nivoa vitamina D prilikom porast primarnog Gleason Grade, dok sekundarni Gleason ima inverzan odnos. Ovakav korelacija za sekundarni Gleason vidi se samo kod grupe ispitanika BP. Za niske vrednosti primarnog Gleason grade sa porastom vrednosti sekundarnog Gleason grade raste nivo vitamina D. Slično kao i u slučaju pacijenata iz grupe BK, ako su vrednosti primarnog Gleason grade srednje, porast vrednosti sekundrnog Gleason grade ne proizvodi veće promene u nivou vitamina D. U slučaju visokih vrednosti primarnog Gleason grade sa porastom vrednosti sekundarnog Gleason grade raste i nivo vitamina D.

Statistička analiza nije ustanovila postojanje korelacije između vitamina D i Gleason grade. Na osnovu navedenih podataka i analiza može se zaključiti da rezultati ove analize ne ukazuju na postojanje korelacije između nivoa vitamina D i Gleason grade tj. da hipoteza koja pretpostavlja postojanje korelacije između Gleason grade i nivoa vitamina D nije tačna.

Gleason skor nije dostigao značajnost, čak ni kada je visoka korelacija koju ova varijabla ima sa inicijalnim i finalnim merenjem stavljena pod statističku kontrolu. Naprosto, ovaj prediktor nema nezavisni doprinos u predikciji nivoa vitamina D kada su primarni i

sekundarni Gleason scor određeni kao prediktori u modelu (Ocena = 1.050; Std. greška ocene = 3.875; t = 0.061; p = 0.951).

Postavljena hipoteza da Gleason scor korelira sa nivoom vitamina D se na osnovu podataka dobijenih ovom analizom može smatrati netačnom.

## **6.6. Nivo vitamina D kod pacijenata kod kojih je došlo do progresije bolesti**

Da bismo odredili relaciju vitamina D i progresije bolesti u različitim stadijuma izdvojili smo grupu pacijenata kod kojih je došlo do progresije. Kako vitamin D pokazuje antiproliferativno, proapoptotsko i prodiferencijaciono dejstvo in vitro i in vivo, postavljena je hipoteza da se kod pacijenata kod kojih je došlo do progresije može očekivati niži nivo vitamina D.

U literaturi se nailazi na mali broj studija koje analiziraju odnos nivoa vitamina D i progresije adenokarcinoma prostate.

Shwartz i saradnici su posmatrali in vitro dejstvo vitamina D na ćelijske linije adenokarcinoma prostate. Posmatrali su dejstvo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i  $1\alpha,25$ - dihydroxy-16-ene-23-yne-cholecalciferol (16-23-D<sub>3</sub>), nekacemijskog analoga vitamina D, na visoko invazivnu ćelijsku liniju DU145. Invazivnost ćelijske linije je znatno smanjena nakon aplikacije  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i 16-23-D<sub>3</sub> (66% i 59.4%). Efekat je bio dozno (evidentan pri fiziološkim dozama  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) i vremenski zavisna. (236).

U studiji iz 2009. godine Tretli i saradnici su posmatrali nivo vitamina D u odnosu na postojanje progresije bolesti tj. letalni ishod. Nivo vitamina D je definisan kao nizak (< 50nmol/l), srednji (50 – 80 nmol/l) i visok (> 80 nmol/l). Pacijenti (160) su podeljeni u dve grupe:

- I grupa se sastojala od 37 pacijenata sa metastatskim karcinomom prostate koji su u trenutku uključivanja u ispitivanje već bili na hormonalnoj terapiji.
- II grupa (123 pacijenta) nakon uključivanja je bila lečena radioterapijom, hirurški ili hormonalnom terapijom.

Ukupno 97 pacijenata je primalo hormonalnu terapiju. Registrovana su 52 letalna ishoda specifična za posmatrano oboljenje. U obe grupe HR za letalni ishod u odnosu na pacijente sa najnižim nivoom vitamina D iznosi 0.48 (95% CI = 0.24–0.97) za ispitanike koji su imali najvišu vrednost vitamina D i 0.34 (95%CI = 0.15–0.77) za ispitanike koji su imali srednje vrednosti vitamina D. Nakon formiranja modela koji je u obzir uzeo i Gleason grade

asocijacija je bila jača. Pacijenti na hormonskoj terapiji imali su niže vrednosti vitamina D od ostalih ispitanika (70.7 vs 76.0 nmol/l). Model koji je korelirao nivo vitamina D, starosnu dob u kojoj je dijagnoza postavljena, Gleason grade i funkcionalni status pokazao je da je HR za smrtni ishod 0.18 (95% CI = 0.07–0.46) kod pacijenata sa srednjim nivoom vitamina D u odnosu na pacijente sa niskim nivoom vitamina D. Ukoliko se porede pacijenti koji su imali najvišu vrednost vitamina D sa pacijentima sa najnižim nivoom HR je 0.09 (95% CI = 0.03–0.27). Studija je pokazala da postoji jaka povezanost između nivoa vitamina D i specifičnog mortaliteta kod pacijenata sa dijagnostikovanim adenokarcinomom prostate (227).

U studiji koja je uključila 490 ispitanika sa lokalizovanim adenokarcinomom prostate Gilbert i saradnici su posmatrali odnos nivoa vitamina D i progresije bolesti. Kao merilo progresije bolesti koristili su vreme udvostručenja PSA (PSADT). Nisu uočili povezanost između nivoa 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i PSADT. Korelacija nije ustanovljena ni nakon stratifikacije prema Gleason grade (237).

Trump i saradnici su u studiji objavljenoj 2009. godine ispitivali odnos vitamina D kod pacijenata sa lokalizovanim i metastatskim oboljenjem. U ispitivanje je uključeno 50 ispitanika sa lokalizovanim oboljenjem (grupa A), 120 ispitanika sa biohemijским relapsom (grupa B) i 100 kontrolnih subjekata (grupa C). Grupa B se sastojala od 56% pacijenata kod kojih su postojali radiografski ili fizikalni nalazi koji su govorili u prilog postojanja metastaza, dok je 44% ispitanika imalo samo PSA dokazan biohemijским relaps. Prosečne vrednosti vitamina D u sve tri grupe predstavljena je u tabeli 23.

Tabela 23. Vrednosti vitamina D prema grupama ispitanika

	A	B	C
nivo vitamina D	68.75	64.75	61.25

Nije uočeno postojanje razlike u nivou vitamina D kod pacijenata u ispitivanim grupama. Kastracija nije uticala na nivo vitamina D, pacijenti koji su imali hormon refrakternu oboljenje češće su bili vitamin D deficijentni (238).

Drugi istraživači su se fokusirali na ulogu vitamina D u lečenju adenokarcinoma prostate. Cilj ovog ispitivanja nije analiza terapijske uloge vitamina D međutim studije daju dosta podataka o odnosu nivoa vitamina D i vremena do progresije nakon terapije, te će najznačajnije ovde detaljno biti razmotrene.

Woo i saradnici su 2005. godine objavili istraživanje koje se bavi ispitivanjem odnosa vitamina D i PSA nakon biohemijskog relapsa kod pacijenata koji su lečeni zbog lokalizovanog karcinoma prostate. Kod ukupno 15 pacijenata je ordinirana terapija (2000 i.j holekalciferola / dan) tokom 21 meseca. Kod 9 pacijenata nivo PSA je bio nepromenjen ili ja pao na niže vrednosti tokom 21 meseca. Takođe je uočeno da nakon ordiniranja holekalcifeorla nivo PSA raste znatno sporije, PSADT produžen sa 14.3 na 25 meseci. Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da postoji korelacija između nivoa vitamina D i progresije kod pacijenata koji su lečeni zbog postojanja lokalizovanog adenokarcinoma prostate (239).

U literaturi se nalaze vrednosti PSA nakon ordinirane terapije prema kojima se može definisati dalji tok bolesti. Ove vrednosti su za:

- Pacijente u grupi BH i BK < 0.2 ng/ml, 0.2-4ng/ml i > 4 ng/ml
- Pacijenti u grupi BP <0.2 ng/ml i > 0.2 ng/ml

Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da je nakon 12 meseci u grupi BH kod 9 (30%) pacijenata zabeležena vrednost PSA manja od 0.2 ng/ml. Grupa pacijenata BK imala je 5 (16.67%) slučajeva kod kojih je zabeležen PSA manji od 0.2 ng/ml. U grupi BH ukupno 23 (76.7%) pacijenta je imalo vrednost manju od 4 ng/ml. U grupi isptanika BK ukupno 26 (86.7%) subjekata je imalo vrednosti PSA < od 4 ng/ml. Hussain i saradnici su se u istraživanju iz 2006. godine bavili učestalošću progresije kod pacijenata sa D2 stadijumom po Whitmore – Jewett klasifikaciji. Nakon 7 meseci na totalnoj androgenoj blokadi pacijenti su dostigli vrednosti manje od 4 ng/ml u 69%. Vrednost PSA manja od 0.2 ng/ml nakon 7 meseci zabeležena je kod 48% ispitanika (221). Rezultati vrednosti PSA 6 meseci nakon ordinirane terapije dobijeni ovim ispitivanjem prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Vrednosti PSA kod pacijenta nakon 6 meseci

prva kontrola	PSA \ grupa	BK		BH	
	<4 ng/ml	26	86.7%	23	76.7%
	<0.2 ng/ml	10	33.3%	8	26.7%

Druge studije koje su se bavile vrednostima PSA nakon radikalne prostatektomije, hirurške ili medikamentozne kastracije takođe pokazuju rezultate slične rezultatima ovog ispitivanja.

Analiza rezultata ovog ispitivanja pokazala je da u grupi ispitanika BH i BK vrednost vitamina D statistički značajno niža ukoliko postoji progresija.

Prilikom prve kontrole rezultati pokazuju da su vrednosti vitamina D niže za 18.9 nmol/l i 21.6 nmol/l za PSA 0.2-4ng/ml i > od 4 ng/ml ukoliko posmatramo izolovano grupu pacijenata kod koje je došlo do progresije. Dobijeni rezultati su statistički značajni ( p = 0.001 i p = 0.002). Grupa pacijenata sa nivoom PSA od 0.2 – 4 ng/ml imala je nivo vitamina D 60 nmol/l. Pacijenti sa nivoom PSA > od 4 ng/ml imali su nivo vitamina D od 57.3 nmol/l tj. obe grupe ispitanika su bile vitamin D insuficijentne.

Na drugoj kontroli u grupi koja je imala PSA 0.2 – 4 ng/ml uočena je slabo značajna povezanost progresije i nivoa vitamina D, dok u grupi ispitanika sa PSA > 4 ng/ml nismo uočili statistički značajnu povezanost između nivoa vitamina D i progresije bolesti. Vrednost vitamina D kod pacijenata koji su imali PSA 0.2 – 4 ng/ml je 61 nmol/l, za PSA > 4 ng/ml 71.7 nmol/l (p = 0.028 i p = 0.437).

Pacijenti bez progresije su bili vitamin D suficijentni (78.9 nmol/l).

Dobijeni rezultati ukazuju da kod pacijenata iz grupe BH i BK postoji statistički značajna korelacija između progresije i nivoa vitamina D. Korelacija nije nađena kod pacijenata koji su imali vrednosti PSA veće od 4 ng/ml na drugom merenju zbog veličine uzorka. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da je progresija adenokarcinoma prostate povezana sa nižim nivoom vitamina D, te se hipoteza da kod pacijenata sa progresijom postoji niža vrednost vitamina D smatra tačnom.

U grupi pacijenata BP možemo uočiti sličnu korelaciju kao i kod grupe BP i BH. Tabela 25 predstavlja broj pacijenata sa vrednostima PSA manjim od 0.2 ng/ml 6 meseci nakon terapije. Prilikom druge kontrole samo je kod jednog pacijent došlo do progresije.

Tabela 25. Vrednosti PSA kod pacijenta nakon 6 meseci

BP			
Prva kontrola	<0.2 ng/ml	26	86.7%
Druga kontrola	<0.2 ng/ml	25	83.33

Zabeležen je pad od 20.93 nmol/l kod pacijenata sa progresijom ( $p = 0.027$ ), uz veću grešku ocene. Postavljena hipoteza da kod pacijenata u grupi BP postoji niža vrednost vitamina D u slučaju progresije može se smatrati tačnom.

### 6.7. Promena nivoa PSA nakon lečenja i korelacija sa nivoom vitamina D

Pored pada nivoa PSA nakon ordinirane terapije ispod referentne vrednosti literatura pokazuje da stepen pada nivoa PSA nakon terapije u odnosu na nivo PSA pre ordinirane terapije ima važnu ulogu u praćenju bolesti. Da bi se analiziralo postojanje eventualne korelacije između nivoa PSA i vitamina D postavljena je hipoteza da kod pacijenata sa padom PSA na niže vrednosti nakon medikamentozne i hirurške kastracije postoji viši nivo vitamina D u serumu.

Hussain i saradnici su u SWOG 9346 ustanovili da vrednost PSA nakon androgene ablacije korelira sa preživljavanjem. Tabela 26 predstavlja preživljavanje pacijenata prema nivou PSA nakon androgene ablacije.

Tabela 26. Preživljavanje nakon androgene ablacije prema nivou PSA

PSA 6 meseci nakon androgene ablacije (ng/ml)	preživljavanje	95 % Interval poverenja
< 0.2	75	62 – 91
0.2 – 4	44	39 – 55
>4	11	11 – 16

Studija takođe pokazuje da postoji veći mortalitet kod pacijenata koji imaju više preterapijske vrednosti PSA. Kombinovanjem ovih podataka istraživači su zaključili da visok nivo PSA pre i nakon terapije predstavljaju značajan prediktor ponašanja bolesti (221).

Matzkin i saradnici su ispitivali značaj procentualne promene vrednosti PSA pre i nakon ordinirane terapije kod pacijenata sa metastatskim karcinomom prostate. Analizirali su 57 pacijenata sa D2 stadijumom bolesti. Pacijenti su hirurški ili medikamentozno kastrirani (goserelin acetat 3.6 mg ili leuprolide 7.5 mg / mesečno). Uočili su da se vreme do progresije značajno razlikuje u zavisnosti od veličine procentualnog smanjenja vrednosti PSA. Tabela 27 predstavlja vreme do progresije prema vrednostima PSA nakon (240).

Tabela 27: nivo PSA nakon kastracije i vreme do progresije

nivo PSA nakon terapije	vreme do progresije (meseci)
<4 ng/ml	36
4 – 49 ng/ml	12
>50 ng/ml	6

Takođe su korelirali procentualni pad vrednosti PSA i vreme do progresije. Rezultati su prikazani u tabeli 28.

Tabela 28: procentualna promena PSA i dužina vremena do progresije

veličina promene vrednosti PSA (%)	vreme do progresije (meseci)
>95	31
90 -95	16
< 90	6

Kwark i saradnici su u studiji objavljenoj 2002. godine proučavali odnos promene nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapije (goserelin acetat 3.6 mg /mesečno i flutamid 250 mg



3x1/dan) kod pacijenata u C i D stadijumu prema Whitmore klacifikaciji. Ustanovili su da postoji korelacija između nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapije i vremena do progresije. Ustanovili su da niža vrednost PSA nakon terapije korelira sa nižom učestalošću hormon refrakternog oboljenja i dužim periodom do progresije. Vreme do hormon refrakternog oboljenja prikazano je u tabeli 29 (241).

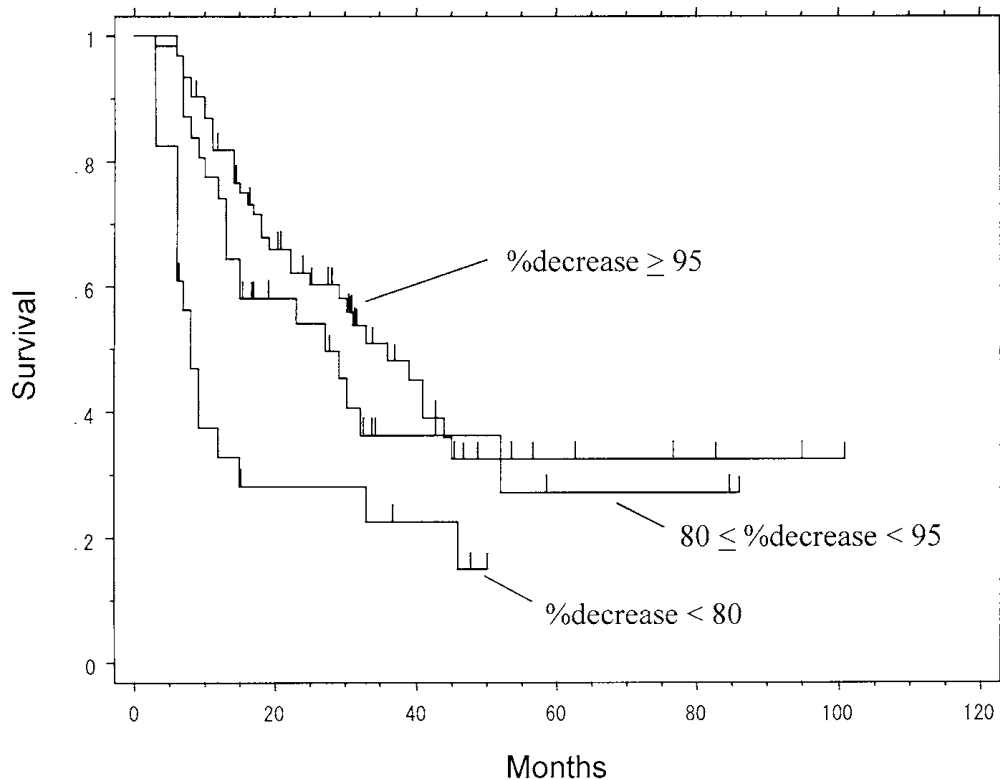
Tabela 29. Vreme do pojave hormon refrakternog karcinoma prostate prema nivou PSA 6 meseci nako androgene ablacije

PSA (ng/ml) 6 meseci nakon ordinirane terapije	Vreme do pojave hormon refrakternog oboljenja (meseci)	Hazards ratio	95% CI
< 0.2 ng/ml	37	1	
0.2 – 1 ng/ml	30	2.11	0.94 - 4.72
1.1 – 10 ng/ml	15	4.13	1.85 - 9.24
>10 ng/ml	7	4.24	1.90 -14.16

Benaim i saradnici su u studiji objavljenoj 2002. godine posmatrali 153 pacijenta sa metastatskim karcinomom prostate lečenih medikamentoznom ili hirurškom kastracijom. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nivo PSA nakon ordinirane terapije korelira sa dužinom biohemijskog odgovora. Pacijenti sa nižim nivoom PSA nakon ordinirane terapije su imali duži period do progresije bolesti (242).

Furuya i saradnici su u istraživanju iz 2001. godine posmatrali 115 pacijenata sa dijagnostikovanim metastatskim adenokarcinomom prostate koji su medikamentozno ili hirurški kastrirani. Ustanovljeno je postojanje pozitivne korelacije između vrednosti PSA pre terapije i preživljavanja specifičnog za oboljenje. Utvrdili su povezanost između procentualne promene vrednosti PSA pre i nakon ordinirane terapije, što je prikazano grafikonom 25 (243).

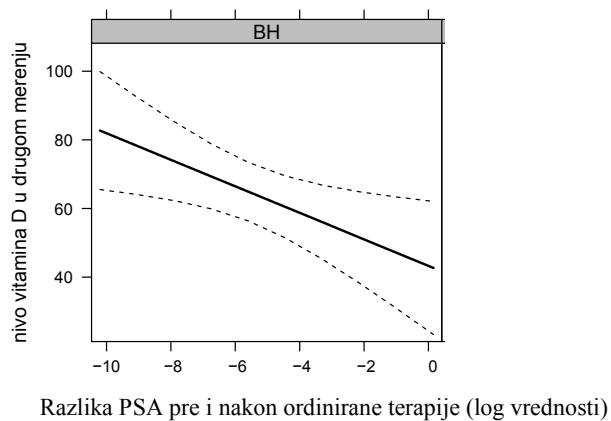
Grafikon 25. Procentualno smanjenje nivoa PSA (pre terapije i 6 meseci nakon terapije) i korelacija sa preživljavanjem specifičnim za oboljenje (Furua et al.)



Kako postoje dokazi o povezanosti nivoa na koji PSA pada nakon ordinirane terapije, nivoa PSA pre ordinirane terapije i toka bolesti (vremena do progresije i letalnog ishoda) statističkom analizom pokušano je uspostavljanje relacije između stepena promene vrednosti PSA i nivoa vitamina D. Analiziran je nivo PSA na prvom merenju (pre ordinirane terapije) i na drugom merenju (6 meseci nakon ordinirane terapije) tj. analizirana je veličina promene i korelirana sa nivoom vitamina D.

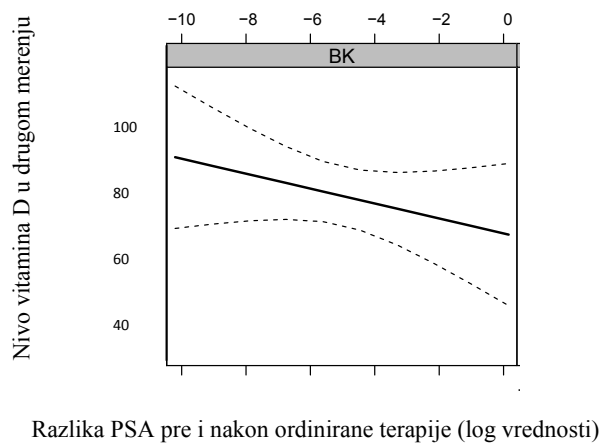
Kod ispitanika u grupi BH veća negativna promena nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapije bila je povezana sa većim nivoom vitamina D. Dobijeni rezultati su statistički značajni ( $p = 0.02562$ ) uz standardnu grešku ocene 1.148. Rezultati su grafički prikazani grafikonom 26.

Grafikon 26. Korelacija promene nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapija i nivoa vitamina D – grupa BH



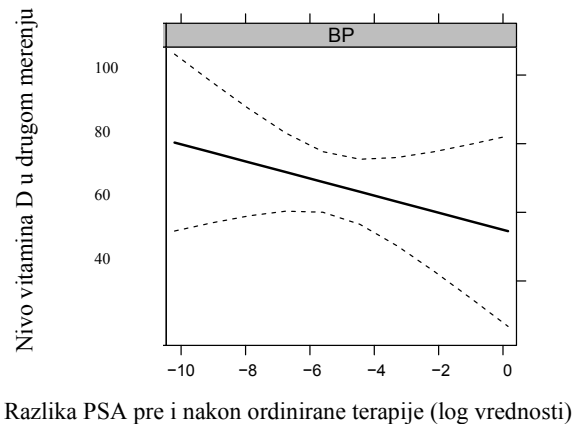
U grupi ispitanika BK pad PSA na niži nivo nakon ordinirane terapije povezan je sa višim nivoom vitamina D. Dobijeni rezultati su statistički značajni ( $p = 0.00758$ ) uz standardnu grešku ocene 1.27. Rezultati su predstavljeni grafikonom 27.

Grafikon 27. Korelacija promene nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapija i nivoa vitamina D – grupa BK



Grupa ispitanika BP takođe pokazuje postojanje višeg nivoa vitamina D ukoliko PSA pada na nžu vrednost nakon ordinirane terapije. Rezultati su statistički značajni ( $p = 0.02404$ ) uz standardnu grešku ocene od 1.315. Grafikon 28 prikazuje ove rezultate:

Grafikon 28. Korelacija promene nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapija i nivoa vitamina D – grupa BP



Rezultati ovog istraživanja pokazuju da postoji pozitivna korelacija između nivoa vitamina D i veličine promene nivoa PSA pre i nakon ordinirane terapije u sve tri grupe obolelih. Hipoteza da se kod pacijenata sa padom PSA na niže vrednosti nakon medikamentozne i hirurške kastracije očekuje viši nivo vitamina D u serumu stoga se može smatrati tačnom.

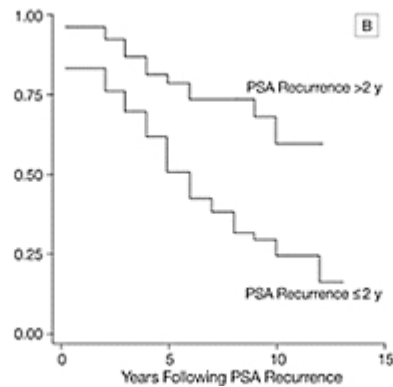
### 6.8. Nivo vitamina D i vreme do progresije

Vreme do progresije ima prognostički značaj te je postavljena hipoteza da je nivo vitamina D niži kod pacijenata kod kojih do biohemijske progresije dolazi ranije u odnosu na pacijente kod kojih do biohemijske progresije dolazi kasnije. Kako nivoi PSA od  $< 0.2$  ng/ml,  $0.2 - 4$  ng/ml i  $> 4$  ng/ml imaju različit prognostički značaj, ove referentne vrednosti smo takođe uzeli u obzir.

Pound i saradnici su istraživali povezanost vremena do biohemijske progresije i vremena do razvoja metastatskog oboljenja. U ispitivanje je uključeno 1997 ispitanika kod kojih je urađena radikalna prostatektomija. Statistička analiza je pokazala da postoji povezanost između vremena do biohemijske progresije i pojave metastatskog oboljenja. Kao graničnu

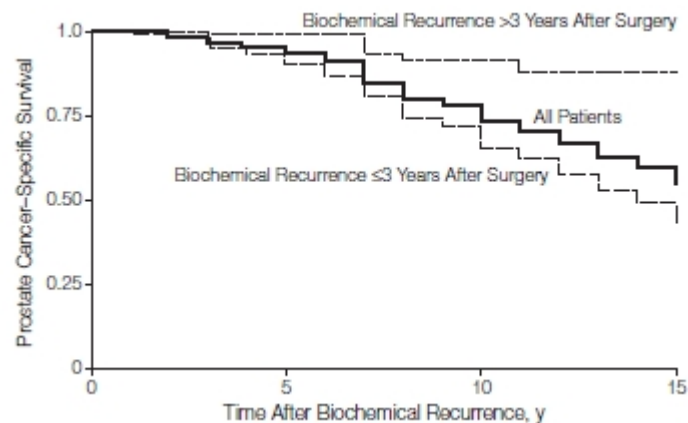
vrednost uzeli su  $< 2$  ili  $>$  od 2 godine do biohemijske progresije. Grafikon 29 prikazuje verovatnoću za pojavu metastaza prema trenutku biohemijske progresije (244).

Grafikon 29: korelacija verovatnoće metastaza i vremena do biohemijskog relapsa



Ispitivanje koje je sproveo Freedland i saradnici je analiziralo 379 ispitanika sa biohemijskim relapsom nakon radikalne prostatektomije ( $\text{PSA} > 0.2 \text{ ng/ml}$ ). Ova studija definiše odnos vremena do biohemijske progresije i vremena do smrti uzrokovane karcinomom prostate. Grafikon 30 prikazuje rezultate studije (245).

Grafikon 30: korelacija specifičnog mortaliteta i vremena do biohemijskog relapsa



Kod pacijenata u grupi BH i BK koje smo posmatrali zajedno vrednosti vitamina D su prikazane u tabeli 30.

Tabela 30. Nivo vitamina D na prvoj kontroli u zavisnosti od nivoa PSA

	Nivo vitamina D (ocena)	Std. greška ocene	t vrednost	Pr(> t )
bez progresije	78.978	4.466	17.684	< 0.001
I 0,2-4	-18.967	5.470	-3.467	0.001
I > 4	-21.599	6.773	-3.189	0.002

Na drugoj kontroli dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 31.

Tabela 31. Nivo vitamina D na drugoj kontroli u zavisnosti od nivoa PSA

	Nivo vitamina D (ocena)	Std. greška ocene	t vrednost	Pr(> t )
bez progresije	78.978	4.466	17.684	< 0.001
II 0,2-4	- 17.930	7.948	-2.256	0.028
II > 4	- 7.215	9.207	-0.784	0.437

Statistička analiza je pokazala da prilikom prve kontrole postoji statistički značajan pad nivoa vitamina D kod pacijenata kod kojih dolazi do progresije. Prilikom druge kontrole postoji statistički slaba povezanost između progresije i nivoa vitamina D u jednoj grupi, dok u drugoj grupi ispitanika nije ustanovljeno postojanje statistički značajne povezanosti između nivoa vitamina D i progresije. Možemo zaključiti da je hipoteza da je nivo vitamina D niži kod pacijenata kod kojih do biohemijske progresije dolazi ranije u odnosu na pacijenate kod kojih do biohemijske progresije dolazi kasnije tačna.

U grupi BP zabeležene su četiri progresije, od kojih je samo jedna progresija zabeležena prilikom druge kontrole.

## 7. Zaključci

- Nije ustanovljeno postojanje statistički značajne razlike nivoa vitamina D kod ispitanika sa lokalizovanim i metastatskim oboljenjem, dobijene vrednosti nisu bile apsolutno niske. Ispitanici u kontrolnoj grupi imali su značajno viši nivo vitamina D od grupe obolelih.
- Analiza odnosa vitamina D i PSA pokazala je da su ispitanici sa višim nivoom PSA imali niži nivo vitamina D tj. da postoji inverzan odnos između nivoa vitamina D i PSA. Sve tri grupe obolelih ispitanika pokazuju pozitivan odnos PSA i vitamina D pre terapije, nakon ordinirane terapije ovaj odnos se menja u negativan.
- Rezultati analize odnosa vitamina D i primarnog i sekundarnog Gleason scor - a nisu ukazivali na postojanje statistički značajne korelacije između vitamina D i Gleason scora.
- Ispitanici kod kojih je došlo do progresije imaju niži nivo vitamina D u odnosu na ispitanike kod kojih nije došlo do progresije.
- Ispitivanje veličine promene PSA nakon ordinirane terapije i nivoa vitamina D pokazalo je da kod ispitanika kod kojih je zabeležena niža vrednost PSA nakon terapije u odnosu na preterapijske vrednosti PSA postoji viši nivo vitamina D.
- Analiza grupe ispitanika kod koje je došlo do progresije ukazuje da u slučaju progresije bolesti postoji niži nivo vitamina D. Rezultati su takođe pokazali da kod ispitanika kod kojih ranije dolazi do progresije oboljenja postoji niži nivo vitamina D u odnosu na pacijente kod kojih do progresije bolesti dolazi kasnije.

## 8. Literatura

1. Campbell-Walsh Urology. 10th ed. Editor in chief: Alan J. Wein.
2. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. IARC Sci Publ. 1997;7(143): 1-1240.
3. Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. geographical distribution and time-trends. Acta Oncol. 1991;30(2):133-40.
4. Templeton AR. Human races: A genetic and evolutionary perspective. American Anthropologist. 1998;100(3):632-50.
5. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet. 2003;361(9360):859-64.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. Ca-A Cancer Journal for Clinicians. 2005;55(2):74-108.
7. Tarone RE, Chu KC, Brawley OW. Implications of stage-specific survival rates in assessing recent declines in prostate cancer mortality rates. Epidemiology. 2000;11(2):167-70.
8. Woolf CM. An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. Cancer. 1960;13:739-44.
9. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, et al. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89 (8):3367-71.
10. Grönberg H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. Cancer 1996;77(1):138-43.
11. Zeegers MPA, Jellema A, Ostrer H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: A meta-analysis. Cancer. 2003;97(8):1894-903.
12. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. 2005;28;310(5748):644-8.
13. Fine SW, Gopalan A, Leversha MA et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is associated with low Gleason scores and not with high-grade morphological features. Mod Pathol. 2010;23:1325-33.
14. American cancer society. Cancer Facts & Figures, 2008.
15. Roberts RO, Bergstralh EJ, Bass SE et al. Prostatitis as a Risk Factor for Prostate Cancer. Epidemiology. 2004;15:93-99.
16. Krieger NJ, Donald ER, Cheah PY. Epidemiology of prostatitis: new evidence for a world-wide problem World Journal of Urology 2003;21:70-74.



17. Dennis KL, Lynch FC, Torner CJ et al. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. 2002;60:78-83.
18. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2007;7(4):256-69.
19. Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo MA et al. Gonorrhea, Syphilis, Clinical Prostatitis, and the Risk of Prostate Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:2160-2166.
20. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. Am J Pathol. 1999;155(6):1985-92.
21. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. Urology 1993;42(4):365-74.
22. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, et al. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml or less. J Urol 1999;161:835-9.
23. Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, et al. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. Eur Urol 2008;54(3):581-8.
24. Catalona JW, Partin WA, Slawin MK et al. Use of the Percentage of Free Prostate-Specific Antigen to Enhance Differentiation of Prostate Cancer From Benign Prostatic Disease 1998;279:1542-1547.
25. Babaian RJ, Mettlin C, Kane R. The relationship of prostate-specific antigen to digital rectal examination and transrectal ultrasonography: Findings of the American cancer society national prostate cancer detection project. Cancer. 1992;69:1195-1200.
26. Loeb S, Catalona WJ. What is the role of digital rectal examination in men undergoing serial screening of serum PSA levels? Nature Clinical Practice Urology. 2009;6(2):68-9.
27. Rietbergen JBW, Hoedemaeker RF, Boeken Kruger AE, Kirkels WJ, Schröder FH. The changing pattern of prostate cancer at the time of diagnosis: Characteristics of screen detected prostate cancer in a population based screening study. J Urol. 1999;161(4):1192-8.
28. Schröder FH, Van Der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, et al. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 1998;90(23):1817-23.

29. Smith Jr. JA, Scardino PT, Resnick MI, Hernandez AD, Rose SC, Egger MJ. Transrectal ultrasound versus digital rectal examination for the staging of carcinoma of the prostate: Results of a prospective, multi-institutional trial. *J Urol*. 1997;157(3):902-6.
30. Freedland SJ, Csathy GS, Dorey F, Aronson WJ. Percent prostate needle biopsy tissue with cancer is more predictive of biochemical failure or adverse pathology after radical prostatectomy than prostate specific antigen or gleason score. *J Urol*. 2002;167(2 I):516-20.
31. Lee N, Newhouse JH, Olsson CA, Benson MC, Petrylak DP, Schiff PB, et al. Which patients with newly diagnosed prostate cancer need a computed tomography scan of the abdomen and pelvis? an analysis based on 588 patients. *Urology*. 1999;54(3):490-4.
32. Purohit RS, Shinohara K, Meng MV, Carroll PR. Imaging clinically localized prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 2003;30(2):279-93.
33. Lorente JA, Morote J, Raventos C, Encabo G, Valenzuela H. Clinical efficacy of bone alkaline phosphatase and prostate specific antigen in the diagnosis of bone metastasis in prostate cancer. *J Urol*. 1996;155(4):1348-51.
34. Wolff JM, Ittel T, Borchers H, Brauers A, Jakse G. Efficacy of skeletal alkaline phosphatase and prostate-specific antigen in the diagnosis of bone metastasis in cancer of the prostate. *Urol Int*. 1998;61(1):12-6.
35. Rana A, Karamanis K, Lucas MG, Chisholm GD. Identification of metastatic disease by T category gleason score and serum PSA level in patients with carcinoma of the prostate. *Br J Urol*. 1992;69(3):277-81.
36. Isbarn H, Wanner M, Salomon G, Steuber T, Schlomm T, Köllermann J, et al. Long-term data on the survival of patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy in the prostate-specific antigen era. *BJU Int*. 2010;106(1):37-43.
37. Dorin RP, Daneshmand S, Lasso MA, Cai J, Skinner DG, Lieskovsky G. Long-term outcomes of open radical retropubic prostatectomy for clinically localized prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Urology*. 2012;79(3):626-31.
38. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*. 2002;167(2 I):528-34.
39. Limonta P, Marelli MM, Moretti RM. LHRH analogues as anticancer agents: Pituitary and extrapituitary sites of action. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(4):709-20.
40. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco Jr. FJ, Lilja H, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: A

proposal for a standardized definition. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(24):3973-8.

41. Taylor III JA, Koff SG, Dauser DA, McLeod DG. The relationship of ultrasensitive measurements of prostate-specific antigen levels to prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *BJU Int*. 2006;98(3):540-3.
42. Stamey TA, Kabalin JN, McNeal JE, Johnstone IM, Freiha F, Redwine EA, et al. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. radical prostatectomy treated patients. *J Urol*. 1989;141(5):1076-83.
43. Boccon-Gibod L, Djavan B, Hammerer P, Hoeltl W, Kattan MW, Prayer-Galetti T, et al. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: A european consensus. *Int J Clin Pract*. 2004;58(4):382-90.
44. Matzkin H, Eber P, Todd B, Van der Zwaag R, Soloway MS. Prognostic significance of changes in prostate-specific markers after endocrine treatment of stage D2 prostatic cancer. *Cancer*. 1992;70(9):2302-9.
45. Sasaki T, Onishi T, Hoshina A. Nadir PSA level and time to PSA nadir following primary androgen deprivation therapy are the early survival predictors for prostate cancer patients with bone metastasis. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2011;14(3):248-52.
46. Norman DA, Fordtran JS, Brinkley LJ. Jejunal and ileal adaptation to alterations in dietary calcium. changes in calcium and magnesium absorption and pathogenetic role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest*. 1981;67(6):1599-603.
47. Fleet JC, Schoch RD. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2010;47(4):181-95.
48. Pansu D, Bellaton C, Bronner F. Effect of ca intake on saturable and nonsaturable components of duodenal ca transport. *Am J Physiol*. 1981;240(1):G32-37.
49. Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(23):13324-9.
50. Pansu D, Bellaton C, Roche C, Bronner F. Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D. *Am J Physiol*. 1983;244(6):G695-700.
51. Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Coates PS, Horowitz M, Nordin BEC. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2008;23(11):1859-63.

52. Need AG, Nordin BEC. Misconceptions - vitamin D insufficiency causes malabsorption of calcium. *Bone*. 2008;42(6):1021-4.
53. Bronner F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):387-93.
54. Van De Graaf SFJ, Boullart I, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> and dietary Ca<sup>2+</sup>. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90:303-8.
55. Van Abel M, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: Regulation and implications for disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005;371(4):295-306.
56. Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR. Calciumselective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest*. 2002;82(12):1755-64.
57. Peng J-, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, et al. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(3):729-34.
58. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalié A, et al. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19461-8.
59. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: A novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*. 2003;22(49):7858-61.
60. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*. 2007;26(52):7380-5.
61. Pérez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa De Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption: Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion*. 2008;77(1):22-34.
62. Bronner F, Buckley M. The molecular nature of 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-induced calcium-binding protein biosynthesis in the rat. *Adv Exp Med Biol*. 1982;151:355-60.
63. Bronner F. Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutr Rev*. 2009;67(2):109-13.

64. Akhter S, Kutuzova GD, Christakos S, DeLuca HF. Calbindin D9k is not required for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> absorption in small intestine. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460(2):227-32.
65. Kutuzova GD, Akhter S, Christakos S, Vanhooke J, Kimmel-Jehan C, DeLuca HF. Calbindin D9k knockout mice are indistinguishable from wild-type mice in phenotype and serum calcium level. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12377-81.
66. Song Y, Kato S, Fleet JC. Vitamin D receptor (VDR) knockout mice reveal VDR-independent regulation of intestinal calcium absorption and ECaC2 and calbindin D9k mRNA. *J. Nutr*. 2003;133:374-380.
67. Song Y, Peng X, Porta A, Takanaga H, Peng JB, Hediger MA, et al. Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the intestine and kidney of mice. *Endocrinology*. 2003;144:3885-3894.
68. Benn BS, Ajibade D, Porta A, Dhawan P, Hediger M, Peng J-, et al. Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D 9k. *Endocrinology*. 2008;149(6):3196-205.
69. Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Current Biology*. 1998;8(24):1335-8.
70. Nemere I, Leathers V, Norman AW. 1, 25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>-mediated intestinal calcium transport. Biochemical identification of lysosomes containing calcium and calcium-binding protein (calbindin-D28k). *J. Biol. Chem*. 1986;261:16106-16114.
71. Pansu D, Bellaton C, Bronner F. Developmental changes in the mechanisms of duodenal calcium transport in the rat. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1983;7(1):G20-6.
72. Kirshsteĭne BE, Bauman VK. Pinocytotic route of calcium transport through the intestinal epithelium in newborn rats. *Tsitologiya*. 1980;22(1):57-60.
73. Nemere I, Norman AW. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated vesicular transport of calcium in intestine: time-course studies. *Endocrinology*. 1988;122(6):2962-9.
74. Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, Farach-Carson MC. Identification and characterization of 1,25D 3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D 3-MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90:281-5.
75. Nemere I, Garbi N, Hämmerling GJ, Khanal RC. Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D 3-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. *J Biol Chem*. 2010;285(41):31859-66.

76. Karbach U, Rummel W. Cellular and paracellular calcium transport in the rat ileum and the influence of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and dexamethasone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987;336(1):117-24.
77. Nellans HN. Intestinal calcium absorption. interplay of paracellular and cellular pathways. *Miner Electrolyte Metab.* 1990;16(2-3):101-8.
78. Nellans HN. Contributions of cellular and paracellular pathways to transepithelial intestinal calcium transport. *Prog Clin Biol Res.* 1988;252:269-76.
79. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, et al. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent  $Ca^{2+}$  absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):1912-21.
80. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, et al. Alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007;316:1615-1618.
81. Nabeshima Y, Imura H. Alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. *Am J Nephrol* 2008;28:455-464.
82. Klibanski A, Adams-Campbell L, Bassford T, Blair SN, Boden SD, Dickersin K, et al. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *J Am Med Assoc.* 2001;285(6):785-95.
83. Holick MF. Medical progress: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
84. Fu Q, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid hormone controls receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand gene expression via a distant transcriptional enhancer. *Mol Cell Biol.* 2006;26(17):6453-68.
85. Galli C, Zella LA, Fretz JA, Fu Q, Pike JW, Weinstein RS, et al. Targeted deletion of a distant transcriptional enhancer of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand gene reduces bone remodeling and increases bone mass. *Endocrinology.* 2008;149(1):146-53.
86. Nerenz RD, Martowicz ML, Pike JW. An enhancer 20 kilobases upstream of the human receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand gene mediates dominant activation by  $1,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Molecular Endocrinology.* 2008;22(5):1044-56.
87. Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006:129-37

88. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001:1009-28.
89. Feng JQ, Ye L, Schiavi S. Do osteocytes contribute to phosphate homeostasis? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(4):285-91.
90. Cheng F, Hulley P. The osteocyte - A novel endocrine regulator of body phosphate homeostasis. *Maturitas*. 2010;67(4):327-38.
91. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3820-8.
92. White KE, Larsson TE, Econs MJ. The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis: Frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23. *Endocr Rev*. 2006;27(3):221-41.
93. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(6):1637-47.
94. Quarles LD. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: Implications in chronic kidney disease. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):1040-8.
95. Martin A, David V, Darryl Quarles L. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev*. 2012;92(1):131-55.
96. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006;81:353-73.
97. Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, et al. Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *J Intern Med* 2000;247:260-8.
98. Dawson-Hughes B. Racial/ethnic considerations in making recommendations for vitamin D for adult and elderly men and women. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1763S-6S.
99. Chapuy M-, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporosis Int*. 1997;7(5):439-43.
100. Cannell JJ, Hollis BW, Zasloff M, Heaney RP. Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9(1):107-18.
101. Holick MF. Vitamin D: The underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*. 2002;9(1):87-98.

102. Holick MF. Sunlight and vitamin D: Both good for cardiovascular health. *Journal of General Internal Medicine*. 2002;17(9):733-5.
103. Catharine AR, Christine LT, Ann LY. Dietary Reference Intakes for Calcium Vitamin D. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. 2010.
104. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80:Suppl:1689S-1696S.
105. Grzanka K, Kucharz EJ. Vitamin D-resistant rickets. *Wiad Lek*. 2004;57(11-12):663-71.
106. Fraser D. R, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. *Nature* 1970;228:764–766.
107. Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:139-66.
108. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):685-98.
109. Daniel DB, Extrarenal sintesis og 1,25 dihydroxyvitamin D and its health implications. *Clin Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2009;7(2):114-125.
110. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D- binding protein. *Nature Struct. Biol*. 2002;9:131-136.
111. Head J.F, Swamy N, Ray R. Crystal structure of the complex between actin and human vitamin D-binding protein at 2.5Å resolution. *Biochemistry* 2002;41:9015-9020.
112. White P, Cooke N. The multifunctional properties and characteristic of vitamin D binding protein. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2000;11:320-327.
113. Haussler M.R, Whitfield G.K, Haussler C.A, Hsieh J-C, Jurutka PW Nuclear vitamin D receptor: natural ligands, molecular structure–function, and transcriptional control of vital genes. 2002 In: Feldman D, Pike JW, Adams J Vitamin D. Academic Press, San Diego, pp 137–170
114. Safadi F.F, Thornton P, Magiera H, Hollis B.W, Gentile M, Haddad J.G, Liebhaber S.A, Cooke N.E. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):239-51.
115. Lee AZ, Nirupama KS, Bruce WH, Nancy EC, Pike JW. Vitamin D-Binding Protein Influences Total Circulating Levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but Does Not Directly Modulate the Bioactive Levels of the Hormone in Vivo. *Endocrinology*. 2008;149(7):3656–3667.



116. Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25 dihydroxyvitamin D resistant rickets. *Endocr. Rew.* 1999;20:156-188.
117. Rut AR, Hewinson M, Kristjansson K, et al. Two mutation causing vitamin D resistant rickets: modeling on the basis of steroid hormone receptor DNK binding domain cristal structures. *Clin. Endocrinol.* 1994;41:581-590.
118. Germain P, Chambon P, Elichele G et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. *Pharmacological Reviews.* 2006;58:760-772.
119. Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, et al. Nuclear vitamin D receptor: structure – function, molecular control of gene transcription and novel bioactions. In Feldman D, Pike JW, Glorieux FH (Eds) *Vitamin D*, second edition, Elsevier Academic press, Oxford, UK, 2005; 219-261.
120. Hsieh JC, Whitfield GK, Jurutka PW, et al. Two basic amino acid C-terminalof the proximal box specify functional binding of the vitamin D receptor to its rat osteocalcin deoxyribonucleic – acid responsive element. *Endocrinology* 2003;144:5065 – 5080.
121. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *Journal of Bone and mineral research* 1998;13:325-349.
122. Beard JA, Bearden A, Striker R, Vitamin D and the anti-viral state, *Journal of Clinical Virology*, 2011;50:194-200.
123. Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25- hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 1998;7(5):391-5.
124. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology.* 1993;132(5):1952-60.
125. Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D 3 on primary cultures of human prostati ccells. *Cancer Res.* 1994;54:805-810.
126. Krill D, DeFlavia P, Dhir R, Luo J, Becich MJ, Lehman E,et al. Expression patterns of vitamin D receptor in humanprostate. *J. Cell Biochem.* 2001;82:566-572.
127. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh J-C, Jurutka PW. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif Tissue Int* 2012; article in press

128. Haussler MR, Haussle CA, Whitfield GK et al. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “Fountain of Youth” to mediate healthful aging. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2010;121:88–97.
129. Weissen-Plenz G, Nitschke Y, Rutsch F, Chapter 7 Mechanisms of Arterial Calcification: Spotlight on The Inhibitors, In: Gregory S. Makowski, Editor(s), *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier, 2008;46:263-293.
130. Barthel TK, Mathern DR, Whitfield GK. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007;103(3-5): 81-388.
131. Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, et al. Calcium Sensing Receptor in Human Colon Carcinoma. *Cancer Res*, 2005;15: 65-493.
132. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton, *Cell*, 2007;130:456-469.
133. Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: A two-way street. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;503:2-10.
134. Quarles L.D, Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. 2012;8:276-286.
135. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol*. 1980;9(3):227-31.
136. Holick MF. Sunlight and vitamin D: The bone and cancer connections. *Radiat Prot Dosimet*. 2000;91(1-3):65-71.
137. Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (hypothesis). *Anticancer Res*. 1990;10(5 A):1307-12.
138. Salama G, Noiroi O, Bataille V, Malavaud S, Rebillard X, Villers A, et al. Seasonality of serum prostate-specific antigen levels: A population-based study. *Eur Urol*. 2007;52(3):708-14.
139. Down L, Metcalfe C, Martin RM, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, et al. Seasonal variation in prostate-specific antigen levels: A large cross-sectional study of men in the UK. *BJU Int*. 2011;108(9):1409-14
140. Parent M-, Rousseau M-, El-Zein M, Latreille B, Désy M, Siemiatycki J. Occupational and recreational physical activity during adult life and the risk of cancer among men. *Cancer Epidemiology*. 2011;35(2):151-9.

141. Bodiwala D, Luscombe CJ, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, et al. Susceptibility to prostate cancer: Studies on interactions between UVR exposure and skin type. *Carcinogenesis*. 2003;24(4):711-7.
142. Luscombe CJ, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, Fryer AA, et al. Outcome in prostate cancer: Associations with skin type and polymorphism in pigmentation-related genes. *Carcinogenesis*. 2001;22(9):1343-7.
143. Ahn J, Peters U, Albanes D, Purdue MP, Abnet CC, Chatterjee N, et al. Serum vitamin D concentration and prostate cancer risk: A nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(11):796-804.
144. Verhoeven V, Vanpuyenbroeck K, Lopez-Hartmann M, Wens J, Remmen R. Walk on the sunny side of life-epidemiology of hypovitaminosis d and mental health in elderly nursing home residents. *Journal of Nutrition, Health and Aging*. 2012;16(4):417-20.
145. Chan R, Woo J. The value of vitamin d supplementation in older people. *Nutritional Therapy and Metabolism*. 2011;29(1):8-21.
146. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1536-8.
147. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet* 1989;2(8671):1104 –5.
148. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*. 1982;1(8263):74-6.
149. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, Mathieu J, Person KS, Zhang A, et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460(2):213-7.
150. Bell NH, Greene A, Epstein S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. *J Clin Invest*. 1985;76(2):470-3.
151. Freedman BI, Register TC. Effect of race and genetics on vitamin D metabolism, bone and vascular health. *Nature Reviews Nephrology*. 2012;8(8):459-66.
152. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:373– 8.
153. Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, Mosekilde L, et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: An ecologic meta-regression analysis. *Osteoporosis Int*. 2009;20(1):133-40.

154. 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 and Prevention*. 2003;12(7):597-603.
155. Halthur C, Johansson ALV, Almquist M, Malm J, Grönberg H, Manjer J, et al. Serum calcium and the risk of prostate cancer. *Cancer Causes and Control*. 2009;20(7):1205-14.
156. Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens LR, et al. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: A multiethnic case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2000;9(8):795-804.
157. Kolonel LN, Nomura AMY, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: Current status. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(5):414-28.
158. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625-38.
159. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(7):451-9.
160. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(3):690-3.
161. De Vries E, Soerjomataram I, Houterman S, Louwman MWJ, Coebergh JWW. Decreased risk of prostate cancer after skin cancer diagnosis: A protective role of ultraviolet radiation? *Am J Epidemiol*. 2007;165(8):966-72.
162. Rukin NJ, Zeegers MP, Ramachandran S, Luscombe CJ, Liu S, Saxby M, et al. A comparison of sunlight exposure in men with prostate cancer and basal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2007;96(3):523-8.
163. Luscombe CJ, Fryer AA, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, et al. Exposure to ultraviolet radiation: Association with susceptibility and age at presentation with prostate cancer. *Lancet*. 2001;358(9282):641-2.
164. John EM, Schwartz GG, Koo J, Van Den Berg D, Ingles SA. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. *Cancer Res*. 2005;65(12):5470-9.
165. Corder EH, Guess HA, Hulka BS, Friedman GD, Sadler M, Vollmer RT, et al. Vitamin D and prostate cancer: A prediagnostic study with stored sera. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 1993;2(5):467-72.
166. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (finland). *Cancer Causes and Control*. 2000;11(9):847-52.

167. Braun MM, Helzlsouer KJ, Hollis BW, Comstock GW. Prostate cancer and prediagnostic levels of serum vitamin D metabolites (maryland, united states). *Cancer Causes and Control*. 1995;6(3):235-9.
168. Brändstedt J, Almquist M, Manjer J, Malm J. Vitamin D, PTH, and calcium and the risk of prostate cancer: A prospective nested case-control study. *Cancer Causes and Control*. 2012;23(8):1377-85.
169. Tuohimaa P, Tenkanen L, Ahonen M, Lumme S, Jellum E, Hallmans G, et al. Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: A longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *International Journal of Cancer*. 2004;108(1):104-8.
170. Nomura AMY, Stemmermann GN, Lee J, Kolonel LN, Chen TC, Turner A, et al. Serum vitamin D metabolite levels and the subsequent development of prostate cancer (hawaii, united states). *Cancer Causes and Control*. 1998;9(4):425-32.
171. Jacobs ET, Giuliano AB, Martinez ME, Hollis BW, Reid ME, Marshall JR. Plasma levels of 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D and the risk of prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;89-90:533-537.
172. Platz EA, Leitzmann MF, Hollis BW, Willett WC, Giovannucci E. Plasma 1,25-dihydroxy- and 25-hydroxyvitamin D and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Causes and Control*. 2004;15(3):255-65
173. Barnett CM, Nielson CM, Shannon J, Chan JM, Shikany JM, Bauer DC, et al. Serum 25-OH vitamin D levels and risk of developing prostate cancer in older men. *Cancer Causes and Control*. 2010;21(8):1297-303.
174. Kaighn, M. E., Shankar Narayan, K., & Ohnuki, Y. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*. 1979;17(1):16-23.
175. Miller GJ, Stapleton GE, Ferrara JA, Lucia MS, Pfister S, Hedlund TE, Upadhyaya P. The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Res* 1992;52:515-520.
176. Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., & Kawinski, E. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research*. 1983;43(4):1809-1818.
177. Stone K. R, Mickey D. D, Wunderli H. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*. 1978; 21(3): 274-281.
178. Zhuang S, Burnstein K. L. Antiproliferative effect of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer cell line LNCaP involves reduction of cyclin-dependent kinase 2 activity and persistent G1 accumulation. *Endocrinology*, 1998;139(3):1197-1207.

179. Gross C, Skowronski R, Plymate S, Rhim J, Peehl D, Feldman D. Simian virus 40-, but not human papillomavirus-, transformation of prostatic epithelial cells results in loss of growth-inhibition by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Int J Oncol.* 1996;8(1):41-7.
180. Polek TC, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *J Androl.* 2001;23(1):9-17.
181. Liu M, Lee M, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 by vitamin D 3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes and Development.* 1996;10(2):142-53.
182. Boyle BJ, Zhao X-, Cohen P, Feldman D. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1. *J Urol.* 2001;165(4):1319-24.
183. Jackman M, Kubota Y, den Elzen N, Hagting A, Pines J. Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell.* 2002;13(3):1030-45.
184. Flores O, Wang Z, Knudsen KE, Burnstein KL. Nuclear targeting of cyclin-dependent kinase 2 reveals essential roles of cyclin-dependent kinase 2 localization and cyclin E in vitamin D-mediated growth inhibition. *Endocrinology.* 2010;151(3):896-908.
185. Yang E, Burnstein K. Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem* 2003;287:46862–46868.
186. Gearhart J, Pashos E.E, Prasad M.K. Pluripotency Redux -- advances in stem-cell research. *N Engl J Med* 2007;357(15):1469-1472.
187. Rohan JN, Weigel NL. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2009;150(5):2046-2054.
188. Polek T.C, Stewart L.V, Ryu E.J, Cohen M.B, Allegretto E.A, Weigel N.L. p53 is required for 1,25-dihydroxyvitamin D 3-induced G 0 arrest but is not required for G 1 accumulation or apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Endocrinology* 2003;144:50–60.
189. Blutt SE, Polek TC, Stewart LV, Kattan MW, Weigel NL. A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice. *Cancer Res.* 2000;60(4):779-82.

190. Guzey M, Kitada S, Reed JC. Apoptosis induction by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2002;1(9):667-77.
191. Crescioli C, Maggi M, Luconi M, Vannelli GB, Salerno R, Sinisi AA, et al. Vitamin D<sub>3</sub> analogue inhibits keratinocyte growth factor signaling and induces apoptosis in human prostate cancer cells. *Prostate*. 2002;50(1):15-26.
192. Kawagoe H, Potter M, Ellis J, Grosveld GC. TEL2, an ETS factor expressed in human leukemia, regulates monocytic differentiation of U937 cells and blocks the inhibitory effect of TEL1 on ras-induced cellular transformation. *Cancer Res*. 2004;64(17):6091-100.
193. Belochitski O, Ariad S, Shany S, Fridman V, Gavrilov V. Efficient dual treatment of the hormone-refractory prostate cancer cell line DU145 with cetuximab and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *In Vivo*. 2007;21(2):371-6.
194. Drivdahl RH, Loop SM, Andress DL, Ostenson RC. IGF-binding proteins in human prostate tumor cells: Expression and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Prostate*. 1995;26(2):72-9.
195. Huynh H, Pollak M, Zhang J.C. Regulation of insulin – like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its analog EB1089. *Int J Oncol* 1998;13:137–143.
196. Murthy S, Weigel N. L. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induced growth inhibition of PC-3 prostate cancer cells requires an active transforming growth factor beta signaling pathway. *Prostate*, 2004;59(3):282-291.
197. Hong J, Zhang G, Dong F, Rechler MM. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277(12):10489–10497.
198. Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Mechanisms in endocrinology - vitamin D and fertility: A systematic review. *European Journal of Endocrinology*. 2012;166(5):765-78.
199. Wehr E, Pilz S, Boehm BO, März W, Obermayer-Pietsch B. Association of vitamin D status with serum androgen levels in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(2):243-8.
200. Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma K-, Caan BJ, Potter JD, et al. Associations between vitamin D, vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene with colon and rectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2006;118(12):3140-6.

201. Dong LM, Ulrich CM, Hsu L, Duggan DJ, Benitez DS, White E, et al. Genetic variation in calcium-sensing receptor and risk for colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2008;17(10):2755-65.
202. Murthy S, Agoulnik IU, Weigel NL. Androgen receptor signaling and vitamin D receptor action in prostate cancer cells. *Prostate*. 2005;64(4):362-72.
203. Tovar Sepulveda, V. A, Falzon, M. Regulation of PTH-related protein gene expression by vitamin D in PC-3 prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;190(1-2), 115-124.
204. Bhatia V, Mula R.V, Falzon M. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates PTHrP expression via transcriptional, post-transcriptional and post-translational pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;342(1-2):32-40.
205. Schwartz GG, Hill CC, Oeler TA, Becich MJ, Bahnson RR. 1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D<sub>3</sub> and prostate cancer cell proliferation in vivo. *Urology*. 1995;46(3):365-9.
206. Bhatia V, Saini MK, Shen X, Bi LX, Qiu S, Weigel NL, et al. EB1089 inhibits the parathyroid hormone-related protein-enhanced bone metastasis and xenograft growth of human prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(7):1787-98.
207. Vegesna V, O'Kelly J, Said J, Uskokovic M, Binderup L, Phillip Koeffle H. Ability of potent vitamin D<sub>3</sub> analogs to inhibit growth of prostate cancer cells in vivo. *Anticancer Res*. 2003;23(1 A):283-9.
208. Getzenberg RH, Light BW, Lapco PE, Konety BR, Nangia AK, Acierno JS, et al. Vitamin D inhibition of prostate adenocarcinoma growth and metastasis in the dunning rat prostate model system. *Urology*. 1997;50(6):999-1006.
209. Perez-Stable CM, Schwartz GG, Farinas A, Finegold M, Binderup L, Howard GA, et al. The G $\gamma$ /T-15 transgenic mouse model of androgen-independent prostate cancer: Target cells of carcinogenesis and the effect of the vitamin D analogue EB 1089. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2002;11(6):555-63.
210. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2007;25(5):398-400.
211. Perletti G, Montanari E, Vral A, Gazzano G, Marras E, Mione S, et al. Inflammation, prostatitis, proliferative inflammatory atrophy: 'fertile ground' for prostate cancer development? *Molecular Medicine Reports*. 2010;3(1):3-12.
212. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.



213. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: Emerging insights. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1170-81.
214. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissue. *FEBS Lett* 1993;330:156-160.
215. Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato ACB, et al. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med*. 2006;203(1):15-20.
216. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: Implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res* 2006;66:4516–4524.
217. Krishnan AV, Moreno J, Nonn L, Swami S, Peehl DM, Feldman D. Calcitriol as a chemopreventive and therapeutic agent in prostate cancer: Role of anti-inflammatory activity. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007;22(SUPPL. 2):V74-80.
218. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D intake: A global perspective of current status. *J Nutr*. 2005;135(2):310-6.
219. Bailey RL, Dodd KW, Goldman JA, Gahche JJ, Dwyer JT, Moshfegh AJ, Sempos CT, Picciano MF. Estimation of total usual calcium and vitamin D intakes in the United States. *J Nutr*. 2010;140(4):817-22.
220. Blumthaler M, Ambach W, Ellinger R. Increase in solar UV radiation with altitude. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997;39(2):130-4.
221. Hussain M, Tangen CM, Higano C, Schelhammer PF, Faulkner J, Crawford ED, et al. Absolute prostate-specific antigen value after androgen deprivation is a strong independent predictor of survival in new metastatic prostate cancer: Data from southwest oncology group trial 9346 (INT-0162). *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(24):3984-90.
222. Orwoll E, Nielson CM, Marshall LM, Lambert L, Holton KF, Hoffman AR, et al. Vitamin D deficiency in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1214-22.
223. Ginde AA, Liu MC, Camargo Jr. CA. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med*. 2009;169(6):626-32.
224. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone*. 2002;30(5):771-7.

225. Maxwell JD. Seasonal variation in vitamin D. *Proc Nutr Soc.* 1994;53(3):533-43.
226. Corder EH, Friedman GD, Vogelmann JH, Orentreich N. Seasonal variation in vitamin D, vitamin D-binding protein, and dehydroepiandrosterone: Risk of prostate cancer in black and white men. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 1995;4(6):655-9.
227. Tretli S, Hernes E, Berg JP, Hestvik UE, Rødsahl TE. Association between serum 25(OH)D and death from prostate cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(3):450-4.
228. Hsieh T-, Wu JM. Induction of apoptosis and altered nuclear/cytoplasmic distribution of the androgen receptor and prostate-specific antigen by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in androgen-responsive LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(3):539-44.
229. Bao B-, Hu Y-, Ting H-, Lee Y-. Androgen signaling is required for the vitamin D-mediated growth inhibition in human prostate cancer cells. *Oncogene.* 2004;23(19):3350-60.
230. Lawrence MG, Lai J, Clements JA. Kallikreins on steroids: Structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev.* 2010;31(4):407-46.
231. Vieth R, Choo R, Deboer L, Danjoux C, Morton GC, Klotz L. Rise in prostate-specific antigen in men with untreated low-grade prostate cancer is slower during spring-summer. *Am J Ther.* 2006;13(5):394-9.
232. Gilbert R, Metcalfe C, Fraser WD, Donovan J, Hamdy F, Neal DE, et al. Associations of circulating 25-hydroxyvitamin D with prostate cancer diagnosis, stage and grade. *International Journal of Cancer.* 2012;131(5):1187-96.
233. Fang F, Kasperzyk JL, Shui I, Hendrickson W, Hollis BW, Fall K, et al. Prediagnostic plasma vitamin D metabolites and mortality among patients with prostate cancer. *PLoS ONE.* 2011;6(4).
234. Albanes D, Mondul AM, Yu K, Parisi D, Horst RL, Virtamo J, et al. Serum 25-hydroxy vitamin D and prostate cancer risk in a large nested case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2011;20(9):1850-60.
235. Li H, Stampfer MJ, Hollis JBW, Mucci LA, Gaziano JM, Hunter D, et al. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Medicine.* 2007;4(3):562-71.
236. Schwartz GG, Wang M, Zhang M, Singh RK, Siegal GP. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 1997;6(9):727-32.
237. Gilbert R, Metcalfe C, Fraser WD, Lewis S, Donovan J, Hamdy F, et al. Associations of circulating 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and vitamin D pathway genes with prostate-specific antigen progression in men with localized prostate cancer undergoing active monitoring. *European Journal of Cancer Prevention.* 2013;22(2):121-5.

238. Trump DL, Chadha MK, Sunga AY, Fakih MG, Ashraf U, Silliman CG, et al. Vitamin D deficiency and insufficiency among patients with prostate cancer. *BJU Int.* 2009;104(7):909-14.
239. Woo TCS, Choo R, Jamieson M, Chander S, Vieth R. Pilot study: Potential role of vitamin D (cholecalciferol) in patients with PSA relapse after definitive therapy. *Nutr Cancer.* 2005;51(1):32-6.
240. Matzkin H, Eber P, Todd B, Van der Zwaag R, Soloway MS. Prognostic significance of changes in prostate-specific markers after endocrine treatment of stage D2 prostatic cancer. *Cancer.* 1992;70(9):2302-9.
241. Kwak C, Jeong SJ, Park MS, Lee E, Lee SE. Prognostic significance of the nadir prostate specific antigen level after hormone therapy for prostate cancer. *J Urol.* 2002;168(3):995-1000.
242. Benaim EA, Pace CM, Lam PM, Roehrborn CG. Nadir prostate-specific antigen as a predictor of progression to androgen-independent prostate cancer. *Urology.* 2002;59(1):73-8.
243. Furuya Y, Akakura K, Tobe T, Ichikawa T, Igarashi T, Ito H. Prognostic significance of changes in prostate-specific antigen in patients with metastasis prostate cancer after endocrine treatment. *Int Urol Nephrol.* 2001;32(4):659-63.
244. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *J Am Med Assoc.* 1999;281(17):1591-7.
245. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, et al. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Am Med Assoc.* 2005;294(4):433-9.

## 9. Prilozi

### Prilog 1. Upitnik za procenu dijetetskih i habitualnih faktora

#### Upitnik

datum:

Upitnik ima za cilj da odredi količinu vitamina D i kalcijuma koju unosite hranom. Na ovaj način ne proverava se da li se zdravo hranite. Molimo Vas da zaokružite odgovor za koji smatrate da je tačan.

Zahvaljujemo se na vremenu koje ste posvetili pažljivom popunjavanju upitnika.

1. **Koliko često nedeljno popijete čašu mleka (2 decilitra)?** \_\_\_\_\_

2. **Koliko često nedeljno popijete šolju jogurta (2 decilitra)?** \_\_\_\_\_

3. **Koliko često jedete sir?** \_\_\_\_\_

Koju vrstu sira najčešće jedete (tvrdi, sitan)?

Koju količinu sira unosite nedeljno?

4. **Koliko često unosite puter u vidu namaza, torti, kolača (kafena kašikica)?**

Koju količinu putera unesete nedeljno (g)?

5. **Koliko često nedeljno unosite meso?** \_\_\_\_\_

Koju vrstu/e mesa najčešće unosite? \_\_\_\_\_

Koju količinu mesa najčešće unosite ? \_\_\_\_\_

**6. Koliko često mesečno jedete ribu?**

---

Koju vrstu/e ribe jedete?

---

Koju količinu ribe jedete mesečno (g)?

---

**7. Koliko često nedeljno jedete jaja?**

---

**8. Koliko često mesečno jedete pasulj?**

---

Koliko tanjira pasulja pojedete ?

---

\*1 tanjir 250 g kuvanog pasulja

**9. Koliko često nedeljno jedete musli?**

---

Koju količinu muslija unesete nedeljno(g)?

---

\*1 šolja sadrži 250 g muslija

**10. Koliko često dnevno jedete hleb?**

---

Koju količinu hleba unesete (g)?

\*vekna hleba = 600g

**11. Koliko često nedeljno jedete koštuničavo voće?**

---

Koju vrstu koštuničavog voća najčešće konzumirate?

---

Koju količinu koštunučavog voća unosite mesečno?

---

\*šolja lešnika, oraha sadrži 100 g

**12. Da li ste se u periodu maj – septembar izjagali suncu?**

Koliko dugo ste proveli na suncu navedenom periodu (sunčanje)?

\_\_\_\_\_

**13. Da li se zbog radnih obaveza izlažete suncu u periodu maj-septembar?**

\_\_\_\_\_

Koliko dugo ste proveli na suncu nedeljno zbog radnih obaveza?

\_\_\_\_\_

Koju vrstu odevnih predmeta najčešće nosite dok radite?

\_\_\_\_\_

**14. Da li se zbog rekreativnih aktivnosti izlažete suncu u periodu maj – septembar?**

Koliko dugo ste proveli na suncu nedeljno zbog rekreacije?

\_\_\_\_\_

Koju vrstu odevnih predmeta najčešće nosite tokom rekreacije?

\_\_\_\_\_

**15. Da li ste u poslednjih 6 meseci bili na letovanju/zimovanju?**

\_\_\_\_\_

**16. Da li uzimate preparate koji sadrže vitamin D ili kalcijum?**

\_\_\_\_\_

Ukoliko uzimate koje preparate unosite?

\_\_\_\_\_

## **Prilog 2.**

**Klinika za urologiju**

**Klinički centar Vojvodine**

**Hajduk Veljkova 1-7**

**21000 Novi Sad**

**Vojvodina, Srbija**

### **INFORMACIONI LIST**

Značaj određivanja koncentracije D vitamina kod pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom prostate

U Klinici za urologiju i Centru za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine, u toku su ispitivanja koja se vrše na grupi bolesnika sa dijagnostikovanim karcinomom prostate. Ova vrsta karcinoma dijagnostikovana je i kod Vas. Obzirom da Vi u potpunosti ispunjavate uslove da budete uključeni u ovo ispitivanje, obraćamo Vam se sa molbom da pažljivo pročitate ovo obaveštenje kako biste mogli da nam eventualno date svoju saglasnost da učestvujete u ispitivanju, odnosno da dozvolite korišćenje podataka iz Vaše istorije bolesti.

Cilj ovog istraživanja je da se ispita stepen povezanosti između koncentracije D vitamina u krvi i faza razvoja Vaše osnovne bolesti. Zbog toga će se tokom preduzete medikamentozne terapije, hirurške intervencije, ili ekspektativnog posmaratanja, pored

standardnih laboratorijskih testova iz uzoraka izvađene krvi, dodatno meriti i koncentracija D vitamina.

Terapija ove vrste karcinoma rutinski se sprovodi na našoj Klinici: vrsta tumora koju Vi imate leči se po određenim protokolima koji su priznati u svetu, a kojih se mi pridržavamo. Ispitivanje koje ćemo mi izvršiti u svrhu ovog rada nije štetno po Vaše zdravlje, besplatno je i zagarantovana je potpuna tajnosti. Podaci iz bolesničkog kartona će se upotrebiti isključivo u naučne svrhe. Vaše učešće u ovom istraživanju je potpuno dobrovoljno. Možete u bilo kom momentu da odustanete od učestvovanja u ovom ispitivanju, a Vaša odluka neće imati nikakvog uticaja na Vaše dalje lečenje i odnos Vašeg lekara prema Vama.

Ukoliko želite da učestvujete u ovom ispitivanju, molimo Vas da potpišite ponuđeni obrazac.

Za sve detaljnije informacije obratiti se lekaru dr Dimitriju Jeremiću koji je rukovodilac ovog ispitivanja

Rukovodilac ispitivanja

dr Dimitrije Jeremić



**Prilog 3.**  
**TEKST INFORMISANOG PRISTANKA PACIJENTA**

JA \_\_\_\_\_ upoznat sam sa ispitivanjem koje će se obaviti na Klinici za urologiju, Kliničkog centra Vojvodine. Pročitao sam informacije o ispitivanju i razgovarao sa rukovodiocem ispitivanja. Jasan mi je detaljan postupak i postupak ispitivanja. Ovim potpisom dobrovoljno pristajem da učestvujem u ispitivanju kao i da se podaci koje sam dao u razgovoru sa lekarem (koji su neophodni za ispitivanje) koriste u tu svrhu. Detaljno sam informisan o zagarantovanosti tajnosti bolesničkog kartona koji će biti popunjavan tokom studije i korišćen samo u svrhu unapređenja zdravlja ljudi. Isto tako mi je rečeno da mogu da prekinem učešće u ispitivanju u svakom trenutku bez bilo kakvih posledica po moje lečenje. Pristajem da učestvujem u istraživanju radi poboljšanja i unapređenja zdravlja ljudi, bez bilo kakve materijalne nadoknade.

Potpis ispitanika: \_\_\_\_\_

U Novom Sadu, dana \_\_\_\_\_