



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Ђ. Ђоковић

ПОВЕЗАНОСТ СЕРУМСКЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ 25-ХИДРОКСИ
ВИТАМИНА D И ГУСТИНЕ КОСТИЈУ КОД ЖЕНА СТАРИЈИХ ОД 35
ГОДИНА

Докторска дисертација

Ментор др сци. мед. Јасмина Миловановић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Јелена Ђоковић	
Датум и место рођења: 17.05.1985. Крагујевац, Република Србија	
Садашње запослење: апотека "Amica Pharm" Крагујевац	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Повезаност серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и густине костију код жена старијих од 35 година	
Број страница: 199	
Број слика: /	
Број библиографских података: 476	
Установа и место где је рад израђен: Интерна клиника, Клинички центар Крагујевац	
Научна област (УДК): Медицина	
Ментор: др сци. мед. Јасмина Миловановић, ванредни професор	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 06.12.2016. године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-456/32 од 03.05.2017. године	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
1. проф. др Александра Лучић-Томић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник	
2. проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармација, члан	
3. доц. др Валентина Николић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан	
4. проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан	
5. доц. др Мирјана Веселиновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан	

Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:

1. Проф. Александра Томић-Лучић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник,
2. Доц. др Оливера Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан
3. Проф. др Радмила Величковић Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармакокинетика, члан

Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: Хиповитаминоза витамина D је данас широко заступљена у свету, у свим старосним групама са већом преваленцом код жена, посебно код жена са остеопенијом и примарном остеопорозом. Циљ ове студије јесте развијање популационог фармакокинетичког (ПФК) модела клиренса 25-хидрокси витамина D, идентификација и квантификација фактора који га одређују код жена старијих од 35 година, као и испитивање корелације серумских 25-хидрокси витамина D са вредностима минералне густине костију, годинама старости, квалитетом живота, степеном депресивности и присуством страха код испитаница.

Испитаници и Методе истраживања: Студија је обухватила 224 жене старије од 35 година, које су долазиле на остеодезитометријски преглед у Клинички центар Крагујевац. Испитавана популација подељена је у три подгрупе: жене у пременопаузи (од 35. године до менопаузе), жене у пери и/или постменопаузи (од менопаузе до 65. године живота) и старије жене (од 65. до 75. године живота). У ПФК анализи коришћен је софтверски програм НОНМЕМ (Non linear mixed effect model) и АДВАН 1 субрутина. Бројни демографски, клинички, биохемијски, хормонски и медикаментозни подаци су испитивани као фактори варијабилности клиренса 25-хидрокси витамина D у све три субпопулације жена. Процена депресије, стаха и квалитета живота је вршена употребом валидираних и културолошки адаптираних упитника.

Резултати: Добијене се средње, популационе вредности клиренса 25-хидрокси витамина D, идентифицирани су и квантификовани фактори који га одређују, као и вредности интер- и интраиндивидуалне варијабилности у испитиваним субпопулацијама. За валидацију добијених ПФК модела коришћена је екстерна валидација. Показано је постојање корелације између серумских концентрација 25-хидрокси витамина D са квалитетом живота код жена са редовним менструалним циклусом; минералном густином костију и вредностима Т скорa добијених DXA методом и квалитетом живота код жена у постменопаузи.

Закључак: Добијене фармакокинетичке једначине могу се користити у доношењу препорука за кориговање и индивидуализацију дозе овог витамина у виду суплементације код жена у Србији, у три њихова значајна животна периода.

Кључне речи: серумска концентрација, 25-хидрокси витамин D, минерална густина костију, популациона фармакокинетика, NONMEM

ABSTRACT

Introduction: Hypovitaminosis of vitamin D is widely spread over the world, throughout every age group, but, dominantly present in female population with osteopenia and primary osteoporosis. The aim of this study was to develop a population pharmacokinetics (PFK) model of 25-hydroxy vitamin D clearance, identification and quantification of factors defining it in female's population older than 35 years, as well as to research the correlations between serum concentration of 25-hydroxy vitamin D and values of bone density, age, life quality, depression level and presence of fear among the study subjects.

Patients and Methods: The study population consisted of 224 women older than 35 years, which were taking osteodensitometry tests in Clinical center in Kragujevac. Test population was divided into 3 subgroups: women in premenopause (from 35 years to menopause) and women in peri- and/or in postmenopause (between menopause and 65 years of age) and elderly women (from 65 to 75 years of age). For PFK analysis a NONMEM (Non linear mixed effect model) software was used as well as ADVAN 1 subroutine. Numerous demographic, clinical, biochemical, hormonal and medicamental data were investigated as factors of clearance variability of 25-hydroxy vitamin D for all three female subpopulations.

Results: Middle values for population clearance of 25-hydroxy vitamin D were acquired, its defining factors were identified and quantified, as well as inter- and intraindividual variables for study population. For validation of acquired PFK models external validation was applied. Correlation between serum concentration of 25-hydroxy vitamin D and life quality for females with regular period, mineral bone density and values for T score from DXA method and life quality for females in postmenopause, was confirmed.

Conclusion: Defined pharmacokinetic equations can be used for making recommendation, corrections and individualization of vitamin D doses, through supplementation, for women in Serbia, during their three most important life periods.

Key words: Serum concentration of 25-hydroxy vitamin D, bone density, population pharmacokinetics, NONMEM.

ЗАХВАЛНИЦА

Неизмерну захвалност дугујем својој менторки, дивној особи проф. др Јасмини Миловановић, због гестова, помоћи око рада, савета у животу који су ми јако пуно значили. На крају свега, мојој професорки могу рећи велико "хвала" иако је то премало за оно што је учинила за мене.

Велику захвалност упућујем и Интерној клиници у Крагујевцу и запосленима на одељењу реуматологије као и проф. др Александри Томић Лучић за неизмерну помоћ током истраживања.

Захваљујем се и и проф.др Радмили Величковић Радовановић и Фармацеутском Факултету у Нишу.

Најискренију захвалност упућујем свом супругу Синиши, оцу Ђоку, снаји и мојим братанцима Алекси и Павлу.

Ову докторску дисертацију посвећујем најсветлијим тачкама у свом животу, свом брату Љубомиру и својој покојној мајци. Овом докторском дисертацијом испуњавам последњу жељу своје мајке а све уз несебичну и безграничну помоћ мог рођеног брата.

САДРЖАЈ

1	УВОД	10
1.1	Хемијска структура, облици и извори витамина D	10
1.2	Фармакокинетика витамина D.....	13
1.2.1	Апсорпција	13
1.2.2	Дистрибуција.....	15
1.2.3	Метаболизам.....	16
1.2.4	Елиминација	17
1.3	Процена статуса витамина D	17
1.3.1	Хиповитаминоза витамина D.....	19
1.3.2	Хипервитаминоза витамина D.....	22
1.3.3	Методe за мерење серумске концентрације 25-хидрокси витамина D	24
1.4	Ефекти витамина D у одржавању минералне хомеостазе и коштаног здравља	26
1.5	Остеопороза и остeопенија	29
1.5.1	Подела остeопорозе	30
1.5.2	Клиничка слика и фактори ризика	32
1.5.3	Методe за мерење минералне густине костију.....	36
1.5.4	Лечење остeопорозе и остeопеније	39
1.6	Улога витамина D у превенцији и лечењу остeопеније и остeопорозе	40
1.7	Последице остeопорозе и превенција очувања коштаног здравља.....	42
1.7.1	Последице остeопорозе	42
1.7.2	Превенција очувања коштаног здравља	43
1.8	Ефекти витамина D на некоштано здравље.....	46
1.9	Витамин D и ментално здравље	52
1.9.1	Витамин D и присуство анксиозности.....	53
1.9.2	Витамин D и присуство депресије.....	54
1.10	Витамин D и квалитет живота	56
1.11	Популациона фармакокинетика	58
2	ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	61
2.1	Циљеви истраживања	61
2.2	Хипотезе истраживања.....	62
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	63
3.1	Врста студије.....	63

3.2	Испитаници.....	63
3.3	Анализе крви	66
3.4	Мерење серумске концентрације 25-хидрокси витамина D	67
3.5	Популациона фармакокинетичка анализа	67
3.6	Упитници	70
3.6.1	Епидемиолошки упитник	71
3.6.2	Упитник за процену квалитета живота (QUALEFFO-41)	71
3.6.3	Упитник за процену квалитета живота (WHOQOL-BREF)	72
3.6.4	Беков упитник за самопроцену депресивности (BDI)	74
3.6.5	Упитник за процену страха од медицинских поступака (MFS)	75
3.7	Статистичка обрада података	76
4	РЕЗУЛТАТИ.....	78
4.1	Демографске карактеристике испитиване популације.....	78
4.2	Популациона фармакокинетичка анализа	80
4.2.1	Популациона фармакокинетичка анализа код жена у циклусу	81
4.2.1.1	Базни ПФК модел 25-хидрокси витамина D	81
4.2.1.2	Резултати изградње пуног ПФК модела	85
4.2.1.3	Изградња коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.....	88
4.2.1.4	Валидација коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.....	90
4.2.2	Популациона фармакокинетичка анализа код жена у постменопаузи	91
4.2.2.1	Базни ПФК модел 25-хидрокси витамина D	91
4.2.2.2	Резултати изградње пуног ПФК модела	94
4.2.2.3	Изградња коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.....	98
4.2.2.4	Валидација коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.....	100
4.2.3	Популациона фармакокинетичка анализа код старијих жена	102
4.2.3.1	Базни ПФК модел 25-хидрокси витамина D	102
4.2.3.2	Резултати изградње пуног ПФК модела	105
4.2.3.3	Изградња коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.....	108
4.2.3.4	Валидација коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.....	111
4.3	Процена статуса витамина D	112
4.3.1	Процена статуса витамина D код жена у циклусу	112
4.3.2	Процена статуса витамина D код жена у постменопаузи	113
4.3.3	Процена статуса витамина D код старијих жена	115

4.4	Анализа квалитета живота	116
4.5	Анализа присуства депресије.....	118
4.6	Анализе процене страха од медицинских поступака	119
4.7	Анализа корелације између серумских концентрација 25-хидрокси витамина D и минералне густине костију (Z или T скорa), годинама старости, квалитетом живота, присуства страха и депресивности у испитиваним субпопулацијама жена старијих од 35 година.....	120
5	ДИСКУСИЈА.....	125
6	ЗАКЉУЧАК.....	138
7	ЛИТЕРАТУРА.....	140

1. УВОД

1.1 Хемијска структура, облици и извори витамина D

Витамин D припада групи липосолубилних витамина, поред витамина A, E и K. Многобројна научна истраживања, која су спроведена последњих деценија, су базирана на испитивању различитих облика витамина D због његових многобројних улога које остварује у организму (Milovanovic, 2017). Прва научна истраживања која су се односила на испитивање улоге овог витамина у хуманом организму су започета још у XX веку, када је и доказан његов изузетно важан значај у минерализацији костију и развоју скелетног система. Витамин D је касније коришћен и за превенцију губитка коштане масе која за последицу има настанак прелома (Autier et al. 2014; Hosein-nezhad et al. 2013).

Витамин D је по својој структури секостероидни молекул и представља дериват холестерола. Данас су познато више облика овог витамина али за хумани организам најзначајнији физиолошки ефекат остварују две форме: витамин D2 тј. ергокалциферол и витамин D3 тј. холекалциферол (Јанковић, 2016).

У хуманој популацији главни егзогени извори витамин D3 су намирнице животињског порекла које су богате овим витамином, а које се уносе храном (рибље уље, морска риба: лосос, харинга, скуша, туна, сардине, бакалар, јаје односно жуманце, јунећа цигерица, печурке) као и његови данас доступни бројни суплементи. Такође, овај витамин се синтетише и у кожи током излагања сунцу тј. под дејством ултраљубичастих (УВБ) зрака, што представља ендогени извор овог витамина и чини га јединственим међу целокупном групом витамина (Bosomworth, 2011; Goldstein, 2009). Насупрот овоме, витамин D2 могу произвести само одређени микроорганизми као што су гљивице и фитопланктони (Vodnar et al. 2010; Vodnar et al. 2007) и присутан је у намирницима биљног порекла. Овај облик витамина се такође може синтетисати излагањем сунчевој светлости при чему је полазна супстанца ергостерол, док је код

витамина D3 то 7-дихидроксихолестерол. На основу ових чињеница може се рећи да се витамин D уноси путем исхране и суплемената или апсорбује из коже.

Витамин D у хуманој популацији се транспортује у крвоток помоћу својих протеинских носача односно ДБП (vitamin D binding protein) транспортера (Lewis et al. 2010; Nnoaham et al. 2008).

Након транспорта овог облика витамина до јетре, долази до његове конверзије у 25-хидрокси витамин D или 25(OH) витамин D. Овај облик, односно главни циркулишући метаболит, се сматра главним показатељем концентрације витамина D код појединца (Ginde et al. 2009). Он се даље транспортује до бубрега где подлеже другој хидроксилацији, при чему се синтетише 1,25(OH)₂ витамин D који је биолошки активан (Ginde et al. 2009). 1,25(OH)₂ витамин D остварује много физиолошких улога, које се првенствено огледају у хомеостази калцијума и фосфата, али је важан и за апсорпцију одређених олигоелемената који су неопходни за живот, а то су гвожђе, бакар, цинк, селен и молибден (Lewis et al. 2010; Nnoaham et al. 2008).

Витамин D2 и витамин D3 се међусобно разликују по хемијској структури, биолошкој активности и пореклу. Витамин D2 има једну двоструку везу више од витамина D3, позиционираној између 22. и 23. угљениковог атома, као и метил групу на 24. угљениковом атому. Ове разлике у хемијској структури доводе до разлика у биолошкој активности, односно витамин D3 показује неколико пута (3-4 пута) већу биолошку активност у односу на D2. Када говоримо о пореклу, као што претходно поменуто, ергокалциферол је присутан у намирницама биљног порекла, док холекациферол се налази пре свега у намирницама животињског порекла (Vieth, 2005; Kimball et al. 2008).

Витамин D3 настаје ендегеном реакцијом из 7-дехидрохолестреола као резултат реакције са сунчевом светлошћу, при таласној дужини од 290 до 320 нанометара. Након излагања УВБ зрачењу код 7-дехидрохолестреола долази до кидања хемијске везе између угљеникових атома на позицији 9 и 10, што доводи до формирања двоструке везе на позицији 10 и 19 резултујући синтезом провитамина D3 (Vitamin D editorial, 2008).

Настали провитамин D₃, подлеже термалној изомеризацији која се одиграва у хуманом организму и конвертује у витамин D₃ или провитамин, који је термостабилан. Истраживања показују да се за 8 часова до 80% провитамина D₃ конвертује у витамин D₃ (Hollick, 1995).

Сматра се да је излагање сунцу у трајању од 15 мин еквивалентно дози од 200 ИЈ (интернационалних јединица), а поновним излагањем може се достићи доза од 10000 ИЈ дневно (Stamp et al. 1997). Синтеза витамина D₂ се одвија на идентичан начин као и синтеза витамина D₃. Полазна супстанца је ергостерол који под утицајем УВБ зрачења прелази у провитамин D₂, термонестабилан молекул, који се процесом изомеризације конвертује у витамин D₂ (Wacker and Holick, 2013).

Када се процес синтезе витамина D у кожи заврши, он прелази у екстрацелуларни простор где се везује за протеине и процесом дифузије доспева у циркулацију. Мишићно и масно ткиво у овом процесу представљају један вид депоа за синтетисани витамин D, одакле се услед недостатка овог витамина у организму потребна количина отпушта. Количина витамина D која се може ускладиштити у поменутиим депоима није прецизно дефинисана (Ciriani et al. 2014).

Треба напоменути, да многи фактори утичу на концентрацију витамина D синтетисаног путем сунчеве светлости, а ти фактори се односе на географско подручје, доба године, атмосферски притисак, количину меланина у кожи, време излагања сунцу. Такође, на ендогено стварање витамина D утичу и фактори који блокирају сунчеву светлост проласком кроз прозор или употребом средстава за заштиту од сунчеве светлости. Утицај сунчеве светлости на синтезу витамина D се најбоље може уочити на примеру географског подручја код нпр. северних земаља, попут Канаде или скандинавских земаља у Европи. У Канади услед мање изложености сунцу током зимског периода око 40% популације има концентрацију витамина D испод 20 ng/ml у серуму (Brooks et al. 2017). Новорођенчад, као и старија популација која је недовољно изложена сунцу, представљају вулнерабилне популације код којих најчешће треба да се врши надокнада односно суплементација витамина D до постизања његове оптималне серумске концентрације од 30 ng/ml 25(OH) витамина D, дефинисане смерницама Светске Здравствене Организације (СЗО) (Wimalawansa, 2012).

Витамин D се у литератури изражава тежинским или интернационалним јединицама (ИЈ). Једна ИЈ износи 0,025 микрограма, односно 1 μg витамина D износи 40 ИЈ витамина D (Kimball et al. 2008).

1.2 Фармакокинетика витамина D

Фармакокинетика витамина D је данас у потпуности позната, захваљујући бројним студијама спроведеним са радиоактивним обележеним обликом овог витамина, на основу чега је испитана апсорпција, дистрибуција, метаболизам и елиминација овог витамина у организму.

1.2.1 Апсорпција

Витамин D (D2 и D3) се апсорбује у танком цреву (Brown et al. 2015). Истраживања су показала да је апсорпција витамина D3 код здравих испитаника у распону од 62,4% до 91,3% (Thompson et al. 1996). Под дејством желудачне киселине на поменуте депое, смештене у лумену таконог црева, долази до процеса емулговања и формирања мицела, које у себи садрже липиде и витамин D, након чега један део мицела дифундује у ентероците (Razzaque, 2014). Након завршетка претходног процеса, егзогени облик витамина D се складишти у хиломикронима и транспортује до јетре. Део витамина D из хиломикрона прелази у масно ткиво или у скелетне мишиће (Razzaque, 2011). Остатак хиломикрона који је смештен у јетри се везује за специфичне протеинске носаче, ДБП који омогућавају улазак витамина D у хепатоците и олакшава његов транспорт до различитих ткива у организму.

Тренутна сазнања која се односе на апсорпцију витамина D и његово прелажење кроз мембрану ентероцита заснивају се на експерименталним истраживањима до којих се дошло средином 1970. године (Hollander et al. 1984; Seo et al. 2008; Elin et al. 2010). Она су показала линеарну зависност између стопе апсорпције витамина D и интралуминалне концентрације витамина D.

Истраживања која су спроведена на животињама (пацовима) доказала су да се стопа апсорпције повећава са повећањем протока перфузата тј. повећањем концентрације водоникових јона што смањује отпорност ћелијске мембране и поспешује дифузију мицела. Ово указује да до повећане апсорпције витамина D долази кроз процес пасивне дифузије.

Одговарајућим лабораторијским експериментима на животињама, дуги низ година је проучаван механизам заснован на механичком процесу смањене апсорпције витамина D, али је такође испитиван утицај појединих фактора, као што је присуство уремије (Kramer et al. 2003), утицаји (Kramer et al. 2003), као и процеси старења (Weglicki et al. 2010; Quamme, 2000; Touyz, 2004). Закључак до којег се дошло током ових истраживања јесте да старење не утиче на апсорпцију витамина D, за разлику од осталих поменутих фактора (Chamngpol et al. 2002; Quamme, 2000).

Апсорпција витамина D, која се одвија у слезници танког црева је била предмет студије које су спровели Lorentzon и Daniels (Houillier, 2014). Ово истраживање заснивало се на уносу радиоактивно обележеног холекалциферола у интестинални тракт пацова. Витамин D је у организам пацова уношен и путем суплемената у различитим концентрацијама. Резултати су показали да код пацова који су имали ниску концентрацију витамина D долази до повећања серумске радиоактивности, док код пацова који су имали оптималне концентрације витамина D, није примећен овај ефекат. Ови резултати су довели до закључка да недостатак витамина D може бити проузрокован смањеном апсорпцијом или различитим процесима односно факторима у интестиналном тракту.

Истраживање спроведено од стране Sitrin и Bengoa је показало да се 25(OH) витамин D, метаболит који настаје у јетри, боље апсорбује у организму од холекалциферола. Испитивану популацију чиниле су здраве особе, као и популација пацијената који су имали хроничну холеостазу јетре. Иако ови механизми нису у потпуности јасни, друга истраживања спроведена на хуманој популацији показују да интестинална апсорпција 25(OH) витамина D зависи од концентрације хиломикрона, (de Rouffignac et al. 1994; Naq et al. 2017).

Студије спроведене на експерименталним моделима, тридесет година након првих сазнања о апсорпцији витамина D у интестиналном тракту, довела су до закључка да холестерол и витамин D имају сличне апсорпционе механизме (Razzaque, 2009; Nellis et al. 2016; Caspi et al. 2014).

Фактори који утичу на синтезу холестерола, као што су фитостероли као и дуги ланци масних киселина, истовремено утичу на смањење апсорпције витамина D (Наџ et al. 2016; Caspi et al. 2014; Welsh, 2017).

Поред овога, бројни други фактори могу да утичу на процес апсорпције овог витамина, као што су присуство малапсорптивног синдрома, болести јетре и панкреаса, цистична фиброза, Кронова болест, бубрежна инсуфицијенција као и врста исхране (Fisher et al. 2009; Mailhot, 2012; Satia et al. 2015).

1.2.2 Дистрибуција

Егзогено унет витамин D се након апсорпције, у облику хиломикрона преноси лимфом до путем системске циркулације до јетре, где се одвијају први процеси његовог метаболизма. Дистрибуција овог витамина остварује се његовим везивањем за свој главни транспортни протеински носач, ДБП. Транспорт ендогено синтетисаног облика витамина D се такође одвија доминантно путем везивања за ДБП везујући протеин, али мањим делом се везује и за албумине плазме (Radlovic et al. 2012; Holick, 2013; Kennedy et al. 2013). Витамин D везујући протеин тј. ДБП се карактерише различитим афинитетом за витамин D и његове метаболите. Овај афинитет линеарно опада следећим редоследом: 25-хидрокси витамин D, затим 1,25-дихидрокси витамин D и на крају витамин D (Dusso et al. 2005). Такође, како је ДБП главни протеин одговоран за транспорт витамина D, важно је истаћи да различити фактори могу смањити његову дистрибуцију, као што су оштећење јетре, присуство нефротског синдрома или малнутриције код људи. Са друге стране, хормонска терапија са естрогеном или током трудноће код жена до повећања дистрибуције витамина D (Dusso et al. 2005).

1.2.3 Метаболизам

Метаболизам витамина D се доминантно одвија у јетри и бубрезима и укључује процесе хидроксилације који се одвијају на различитим позицијама угљеникових атома. Два главна ензима која су одговорна за ове процесе су из групе оксидаза цитохрома П-450.

Прва је 25 α -хидроксилаза односно CYP27A1 ензимска изоформа цитохрома П-450, док је други ензим 1 α -хидроксилаза, односно CYP27B1. Њихови називи управо говоре о позицијама где се врши додавање хидроксилних група.

Прво место ензимске трансформације одвија се у јетри на позицији 25. Ц атома витамина D при чему настаје главни циркулишући метаболит тј. 25(OH) витамин D3 или калцидиол (Јанковић, 2011). Овај процес је исључиво завистан од количине супстрата, добија се кинетиком првог реда и није хормонски регулисан, што је један од разлога да се на основу њега процењује статус витамина D у хуманом организму (Hosseini-nezhad et al. 2013). Истраживања су показала да две трећине укупно унетог витамина D подлеже процесу првог метаболизма у јетри (Kimball et al. 2008). Настали калцидиол је неактивна форма овог витамина и поред јетре, као главном метаболичком органу, ствара се у мањој количини и у кожи, танком цреву и бубрезима услед присуства ензима CYP27A1.

За настајање активне форме витамина D, или његове 1,25-дихидрокси форме тј. 1,25(OH)₂ витамин D (кацитриола) потребна је и друга хидроксилација на позицији 1Ц. Најпре се калцидиол везује за ДБП протенске носаче и доспева до бубрега где се прво филтрира, а затим подлеже процесу тубуларне реапсорпције која се одвија у проксималним бубрежним тубулима. Истраживања су показала да процес ендцитозе комплекса калцидиол-ДБП олакшава присуство рецептора за кубулин и мегалин експримираних на површини ћелија (Jones et al. 2014). Калцитриол настаје под дејством ензима 1 α -хидроксилазе или CYP27B1 ензимске изоформе и представља активну форму витамина D (Стефановић et al. 2008; Kimball et al. 2008).

Ова друга метаболичка трансформација се код човека доминантно одвија у бубрезима, али и у другим органима и ћелијама, као што су: плацента, колон, простата, плућа, мозак, остеобластима, кератиноцитима, макрофагама, Т-лимфоцитима (Radulović et al. 2012). Такође, важно је напоменути да је ова друга хидроксилација и ендокрино регулисана, дејством два хормона који делују на супротан начин: паратиреоидни хормоном (ПТХ) и фибробласту сличан фактором раста (fibroblast like growth factor 23 - ЕГФ 23). Постоји негативна повратна спрега између њеног одвијања и ПТХ, односно активисана је паратиреоидним хормоном, хипокалцијемijом и хипофосфатемijом. Са друге стране, синтеза активне форме витамина D у бубрезима инхибирана је хиперфосфатемijом, ЕГФ 23 и самим калцитриолом (Milovanovic, 2017; Kovesdy et al. 2013).

Катаболизам насталих метаболита витамина D одвија се учешћем више ензима, пре свега 24-хидроксилазе (CYP24A1) и CYP3A4 ензимске изоформе, при чему настају бројни неактивни метаболити: калцитронска киселина, 26,23-лактон, други билијарни метаболити (Milovanovic, 2017).

1.2.4 Елиминација

Елиминација витамина D као и његових неактивних метаболита одвија се највећим делом (90%) путем жучи и фецеса, док се мали део излучује урином (DeLuca, 2014; Shimoyamada et al. 1997).

1.3 Процена статуса витамина D

Серумска концентрација главног циркулишућег метаболита тј. 25(ОН) витамина D, чија концентрација зависи од укупне количине витамина D (унетог храном и ендогеног–синтетисаног), представља најбољи показатељ статуса витамина D у хуманом организму. Од 2005. године већина експерата, ендокринолога и истраживача сматра да вредност серумске концентрације од 75 nmol/l (30mg/l) представља доњу граничну, физиолошку вредност, док су за његов адекватан, терапијски распон препоручене вредности од 75-250 nmol/l (30-100 mg/l) (Zhang et al. 2010).

У процени граничне, доње вредности која треба да укаже на присуство хиповитаминозе и направи јасну границу од адекватне серумске концентрације 25-хидрокси витамина D вођене су бројне дебате у научним круговима. Експериментална истраживања су показала на постојање инверзне корелације између серумске концентрације калцидиола (у распону од 70-100 nmol/l) и ПТХ (присутан у референтним вредностима) (Lips, 2007). Такође, студије су показале да до повећања интестиналне аспорпције калцијума (од 45 до 65%) долази када је серумска концентрација калцидиола у распону 50-80 nmol/l (Heaney et al. 2003).

Спроведена истраживања на здравим волонтерима такође су указала да вредности испод 30 mg/l калцидиола указују на присуство инсуфицијенције (у распону од 21-29 mg/l), док гранична вредност за постојање дефицијенције износи 20 mg/l (Holick et al. 2011; Malabanan et al. 1998). Ове наведене вредности, односно распони серумских концентрација калцидиола су у сагласности са препорукама које данас даје Амерички Институт за Медицину (IOM, Institute of Medicine, 2010).

IOM препоручује да препоручени дневни унос (RDA, Recommended Daily Allowance) витамина D путем исхране треба да износи 600 ИЈ за одрасле до 70 година, и 800 ИЈ за старије од 75 година, ако узмемо у обзир да није било излагања сунцу или да је оно било минимално. Горња препоручена граница дневног уноса овог витамина износи 4000 ИЈ (IOM, Institute of Medicine, 2010).

Пацијенти који додатно узимају витамин D у виду суплемената, такође, треба да узимају и суплементе на бази калцијума, да би се остварило везивање калцијума и 1,25(OH)2D за коштани систем (Chen et al. 2014; Du et al. 2015; Liu et al. 2011; Meckel et al. 2016).

Са друге стране, данас се такође бележи прекомерно уношење витамина D услед његових бројних физиолошких ефеката које овај витамин остварује у организму. Спроведено истраживање на приближно 40 000 људи, просечне старости 47 година показало је да је дневни унос овог витамина у виду суплементације био већи или једнак ≥ 1000 ИЈ код 18,2% популације, док је 3,2% популације имало дневни унос већи од 4000 ИЈ (Rooney et al. 2017).

Иако су многа истраживања истакла могуће предности витамина D, треба напоменути да дневни унос који је већи од 4000 ИЈ повећава ризик од хипервитаминозе, која је повезана са повећаним ризиком од прелома костију при паду (Sanders et al. 2010), као и стварања калцификата и многим другим штетним ефектима по опште здравље људи (Wallace et al. 2011).

1.3.1 Хиповитаминоза витамина D

Хиповитаминоза витамина D (дефицијенција и/или инсуфицијенција) је последње деценије веома забележена у свим старосним популацијама и на свим континентима.

Преваланца хиповитанозе овог витамина је већа код жена у односу на мушкарце, посебно код жена са остеопорозом и остеопенијом (Fan et al. 2013). Подаци из литературе показују да дефицијенција и инсуфицијенција овог витамина достиже пандемијске размере и да је присутна код око једног билиона људи (Holick, 2007).

Основни узрочници настанка дефицијенције витамина D јесу недовољно излагање сунчевој светлости и неадекватан нутритивни унос овог витамина.

Такође, бројне студије указују да поред наведених, постоје и други фактори који утичу на присуство хиповитаминозе витамина D, као што су: географско подручје становања, годишње доба, старост, гојазност, стил облачења (ношење одеће током сунчаних месеци), пол, употреба крема за сунчање са заштитним фактором, недовољно обогаћивање намирница, тип коже, као и здравствени статус особе (присуство бубрежних или обољења јетре, малапсорпција) (Engelsen, 2010; Tsiaras et al. 2011; Nair-Shalliker et al. 2013). Ипак, како је најважнији извор витамина D3 његова ендогена продукција која се одвија у кожи под дејством сунчеве светлости, најзначајнији фактори који доприносе настанку хиповитаминозе јесу време излагања сунчевој светлости и угао под којим сунчеви зраци падају, односно географско подручје становања (Стефановић et al. 2008; Tsiaras et al. 2011). Литературни подаци су показали да у земљама које се налазе изнад 35° географске ширине током јесењих и зимских месеци се не може извршити довољна синтеза витамина D из ових разлога. Управо у тим земљама је забележена и висока преваленца дефицијенције овог витамина која је у распону од 50-97% (Bandeira et al. 2006).

Земље балканског полуострва припадају овом географском подручју. Спроведене студије указују на значајно присуство дефицијенције у земљама окружења у следећем проценту: 49% код одраслих у Бугарској (Gerova et al. 2014; Borissova et al. 2013), 29,6% код жена у постменопаузи у Хрватској (Laktasić-Zerjavić et al. 2013), 26,1% у Румунији и у Србији код младих одраслих, здравих особа од 88,37% (Milovanovic et al. 2015). Истраживање које је спроведено као кохортна студија у Амстердаму на популацији старијој од 55 година је показало да је код испитаника старијих од 65 година серумска концентрација 25(OH)D била испод 50 nmol/l што представља 48% укупне популације (vanSchoog et al. 2014). Испитивање спроведено на око 7000 жена у постменопаузи са 7 различитих континенета, указује да је половина испитаница у зимском периоду имала серумску концентрацију 25(OH)D мању од 50 nmol/l (Kuchuk et al. 2009). Присуство дефицијенције витамина D забележено је и у целој Европи. У Енглеској у општој популацији одраслих она износи 87,1%, у Италији 17%, док је у Шпанији забележена код скоро трећине популације (33,9%) (Gonzalez-Molero et al. 2011; Hintzpeter et al. 2008; Nurpponen et al. 2007; Carnevale et al. 2001).

Код популације старијих особа ове бројке су значајно веће и достижу вредност од 75% према извештају Интернационалне фондације за остеопорозу (Mithal et al. 2009). Друга вунерабилна популација где је забележено значајно присуство хиповитаминозе у Европи јесу адолесценти који живе у великим градовима односно урбаним срединама. Резултати спроведене студије пресека код ове популације указују на присуство хиповитаминозе код 80% овоих испитаника, док 40% њих је имало дефицијенцију витамина D. Многобројна истраживања широм света бележе присуство дефицијенције овог витамина и код деце. У Француској је забележена дефицијенција витамина D код новорођене деце у 63,7%, у Аустралији од 40%, док студија спроведена у Ирану бележи вредности од 94% код новорођене деце (Zeghoud et al. 1997; Bowyer et al. 2009; Maghbooli et al. 2007).

Са повећењем година старости долази до смањења концентрације главног прекурсора витамина D3, 7-дихидроксихолестерола, што доводи до редукције скоро за 25% у његовој ендогеној продукцији код старијих особа (преко 70.године) (Chen et al. 2007).

Данас је општа јавност упозорена и здравствено едукована када је реч о штетном утицају сунчеве светлости при високом индексу УВ зрачења и потреби да се користе препарати са заштитним фактором. Међутим, претерана употреба ових препарата и формирање ставова о том да је излагање сунцу штетно такође утиче на редукцију синтезе витамина D3 и појаву његове дефицијенције (Kalra et al. 2015; Kotta et al. 2015).

Бројна истраживања данас указују да је пол један од фактора хиповитаминозе витамина D, бележећи више серумске нивое калцидиола код особа мушког пола пружајући објашњење да жене садрже већу количину масног ткива који је депо овог витамина (Novsepian et al. 2011). Тип коже, као и њена тамна пребојеност, карактеристична за поједине расе људи, су фактори који су такође значајни за присуство хиповитаминозе (Chen et al. 2007).

Такође, хиповитаминоза витамина D је уобичајено присутна код пацијената са малапсорпционим синдромом и пацијената код који је присутан неки облик бубрежне инсуфицијенције (Holick, 2007). Међутим, недостатак витамина D је често присутан и код здравих одраслих особа које су имале неку ортопедску интервенцију и обухвата од 22% до 81,7% генерално здравих особа (Glowacki et al. 2008; Goula et al. 2015; Orsini et al. 2005). Пацијенти који су имали неку ортопедску трауму показују високу преваленцу ка хиповитаминози витамина D од 50% до 61% (Dey et al. 2017; Charuy et al. 1992) због чега је потребно обратити пажњу на недостатак витамина D у области ортопедије као и извршити оптимизацију његове концентрације код ових пацијената.

Недостатак витамина D је повезан са учесталошћу прелома код пацијената, тј. око 1,5 милиона прелома који се догоде у Сједињеним Америчким Државама (САД) се сматра да је проузроковано недостатком витамина D (Pettifor et al. 1996). Овај податак се односи на популацију старију од 50 година, при чему се процењује да ће 22% мушкараца и 47% жена из ове популације, имати остеопоротски прелом у току свог живота (Holick, 2007). Цена третмана пацијената са остеопоротичним преломом, износи око 6 милијарди долара годишње у Америци. Око 3,8 милијарди долара се утроше на лечење пацијената којима је дијагностикована остеопороза, а код којих није било прелома (Pettifor et al. 1996).

Пројекције у Европи везане за трошак санирања остеопорозе за 2050. годину износе 76,7 милиона евра. Данас су познати многобројни фактори ризика који могу довести до остеопоротичних прелома међу којима се убраја и дефицијенција витамина D (Gennari, 2001; Holick, 2006; Tosi et al. 2008). Према подацима Института за Медицину минимална серумска концентрација 25(OH)D које је неопходна за здравље костију треба да буде изнад 50 nmol/l.

На основу изнетих података може се рећи да је дефицијенција витамин D широко распрострањена у свету и у свим старосним групама. Као последица тешке дефицијенције код деце се јавља рахитис, док је код одраслих и старијих особа повезана са настанком остеомалације, остеопорозе и коштаних прелома (Holick, 2007; Јанковић, 2016; Стефановић et al. 2008).

1.3.2 Хипервитаминоза витамина D

До хипервитаминозе витамина D данас долази најчешће услед његовог прекомерног уноса путем суплементације и ређе, превеликим уносом фортификованих намирница. Серумска концентрација калцидиола изнад 250 nmol/l сматра се хипервитаминозом, док концентрација изнад 375 nmol/l (150 mg/l) се сматра токсичном (Alshahrani et al. 2013). Хипервитаминоза витамина D се манифестује појавом хиперкалцемије, хиперкалциурије, смањеним концентрацијама паратиреоидног хормона, као и последичним ремоделовањем кости код особе (Alshahrani et al. 2013; Song et al. 2014). Хиперкалцемија се на почетку карактерише симптомима жеђи и полиуријом, дехидратацијом, летаргијом а у екстремним случајевима и комом која може да се заврши и летално (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies 2016; Scientific opinion on the tolerable upper intake level of vitamin D, 2012). Тешки облици хиперкалцемије повезани су са калкулозом бубрега, калцификацијом рожњаче, конфузијом, срчаним аритмијама или застојем срца (Јанковић, 2016).

Међутим, скорија истраживања су показала да је употреба витамина D у виду суплементације данас изузетно велика и да до хипервитаминозе и интоксикације са овим витамином долази услед неадекватне, односно употребом превисоких доза које су присутне у фармацеутским препаратима.

Наиме, утврђене су значајне разлике између дозе која пише на декларацији производа и измерене концентрације у појединачном препарату (Davies et al. 2014). Проблем концентрације витамина D у фармацеутским препаратима је све чешћи узрок настале хипервитаминозе код људи. Koutkia и сарадници су забележили тешку хиперкалцијемiju и бубрежну инсуфицијенцију као последицу хипервитаминозе витамином D, код пацијената који су узимали додатну суплементацију путем фармацеутских производа у којима је концентрација витамина D премашивала концентрацију од 2000 ИЈ дневно (Koutkia et al. 2001).

Проблем адекватног дозирања витамина D путем суплементације показао се временом све већи. Студија која је спроведена на Новом Зеланду указала је на то да је од 14 спроведених инспекција количине витамина D у препаратима, у само 8 препарата количина витамина D одговарала је количини са декларације (Garg et al. 2013). Слично истраживање спроведено је и у САД. Закључак истраживања указује на одступање измерене концентрације витамина D у односу на наведену, која се налази у опсегу од 52 до 136% између таблета у истој бочици, и од 9 до 140% између различитих препарата (LeBlanc et al. 2013).

Прехрамбени производи обогаћени витамином D утичу на укупну концентрацију овог витамина у организму. Према извештајима, постоје регистровани случајеви хипервитаминозе као последица грешке у самом процесу производње тј. прекомереној концентрацији витамина D у прехранбеном производу (Holick, 2003). Спроведеним истраживањима одређених прехранбених производа утврђена је стварна концентрација витамина D, која се разликовала од оне коју је произвођач навео на декларацији (Araki et al. 2011). Конзумација млека код којег је накнадно утврђена недозвољено велика концентрација витамина D, проузроковала је хипервитаминозу код 56 особа, 41 особа је морала бити хоспитализована, док је код 2 особе исход био леталан (Blank et al. 1995). Све ово указује на значај успостављања функционалне контроле квалитета у процесу производње (Jacobus et al. 1992). Истраживања су показала да дневне дозе витамина D до 10 000 ИЈ резултују оптималним вредностима серумске концентрације 25(OH)D и не сматрају се токсичним код особа које нису довољно изложене сунчевој светлости (Alshahrani et al. 2013; Vieth, 1999).

Просечан дневни унос од 15 000 ИЈ даје серумску концентрацију од 300 nmol/l која се сматра токсичном и доводи до поремећаја метаболизма калцијума и фосфата (Kimball et al. 2008). Разматрање хипервитаминозе витамина D усмерено је ка заштити јавног здравља становништва, тако да је усвојено да је дневна доза од 4000 ИЈ горња препоручена гранична вредност, док је доза од 100 000 ИЈ на месечном нивоу токсична доза. Резултати спроведених клиничких студија указују да је безбедна дневна доза витамина D од 2000 до 4000 ИЈ дневно и те вредности су данас препоручене у Европи и Америци (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2012).

1.3.3 Методе за мерење серумске концентрације 25-хидрокси витамина D

Многобројне аналитичке методе су данас развијене за одређивање концентрације 25(OH)D у хуманом серуму или плазми. Калцидиол има дужи полуживот (око 3 недеље) и његова продукција је супстрат зависна, што су главни разлози да се овај метаболит, односно мерење његове концентрације, користи за процену статуса витамина D код људи. Са друге стране, активна форма 1,25(OH)₂ витамин D има значајно краћи полуживот (4 часа) и његова концентрација у организму је хормонски регулисана (Farrell and Herrmann, 2013).

Потреба за мерењем овог метаболита, на основу кога се одређује статус витамина D, се последњих деценија значајно повећала услед високе преваленце дефицијенције овог витамина широм света као и његових многобројних физиолошких улога у организму (van Schoor and Lips, 2011; Cavalier and Souberbielle, 2018). Подаци указују да је мерење концентрације калцидиола у клиничким лабораторијама повећано за 80-90% годишње у САД-у, док је у Аустралији забележено повећање од 100 пута током десетогодишњег периода (од 2000. до 2010. године) (Singh, 2008; Australian Government, Department of Health and Ageing, 2011). Сличан тренд забележен је и у Европи, односно потреба тржишта за мерењем концентрације 25-хидрокси витамина D је све већа.

Прве методе за мерење 25(OH)D развијене су почетком седамдесетих година прошлог века и биле су засноване на способности компетитивног везивања за протеине коме је претходила течна екстракција.

Крајем исте деценије дошло је до развоја првих хроматографским метода, а затим имунохемијских метода међу којим је прва била радио имуно есеј (RIA, radioimmunoassay). Потом је уследио даљи развој имунохемијских метода, код којих су антитела обележена хемилуминисцентним супстанцама (CLIA) или ензимима (EIA) (Wallace et al. 2010).

Прве аналитичке методе биле су мануалне, а затим су све веће потребе тржишта условиле развој аутоматизованих метода за мерење концентрације 25(OH)D у хуманом серуму или плазми.

Две главне аналитичке технике које се користе у лабораторијама су конкуретне имунохемијске и хемијске аналитичке методе. У имунохемијске аналитичке методе спадају RIA, електро хемијска луминисценција, хемијска луминисценција, CLIA, EIA, имуно тестови (CMIA) и конкуретно протеинско везивање (Farrell and Herrman, 2013). Већина имунохемијских метода је данас потпуно аутоматизована, комерцијално доступна од различитих произвођача, и има широку употребу у лабораторијама. Хемијске методе засноване су на хроматографском раздвајању, а затим на неимунолошкој директној детекцији. Ова метода се обавља на апарату за течну хроматографију високих перформанси која користи ултраљубичасто зрачење (HPLC-UV) или електрохемијски детектор и која се може комбиновати са масеном спектрометријом, (LC-MS/MS), тандем масена спектрометрија (Guarantor et al. 2010). Хроматографска метода (HPLC) је прецизнија и сензитивнија аналитичка метода од имуноесеја, док се златним стандардом данас сматра LC-MS/MS метода за мерење серумске концентрације 25(OH) витамина D (Elsenberg et al. 2017; Enko et al. 2015).

У последњих неколико деценија мерење серумске концентрације 25(OH)D представља велики изазов за клиничке лабораторије, због великих варијација у резултатима, што има за последицу погрешно тумачење концентрације витамина D у организму (Denimal et al. 2014; Black et al. 2015; Sempos et al. 2016; Elsenberg et al. 2017). Услед значајних разлика у измереним концентрацијама витамина D усвојени су одговарајући системи у циљу провера квалитета примењене технике мерења и стандардизације методе (Wallace et al. 2010).

Како би се избегли проблеми одређивања концентрације 25(OH) D извршена је његова стандардизација у 2010 години. Национални институт за здравство (The National Institutes of Health Office of Dietary Supplements (NIH ODS)) иницирао је програм стандардизације витамина D (VDSP) у сарадњи са Центром за контролу и превенцију болести (Center for Disease Control and Prevention (CDC) Националног института за стандарде и технологију (National Institute of Standards and Technology (NIST)) и лабораторијом за аналитичку хемију на Ghent Универзитету (Binkley et al. 2016).

Увођењем комерцијалних и стандардизованих китова, и подвргавањем екстерним проверама квалитета, LC-MS/MS доприноси се побољшању квалитета у анализи 25(OH)D. Међутим, треба напоменути да куповина ових уређаја захтева значајна финансијска средства као и стручно особље, због чега су ови уређаји намењени већим и опремљенијим лабораторијама (Farrell and Herrmann, 2013; Bailey et al. 2013; Keevil, 2012).

1.4 Ефекти витамина D у одржавању минералне хомеостазе и коштаног здравља

Биолошки активна форма овог витамина је 1,25(OH)₂D која се формира у бубрезима или калцитриол. Резултати многобројних студија су показали да своје ефекте калцитриол остварује везивањем за специфичне једарне рецепторе за витамин D (ВДР), стварајући комплекс са специфичним секвенцама ДНК и на тај начин регулише активност преко великог броја гена у хуманом организму (Radulović et al. 2012; Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of vitamin D, 2016.). Многобројне улоге витамина D данас можемо поделити на две велике групе (Milovanović, 2017): прву у одржавање минералне хомеостазе калцијума и фосфора и одржавање здравља коштано система (рахитис, остеомалација, остеопороза), и другу која се односи на његове позитивне ефекте на многобројна друга ткива (услед присуства његовог једарног рецептора у њима) односно на "некоштано здравље".

Основна и прво откривена физиолошка улога витамина јесте у одржавању хомеостазе калцијума и фосфора, као и у физиолошким процесима минерализације костију. Историјски гледано, најпре је запажена позитивна улога овог витамина у лечењу рахитиса код деце, а касније код одраслих у лечењу остеомалације, остеопеније и остеопорозе. У коштаном систему се одиграва активан метаболизам који се карактерише тиме да се коштане ћелије непрестано деле и изумиру, где током наступа поновне деобе, настаје ново коштано ткиво. Овај процес је један хомеостазни механизам који је константан и траје током целог живота код сваке особе.

При оптималним концентрацијама активне форме витамина D у организму долази до повећања апсорпције есенцијалних минерала, калцијума и фосфора из хране у интестиналном тракту, која је иначе ниска (свега 10-15% за калцијум и око 60% за фосфор).

Ово повећање је значајно, и за калцијум достиже распон од 30-40%, док је апсорпција фосфора око 80%. На овај начин, постојањем адекватне концентрације калцитриола у циркулацији, долази до одржавања хомеостазе ових минерала у организму и одвијања физиолошког процеса минерализације у костима. Повећана апсорпција калцијума је неопходна у периоду раста и развоја, као и периоду трудноће и лактације код жена.

Уколико постоји дефицијенција 1,25-дихидрокси витамина D, у циркулацији долази до значајног смањења апсорпције поменутих минерала. Присуство калцијума у ниској серумској концентрацији доводи до лучења ПТХ који активира ензим у бубрезима, 1 α -хидроксилазу, која доводи до повећаног стварања биолошки активне форме витамина D, који онда доводи до повећања апсорпције калцијума и фосфора (Milovanovic, 2017; Holick, 2007). ПТХ поред тога што олакшава претварање витамина D у калцитриол, повећава активност остеокласта, односно повећава ресорпцију кости, док у бубрезима смањује излучивање калцијума урином, а поспешује елиминацију фосфора (повећање серумског калцијума и смањење концентрације фосфата). Позитиван ефекат на коштано здравље витамин D остварује и својим дејством на мишићне ћелије, повећањем њихове пролиферације и диференцијације што доводи до повећања масе и снаге мишића.

Присуство хроничне дефицијенције калцитриола доводи до оштећења везаних за процесе минерализације костију, која се манифестује код деце појавом рахитиса, а код одраслих остеомалацијом и остеопорозом (Стефановић et al. 2008; Јанковић, 2016).

Познато је да се максимална густина костију достиже око 25. године и током живота се постепено смањује (Hendrickx et al. 2015). Код одрасле особе просечан губитак коштане масе износи око 0,5% током четири године, али се код жена по настанку менопаузе значајно увећава (два до три пута).

Недостатак естрогена или рана менопауза код жена је значајан фактор који утиче на појаву чешћих прелома (44%) код жена у односу на мушкарце (25%). Такође, ризик од прелома је већи у старијем животном добу (Ensrud, 2013). Витамин D смањује инциденцу вертебралних прелома код пацијената са остеопорозом (Национални водич за лекаре у примарној здравственој заштити, 2004).

У многим студијама је показана позитивна корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D са минералном густином костију (БМД) (Body, 2011; Li et al. 2016). Резултати спроведене студије пресека указали су на постојање корелације између нивоа калцидиола (у распону серумске концентрације 20-36 mg/ml), БМД и инциденце прелома код пацијената (Candido et al. 2014). Такође, мета анализа је показала да суплементација витамином D и калцијумом смањује релативни ризик за 18% када су у питању невертебрални преломи (Body, 2011). Истраживање спроведено као мета анализа на старијим особама које је испитивало ефекте и дозну зависност витамина D са и без суплементације калцијумом је показало да долази до смањења ризика за настанак и невертебралних и преломе кука (за 29% и 15%, респективно) (Bischoff-Ferrari et al. 2009). Неколико година касније, исти аутори су потврдили да редукација ризика за настанак прелома произилази од суплементације витамином D (при дневној дози од 800 ИЈ), односно није зависно од суплементације калцијумом (Bischoff-Ferrari et al. 2012). Међутим, иако се редовно спроводи суплементација витамином D код жена са хиповитаминозом, и смањеном густином костију (остеопенија и остеопороза), дневна доза овог витамина није тачно дефинисана, нити је индивидуализована према потребама сваке пацијенткиње.

1.5 Остеопороза и остеопенија

Остеопороза је хронично, прогресивно метаболичко скелетно обољење које се карактерише смањеном коштаном масом уз присуство оштећене микроархитектуре костију (Leidig-Bruckner et al. 2012; Horst-Sikorska et al. 2011). Услед смањене отпорности и повећања фрагилности костију код пацијената често долази до прелома костију, тз. остеопоротичних прелома које се најчешће јављају при случајном паду или подизању мањег терета (National Osteoporosis Foundation, 2013). Сам термин остеопороза је грчког порекла и адекватан превод на српски језик био би "шупљикава кост". У савременој пракси стручњаци ово обољење називају "тихим крадљивцом костију" (Cosman et al. 2014).

Повећана функција остеокласта и смањена функција остеобласта узрокује поремећај у равнотежи између ресорпције и формирања кости, што последично води променама у архитектури кости, смањену коштану масу и њене густине, и повећању ризика од прелома (National Osteoporosis Foundation, 2013). Остеопенија се такође карактерише смањеном коштаном густином код особе у односу на физиолошке вредности, и временом може довести до остеопорозе.

Иако од остеопорозе болују особе оба пола, она се чешће јавља код жена. Око 80% пацијената којима је дијагностиковано и лечено ово обољење су особе женског пола. Подаци на глобалном нивоу указују да ово обољење обухвата 50% популације жена старијих од 50 година и 90% популације жена старијих од 70 година. У Европи око 22 милиона жена старости 50-84 године има остеопорозу (Hernlund et al. 2013). Преваленца постменопаузалне остеопорозе у Америци износи 13-18%, док је у Србији забележена од 5,2% (Meiyanti, 2010; Vuković et al. 2008).

Данас остеопороза представља озбиљан социо-економски и здравствени проблем широм света чији се трошкови лечења и њених последица односно прелома процењују на више милиона евра (Cawthon, 2011; Dontas et al. 2007). Подаци указују да свака трећа жена и сваки пети мушкарац старији од 50 година већ има бар један остеопоротични прелом (Hendrickx et al. 2015).

1.5.1 Подела остеопорозе

У стручној литератури остеопороза је класификована на различите начине, али је најприхватљивија она која остеопорозу етиолошки дели на примарну и секундарну (Iqbal M, 2000).

Примарна остеопороза

Сматра се да 95% пацијената којима је дијагностикована остеопороза управо спада у ову групу.

Примарна остеопороза се може поделити на две основне групе:

- Инволутивна остеопороза
 - Постменопаузална остеопороза
 - Сенилна остеопороза
- Идиопатска остеопороза

Инволутивна остеопороза укључује постменопаузалну и сенилну остеопорозу. Постменопаузална остеопороза је обољење које се дијагностикује код особа женског пола и настаје као последица смањеног лучења естрогена у периоду менопаузе код жена, услед чега долази до губитка коштане масе и густине, највише током наредних 5 до 7 година након менопаузе (Deerthi et al. 2012). Овај тип остеопорозе се назива и ТИП 1. Овај облик остеопорозе је најчесталији и јавља се код жена старости после 45 или 50-те године живота. Услед смањеног лучења или потпуног одсуства естрогена у организму долази до повећаног преузимања калцијума из костију, што доводи до пропадања најпре трабекуларне а затим и корикалне кости у организму (Meng-Xia et al. 2015). Дефицит естрогена узрокује такође ослобађање проинфламаторних цитокина, као што су интерлеукини и тумор некротисис фактор (TNF). Све то доводи до стимулације и повећане функције остакластних ћелија коштаног система (Becker, 2006; Maria et al. 2013).

Инволутивна сенилана остеопороза или ТИП 2 је облик остеопорозе који настаје услед смањења минералне густине костију услед физиолошког процеса старења и присутна је код особа оба пола после 65. или 70.-те године живота. Од 30% до 50% жена старијих од 65 година, широм света, има остеопорозу. Процењено је да ће 25% њих у свом животу доживети прелом проузроковану остеопорозом. Још један важан фактор који утиче на минерализацију костију јесте и ниво 25-хидрокси витамин Д који је одговоран за одржавање оптималних вредности калцијума у циркулацији.

Процес старења повезује се са смањењем синтезе витамина D3, који се ствара у кожи и проузрукује смањене концентрације његовог активног метаболита, смањење ресорпције калцијума из гастроинтесталног тракта, узрокујући настанак остеопорозе и повећава подложност костију преломима (Veldurthy et al. 2016).

Остеопороза непознатог узрока тј. идиопатска остеопороза је облик остеопорозе која се јавља најчешће код млађе популације, адолесцената и деце (јувенилна остеопороза) (Al Kaissi et al. 2017). Тачан узрок ове остеопорозе још увек није утврђен али код особа код којих је дијагностикована се карактерише кифозом, оштећењем кичмених стубова уз карактеристично низак раст особа за свој узраст (Imerci et al. 2015).

Секундарна остеопороза

Овај облик остеопорозе јавља се као последица присуства других основних болести или стања, или хроничне употребе лекова који утичу на метаболизам костију. Најчешћи узроци настанка секундарне остеопорозе су: присуство Кушинговог синдрома, обољења штитне жлезде, реуматоидни артритис, системски лупус еритематодес, дијабетес мелитус, цистична фиброза, бројне инфламаторне и хематолошке болести, хроничних обољења црева која су удружена са малапсорпцијом, као последица гастероктомије, идиопатске хиперкалциурије или јатрогено (National Osteoporosis Foundation, 2013).

Такође, хронична примена лекова као што су: кортикостероиди, антиепилептици (доминантно из групе традиционалних антиепилептичких лекова: карбамазепин, фенобарбитон, фенитоин), хепарин, тиреосупституциона терапија, метотрексат, циклоспорин могу изазвати овај облик остеопорозе (Национални водич за лекаре у примарној здравственој заштити, 2004).

1.5.2 Клиничка слика и фактори ризика

За остеопорозу је опште познато да је асимптоматска болест, без појаве карактеристичних симптома код пацијената, све док не дође до прелома. Остеопоротични преломи се најчешће дешавају на кичменим пршљеновима, куку, врату бутне кости и подлактици (Australian Institute of Health and Welfare, 2008; Lasaitte and Krasauskiene, 2009).

Вертебрални преломи доводе до бола у леђима, смањења телесне висине, узрокују деформитет кичменог стуба што може довести до повећања инвалидитета и морбидитета код пацијената. Такође, преломи кука доводе до повећања морбидитета до 36% код пацијената током прве године после прелома (Hendrickx et al. 2015).

Многобројни фактори доводе до смањења минералне коштане густине, као што су: пол (женски), године, низак ниво естрогена, низак индекс телесне масе, породична анамнеза о постојању остеопоротичних прелома, пушење, раније присутни преломи костију. Ниске вредности коштане густине су повезани и са касном менопаузом или раним уласком у менопаузу и последично хормонским статусом жене (Klibanski et al. 2001). Резултати истраживања о присуству и факторима ризика за настанак остеопоротичних прелома показало је да су вредности минералне густине костију код сваке особе веома значајан и континуирани фактор ризика за настанак коштаных прелома (Cumplings et al. 2002). Фактори ризика који могу утицати на редукацију минералне густине костију и настанак прелома су приказани у Табели 1 (WHO Assessment of osteoporosis at the primary health care level, 2007).

Табела 1. Фактори ризика за настанак прелома и редукцију минералне густине костију

Фактори високог ризика за настанак прелома	Фактори умереног ризика за настанак прелома
Старост (више од 70 год.)	Женски пол
Ниска телесна маса	Конзумирање цигарета
Нагли и велики губитак телесне масе	Недовољно излагање сунцу
Физичка неактивност	Породична анамнеза остеопоротичних прелома
Употреба кортикостероида	Хирушка менопауза
Употреба антиепилептичких лекова	Кратак репродуктивни период
Примарни хиперпаратироидизам	Изостанак лактације
Дијабетес мелитус, тип 1	Низак унос калцијума
Аногеџа нервоџа	Хиперпаратироидизам
Гастректомија	Хипертироидизам
Пернициозна анемија	Дијабетес мелитус, тип 2
Присуство претходног остеопоротичног прелома	Реуматодни артритис

Приликом дијагностиковања остеопорозе неопходно је проценити све присутне факторе ризика код пацијента. Комбинација свих фактора ризика може да пружи јаснију слику за процену укупног ризика за прелом (Watts et al. 2010; Kanis et al. 2008). Показано је да је инциденца за прелом кука и до 17 пута (ако изузмемо вредност БМД) већа код жена код којих је присутно пет или више фактора ризика. Такође, код жена уколико постоји 5 и више фактора ризика заједно са ниским вредностима БМД ризик за настанак прелома се значајно увећава (WHO Assessment of osteoporosis at the primary health care level, 2007).

У дијагностиковњу остеопорозе, поред вредности минералне густине костију треба узети у обзир и друге, најважније факторе ризика који су приказани у Табели 2.

Табела 2. Фактора ризика код пацијенета којима се дијагностикује остеопороза

Важни фактори ризика (главни)	Мање важни фактори ризика (споредни)
Старост (више од 65 година)	Реуматодни артритис
Прелом као последица мале трауме која је настала након 40.год.живота	Раније дијагностикован хипертироидизам
Породична анамнеза остеопоротичног прелома (прелом кука код мајке)	Хронична примена антиепилептичких лекова
Примена глукокортикоида у периоду дужем од 3 месеца	Пушење
Синдром малапсорпције	Претеран унос алкохола
Примарни хиперпаратироидизам	Претеран унос кофеина
Склоност паду	Ниска телесна маса
Остеопенија која је дијагностикована х зрачењем	Велики губитак телесне масе (>10 kg) у 25. години живота
Хипогонадизам	Хронична терапија хепарином
Рана менопауза (пре 45 год. живота)	

Утицај начина, односно стила живота једне особе на ризик од настанка остеопорозе (изузевши сам процес старења) је веома значајан због чега је потребно пажњу треба усмерити и на промену животних навика пацијента. Комбинација одговарајућих фактора као што су исхрана, врста и учесталост физичке активности, пушење и конзумирање алкохола може у значајној мери имати утицаја за настанак остеопоротичних прелома. Врста и начин исхране као и утицаји животне средине остварују свој ефекат на ниво калцијума и витамина D.

Заједно са ПТХ, витамин D је део ендемог хомеостатског механизма који регулише ниво калцијума и фосфата, који су од изузетне важности за минералну густину костију. Недовољна концентрација калцијума, фосфата и витамина D редукује формирање и минералну густину костију, а самим тим утиче и на ресорпцију коштаног система (WHO Assessment of osteoporosis at the primary health care level, 2007). Код особа са неодговарајућим уносом хранљивих материја долази до губитка коштане масе али и смањење њихове мишићне масе, што доводи до смањења неуромишићне функције и поремећаја равнотеже, чиме се повећава ризик од падова и прелома. Због свега овога избалансирана исхрана, адекватан унос калцијума и витамина D, као и излагање сунчевој светлости се препоручују као важне мере превенције у настанку и развоју остеопорозе (Lesic et al. 2007; Sánchez-Riera et al. 2010; Lakić et al. 2009).

Фактор ризика који треба напоменути је и дијетски режим исхране, који може утицати на здравље коштаног система. Дијете које су на бази високих количина протеина и калцијума повећавају коштану масу чиме се смањује ризик од прелома коштаног система (Seeman et al. 2007; Stevenson et al. 2005). Обезбеђење киселинско базне равнотеже у организму је од суштинског значаја, што указује на значај баланса у количини уноса меса, јаја, рибе и житарица (ове намирнице повећавају киселост у организму) (Seeman et al. 2007). Повећан унос воћа и поврћа, генерише стање метаболичке алкалозе што погодује равнотежном стању калцијума и формирању костију, тј. смањењу ризика од остеопоротичних прелома (Genant et al. 1993; Nguyen et al. 2004).

Током прошлог века, показан је значајан утицај физичке активности у превенцији и ублажавању настанка остеопорозе (Lunt et al. 2003; Sambrook et al. 2006). Истраживање спроведено у Шведској, показало да је долази до повећања густине костију у пределу кука и лумбалном делу код испитаника који су били подвгнути редовном физичком вежбању три пута недељно, током годину дана (Vainionpa et al. 2005). Студија спроведена у Данској код особа старије животне доби показала је да се инциденца прелома кука двоструко повећава код особа истих година које нису физички активне (Dušek et al. 2012).

Утицај конзумирања алкохола на метаболизам костију и коштаног ткива у директној је зависности од количине унетог алкохола у организам (Cooper et al. 2008; Lai et al. 2008). Прекомерно узимање алкохола доводи до смањење минералне густине костију и за последицу има повећану подложност преломима, као резултат директних и индиректних ефеката алкохола на метаболизам костију (Lai et al. 2008; O'Neill et al. 2004; Tadic et al. 2012). Велики унос алкохола може довести до повећане ресорпције костију. Међутим, упркос нежељеним ефектима који се јављају приликом превеликог конзумирања алкохола, постоје докази који указују да умерено конзумирање алкохола остварује позитиван утицај на коштани систем (Cooper et al. 2008; Lai et al. 2008).

Неколико студија које су испитивале повезаност минералне густине костију код популације пушача и непушача указују на јасну повезаност између пушења односно конзумирања цигарета и вредности минералне густине костију (Matthis et al. 1998; Lips et al. 1997; Adachi et al. 2010). Механизми губитка коштане масе, нису у потпуности разјашњени, углавном због тога зато што пушење утиче на многа ткива и регулаторне путеве, тако да су ефекти констатовани на костима у ствари комбинација многих директних и индиректних процеса, због чега се пушење не препоручује код особа које имају повећан ризик од настанка остеопорозе (Adachi et al. 2010).

1.5.3 Методе за мерење минералне густине костију

Иако се остеопороза може јавити у било ком узрасту и код оба пола, она је ипак чешћа код жена него код мушкараца. Такође, преломи су чешће код жена него код мушкараца, делом због нижих вредности БМД код жена, као и због тога што жене имају просечно дужи животни век од мушкараца. Код жена у постменопаузи, остеопоротични преломи су учесталији него шлог, инфаркт миокарда и карцином дојке (Plum, 2010). За жене до 50 година преломи који се јављају су углавном последица остеопеније.

Мерење минералне густине костију, препоручује се женама до 65 године старости али и раније, уколико су присутни фактори ризика. Код жена, клинички фактори ризика су ниска телесна тежина, претходни преломи, присуство прелома кука у породичној анамнези и повећана употреба лекова. У складу са овим, минералну густину костију треба мерити и раније, независно од животне доби уколико су присутни фактори ризика. (Indications for Bone Mineral Density (BMD) Testing. 2015). Међутим, како су наведени фактори ризика заједнички и за многа друга обољења, тако да би трошкови за мерење минералне густине костију код популације млађе од 65 године били изузетно високи, неопходно је спроводити методе скрининга у популацији. Истраживања која се баве остеопорозом и остепенијом, као и њиховом повезаношћу са преломима, указују да су преломи костију услед остеопорозе или остеопеније код млађе популације ретки. Такође, познато је да се преломи ређе јављају код жена средње животне доби, као и код жена са остепенијом и нормалним вредностима БМД (Harvey et al. 2013; Siris et al. 2004; Siris et al. 2006).

Адекватан унос калцијума и витамина D, као и физичка активност препоручују се особама у свим животним добима, а посебно особама које имају висок ризик од прелома на основу вредности БМД. У одсуству фактора ризика, осим пола и старости, мерење густине костију препоручује се женама старијим од 65 година (Cosman et al. 2014).

Дијагноза остеопеније и остеопорозе се поставља на основу процене минералне густине костију као и на основу присутних фактора ризика за настанак прелома. Данас постоје многобројне дијагностичке методе којима се може мерити минерална густина костију, као што су: двоенергетска апсорпциометрија X зрака (DXA тј. апсорпциометрија X зрака двоструке енергије), квантитативна компјутеризована томографија (QTC), магнетна резонанца, једнофотонска апсорпциометрија (SPA), ултразвучна метода (Национални водич за лекаре у примарној здравственој заштити, (National osteoporosis society, 2014); Adams, 2013). Све ове методе се разликују у погледу поузданости, количини зрачења као и у економском аспекту односно трошковима у систему здравствене заштите. Сматра се да QTC и магнетна резонанца представљају најпрецизније технике али су изузетно скупе (Engelke et al. 2007).

DXA метода представља златни стандард за одређивање минералне густине костију. Она је најчешће коришћена дијагностичка метода и карактерише се минималним дозама зрачења, једноставном анализом резултата као и доступности када су у питању финансијски трошкови (Marshall et al. 1996). Такође, DXA методом се добијају високо квалитетни снимци мерења минералне густине на лумбалном делу кичме (од L1-L4 пршљена) и врату бутне кости. Ово су централна места за мерење БМД и спроводе се код сваке особе. Поред тога, могуће је извршити и мерење БМД на подлактици и пети код особе (Јелић et al. 2008). Снимање подлактице DXA-а методом се рутински не обавља, већ се врши искључиво када се не може снимити лумбални део кичме (дегенеративни артритис, вертебрални преломи, спинална хирургија лумбалне регије (Messina et al. 2016; Bilezikian et al. 2014). Приликом DXA мерења, а у циљу добијања прецизних резултата, особа која врши снимање мора да обрати пажњу на демографске информације за сваког пацијента појединачно, правилан положај пацијента на апарату, као и на саму процедуру снимања.

Квалитет анализе добијених резултата DXA мерења зависи од квалитета анализе и одговора на питања која су постављена пацијенту, и њиховој интерпретацији. Некоректно тумачење одговора пацијената могу довести до неодговарајуће дијагнозе, тј. погрешне клиничке слике пацијента (Messina et al. 2015; Morgan et al. 2017).

Резултати DXA мерења за минералну густину костију изражени су у грамима по центриметру квадратном (g/cm^2), на основу које се одређује јачина костију (Kanis et al. 2013). Такође, овом методом се добијају и вредности два скорa: T и Z-скора. T скор који представља одступање измерених вредности BMD, од нормалних просечних вредности за особу истог пола и конституције у 30-тим годинама живота изражено у стандардним девијацијама (SD) и Z скор који представља одступање измерених вредности BMD, од нормалних просечних вредности за особу истог пола, конституције и старости изражене у SD. Према дефиницији Светске Здравствене Организације о остеопорози говоримо уколико су вредности T скорa мање од -2.5 SD код пацијента, док вредности између -1.0 SD и -2.5 SD указују на смањену густину костију које су на нивоу остеопеније (Kanis et al. 2013; Adams, 2013; Jain et al. 2017). Такође, уколико су вредности T скорa мање од -2.5 SD код пацијента који већ има прелом сматра се тешким обликом остеопорозе.

T скор се користи у дијагностиковању остеопеније тј. остеопорозе, а Z скор за доношење одлуке о агресивности потребне терапије за сваког појединачну особу (Национални водич за лекаре у примарној здравственој заштити, 2004). Вредност T скорa и DXA-а методе, у складу са смерницама које даје СЗО, валидни су и односе се на остеодензитометријско мерење БМД код жена и мушкараца старијих од 50 година. Ово је такође потврђено и од стране Интернационалног друштва за Клиничку дензитометрију (International Society for Clinical Densitometry (ISCD)) (Lewiecki et al. 2008). СЗО додатно објашњава употребу T и Z-скора у процесу дијагностификовања остеопорозе и остеопеније: пацијентима са вредношћу Z-скора од $-2,0 \text{ SD}$, може се дијагностиковати остеопенија, док се пацијентима са вредношћу T-скора изнад -2 SD , може дијагностиковати остеопороза (Indications for Bone Mineral Density (BMD) Testing. 2015).

Вредност БМД добијена DXA методом веома је прецизна, са коефицијентом варијације (coefficient of variation (CV)) од око 1% на лумбалном делу кичме, и до 2% на врату бутне кости (Adams, 2013; Bandirali et al. 2015; Delnevo et al. 2013). Треба напоменути да је DXA метода широко распрострањена у свету и доступна целокупној популацији и има врло кратко време снимања у трајању од 1-3 минута. Ипак, DXA метода има и неких недостатака, тј. ограничења, пошто се вредност БМД повећава са старењем у лумбалном делу кичме (последица остеоартрозе) или услед ранијих прелома уобичајених код старијих особа (Guglielmi et al. 2011; Messina et al. 2015). Поред тога, треба рећи да се вредности БМД добијене остедензитометријским снимањем код одраслих и код деце разликују, због чега се користи други механизам скорирања (Bachrach, 2005; Wasserman et al. 2017).

1.5.4 Лечење остеопорозе и остеопеније

Лечење остеопорозе укључује немедикаментозну и медикаментозну терапију. Немедикаментозна метода подразумева спровођење хигијенско-дијететских мера односно смањење познатих фактора ризика код пацијената, уз обавезну суплементацију калцијумом и витамином D. Медикаментозна терапија за примарну остеопорозу укључује две основне групе лекова: антиресорптивне (бифосфонати, селективни модулатори естрогених рецептора, хормонску супституциону терапију, калцитонин и деносумаб) и анаболичке лекове (терипаратиб) (Национални водич за лекаре у примарној здравственој заштити, 2004; National osteoporosis society, 2014). Терапија се укључује и код жена чији је T скор на нивоу остеопеније, а које су већ имале прелом или имају више удружених фактора ризика за њен настанак (Eriksen, 2012). Препоруке за увођење фармакотерапије, које се односе на жене у постменопузи и мушкарце старије од 50 година живота) засноване су на испуњености следећих услова (Dawson-Hughes et al. 2008):

- T-скор мањи од -2,5 SD на врату бутне кости и/или кичменом стубу, уз одсуство секундарне остеопорозе
- Присуство једног или више прелома (укључује и прелом кука)

- Присутво прелома на другим местима а које су у вези са смањеном густином костију (Т-скор од -1,0 до -2,5 SD на кичми или врату бутне кости)
- Лечење треба започети код жена у менопаузи и код мушкараца који су старости 50 година и више који имају губитак коштане масе (Т-скор је у опсегу -1,0 и -2,5 SD када се дијагностикује остеопенија) као и промене у густини костију од 3 % на врату бутне кости или кичми које у десетогодишњој анализи повећавају ризик за 20% за настанак остеопоротичне фактуре добије употребом FRAX алгорита.

WHO је развила "алат" за процену индивидуалног ризика за настанак прелома (Fracture Risk Assessment Tool (FRAX)) који може предвидети ризик од настанка прелома (за период од 10 година), узимајући у обзир потешкоће које се јављају приликом процене и анализе густине костију и процене њиховог квалитета (Fracture Risk Assessment Tool 2007) (World Health Organization: FRAX(R) WHO Fracture Risk Assessment Tool. <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>). FRAX алгоритам је доступан на више различитих језика на следећој интернет адреси: <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>. Овај алгоритам је посебно значајан за индивидуално прилагођавање фармакотерапије код пацијената, посебно оних са ниским вредностима БМД. Такође има и значајну улогу за економско моделирање које се доноси на ова обољења коштаног система (Tosteson et al. 2008; Dawson-Hughes et al. 2008). Упркос својим ограничењима, алгоритам је врло употребљив у прилагођавању фармакотерапије, а посебну корист од овога имају пацијенти којима је дијагностикована остеопенија Данас се овај алгоритам континуирано усавршава.

1.6 Улога витамина D у превенцији и лечењу остеопеније и остеопорозе

Као што је већ речено, немедикаментозна терапија као и мере превенције код пацијената са смањеном густином костију (osteopenija и остеопороза) обухвата адекватан унос калцијума и витамина D, спровођење адекватне и редовне физичке активности и предложених вежби, као и отклањање других фактора ризика (престанак пушења, претераног конзумирања алкохола и кафе) (Body et al. 2011; Ugurlu et al. 2016).

Унос калцијума препоручује се пре свега одговарајућом исхраном (намирнице богате овим минералом), а уколико то није могуће обезбедити онда треба применити његову суплементацију. Дневне препоручене дозе су 1000mg/дану за мушкарце и 1200mg/дану за жене старости 50-70 година.

Потребне су и препоруке од стране здравствених професионалаца о излагању сунчевој светлости ради постизања и одржавања оптималне серумске концентрације витамина D пре свега код млађих и особа средње доби. Међутим, уколико то није могуће код особа које имају ниску минералну густину костију и дијагностиковану остеопенију онда се надокнада овог витамина остварује путем суплементације (Van et al. 2014).

Уколико је ниво серумског 25-хидрокси витамин D $<25-30$ ng/ml спроводи се суплементација применом витамина D2 или витамина D3. Ергокалциферол се даје у дози од 50000 ИЈ недељно, а холекалциферол од 1000 ИЈ (Vukosavljević et al. 2014).

Препоручене вредности за суплементацију витамина D код пацијената са остеопорозом зависе од његове серумске концентрације, као и старости особе. Препоручује се дневни унос од 600 ИЈ за особе старости 50-70 година, и 800 ИЈ за особе старости преко 70 година, док максимална дневна доза не би требало да буде већа од 4000 ИЈ (Ross et al. 2011). Такође, суплементација је неопходна током јесењих и зимских месеци због неадекватне ендogene синтезе овог витамина. Више од 60% жена у менопаузи има неки облик хиповитаминозе (инсуфицијенцију или дефицијенцију) витамина D (Hollick et al. 2005).

Преломи као последица остеопорозе представљају чест и озбиљан проблем код жена у постменопаузи. Рандомизирана контролисана истраживања указују да суплементација витамином D доводи до смањења губитка коштане масе код старијих жена, али и особа оба пола старијих од 65 година (Bischoff-Ferrari et al. 2005). Мета анализа спроведена код старије популације показала је да дневни унос витамина D између 700–1000 ИЈ смањује ризик од настанка прелома услед падова за 19%, при чему је ниво калцидиола износио 60 nmol/L (Bischoff-Ferrari et al. 2009).

Литературни подаци сугеришу да оптимална концентрација витамина D за старију популацију износи 50–75 nmol/L (20–30 ng/ml) . За постизање серумске концентрације витамина D од 75 nmol/L потребне су дневне дозе витамина D од 800–1000 IU (Holick, 2007; Gillespie et al. 2005).

Седмогодишње истраживање током којег је мерена серумска концентрација 25(OH)D код 400 пацијената, указује на појаву повећања броја прелома кука код пацијената који су имали нижу серумску концентрацију 25(OH)D. Серумска концентрација калцидиола мања од 20 ng/ml повезана је са повећаним ризиком за појаву преломе кука (Cauley et al. 2008). Bergman и сарадници наводе да дневна доза витамина D3 од 800 ИЈ смањује учесталост појаве неverteбралних прелома, али и прелома кука (Bergman et al. 2010).

На основу многобројних истраживања и разматрања дошло се до закључка да се дефицит витамина D треба надокнадити дневним дозама од 800–1000 ИЈ, без ризика од појаве токсичности код пацијента. Национални институт за остеопорозу ((National Osteoporosis Guideline Group (NOGG)) дао је опште смернице за превенцију остеопорозе уносом дневних количина калцијума од 1000 mg и 800 ИЈ (односно 1 g/kg) витамина D (Guideline for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and men from the age of 50 years in the UK, 2011).

1.7 Последице остеопорозе и превенција очувања коштаног здравља

1.7.1 Последице остеопорозе

Остеопороза је хронично обољење настало услед смањења минералне густине костију (примарно или секундарно) и које се најчешће касно дијагностикује услед одсуства карактеристичних симптома код пацијената. Као последице њеног присуства код пацијената се значајно повећава ризик за настанак падова и коштаних прелома чиме се драстично повећавају трошкови лечења, а са друге стране води повећању стопе морбидитета и морталитета (Miller, 2016).

Као последица правовременог не третирања одговарајућом фармаколошком терапијом овог обољења код особе код које је већ имала један коштани прелом, значајно се повећава ризик за настанак новог прелома, али је забележен и већи степен смртности као последица инвалидитета до којих она доводи. Тако је Тајеу са сарадницима указао да се ризик од настанка новог прелома повећава два пута, као и трошкови лечења пацијената код особе које је имала прелом кука (Тајеу et al. 2014). Истраживање спроведено на популацији коју су чиниле особе оба пола (151 жена и 55 мушкараца) који су имали иницијални прелом кука извело је закључке о стопи преживљавања пацијената који су се лечили од остеопорозе и оних који нису били под третманом. Студија је указала да је код пацијената који су се лечили од остеопорозе, у односу на оне који нису, у првој години стопа смртности била смањена за 83%, код жена, и за 63% код мушкараца, док је за период од 10 година овај проценат износио 31% за женску, и 46% за мушку популацију (Leslie et al. 2013).

Саму остеопорозу не треба повезати само са повећаном склоношћу ка падовима, коштаном преломима и морбидитетом код пацијената, већ и са присуством бола, отежаном покретљивошћу, хоспитализацијом и смањењем њиховог квалитета живота. Последице остеопоротичних прелома и отежане покретљивости пацијената су повећање ризика за настанак пнеумонија, венске тромбозе, уринарних инфекција, као и бројних кардиоваскуларних компликација (Nanda et al. 1999).

1.7.2 Превенција очувања коштаног здравља

Мере превенције које се односе на здравље коштаног система обухватају све узрасте, тј. децу, адолесценте, одрасле, труднице, дојиље, популацију жена у менопаузи, и старију популацију. Ове мере обухватају особе оба пола, а њихов основни циљ је развој и очување здравља коштаног система на основу досадашњих медицинских сазнања и истраживања. Формирање коштаног система започиње у детињству и завршава се у периоду између 20.-те до 25.-те године када се сматра да је постигнут максимум за формирање коштаног система, односно минералне густине костију једне особе.

На адекватно формирање БМД утиче утиче генетска предизпозиција (70%), фактори спољашње средине (30%), и хормонски статус који је за сваког појединца индивидуалан (Legrand, 2003).

Примарна превенција остеопорозе обухвата спровођење едукативних програма са циљем повећања свести и основних сазнања популације о здрављу које се односи на коштани систем. Максималне минерална густина костију се достиже између око 25. године живота, и што је њена вредност већа то је мања вероватноћа настанка остеопеније или примарне остеопорозе у каснијем животном добу (у постменопаузи код жена или сенилне остеопорозе код оба пола). Сprovedено истраживање које је обухватало 149 здравих девојчица у периоду пред пубертет показало да исхрана обogaђена калцијумом током годину дана доводи до повећања минералне густине костију у лумбалном пределу, као и на куку и подлактици у поређењу са контролном групом (Bonjour et al. 1997).

Врста исхране као и животне навике током живота су веома важне када је у питању превенција коштаног здравља.

Такође, недовољно уношење хранљивих материја као и спровођење различитих дијета доводе до губитка телесне масе. Превелика количина протеина у исхрани и повећан унос соли могу довести до губитка калцијума из организма што се одражава и на минералну густину костију (Weil, 2005). За превенцију коштаног здравља и одржавање његовог квалитета важни су и фактори повезани са стилем живота, као што су: пушење, претерано конзумирање алкохола и кафе (Weil, 2005).

Поред већ наведених фактора који остварују свој утицај у превенцији остеопорозе, веома важним се сматра и физичка активност и редовно вежбање код сваке особе (Branković et al. 2000). За целокупан коштани систем је битан напор који се остварује физичком активношћу, јер остеоцити на тај начин примају информације које су неопходне за ремоделисање коштаног система а самим тим и синтезу коштаног система.

Показано је да физичка активност тј. спровођење одговарајућих вежби (сходно годинама живота, физичкој кондицији и присуству других обољења код особе) повећаваја функционалну ефикасност мишића чиме се остварује значајан утицај у превенцији случајних падова код особа (Murphy et al. 2005; National Osteoporosis Foundation, 2003; Diaz-Curiel, 2013).

Многобројна истраживања као и спроведене мета анализе указују на корисне ефекте хормонске супституционе терапије (ХРТ). ХРТ повећава концентрацију естрогена у серуму што доводи до повећања БМД код особа женског пола, а самим тим и смањење учесталости коштаних прелома. Процент учесталости прелома је за 100% већи код жена које не користе супституциону хормонску терапију током менопаузе према подацима (WHO, 1994). Истраживање које је спроведено као мета анализа које је обухватило 57 студија указује да употреба ХРТ током једне године код жена доводи до повећања минералне густине костију за 5.4% у лумбалном делу кичме и 3.0% на куку (Wells et al. 2002).

Примена хормонске супституционе терапије код популације жена после 50-те године живота, а које се налазе у постменопаузи, треба да се спроводи уз примену бифосфоната у периоду од 10 година. Ова комбинована терапија значајан је модел за превенцију остопорозе код жена у периоду после менопаузе (Le Pen et al. 2000).

Треба нагласити да ХРТ има битан утицај на настанак венске тромбоемболије код особа женског пола после 40.-те године живота, те сходно томе треба бити обазрив на избор ХРТ која се примењује у терапији (Scarabin et al. 2003; Јанковић, 2016).

Секундарна превенције остепорозе има за циљ да из опште популације издвоји појединце који имају висок степен ризика за настанак остепорозе. Селекција се врши на тај начин што се идентификују особе са присутним факторима ризика за остепорозу или настанак остепоротичних прелома. Врши се идентификација сваког појединачног фактора, са посебним акцентом о њиховим удруженим код сваке појединачне особе. Након селекције и идентификације особе се упућују на мерење минералне густине костију остеодезитометријским прегледом.

На основу свега тога као и одговарајућих биохемијских анализа, клинички лекар (реуматолог) одређује фармаколошку терапију са циљем превенције могућих прелома (Audran, 2003; Vrixen et al. 2005). Фармаколошка терапија прве линије је најчешће употреба антиресорптивних лекова тј. једног од лекова из групе бифосфоната, уз додатну суплементацију витамином D и калцијумом (Zizic, 2004; Vrixen et al. 2005; Holick et al. 2005; Vuјasinović-Stupar et al. 2004; Vuјasinović-Stupar et al. 2000; Vuјasinović-Stupar et al. 2005).

Терцијарна превенција остеопорозе има за циљ идентификацију појединца који је већ имао остеопоротични прелом, као и процену ризика за настанак нових прелома (Ferrer et al. 2005). За процену ризика битан је број и садејство присутних фактора ризика за настанак остеопоротичних прелома, као и процена ризика употребом FRAX алгоритма (NICE, 2005). Медикаментозна терапија се спроводи индивидуално за сваког пацијента појединачно узимајући у обзир лекове које пацијент користи, генетске факторе и факторе ризика, тежину обољења, време наступања менопаузе, време наступања примарне остеопорозе, као и присуство других обољења. Такође, веома су важни и едукативни програми код старије популације који се односе на превенцију будућих падова и могућих прелома (одговарајући распоред у стану, осветљење, корекција вида, умерене шетње и физичка активност (Kemmler et al. 2013; El-Khoury et al. 2013).

1.8 Ефекти витамина D на некоштано здравље

Плејотропна улога витамина D и његови многобројни позитивни ефекти који се односе на некоштано здравље код људи остварује се присуством његовог једарног рецептора у многим тивима и органима као и ензима 1, α хидроксилазе (Verstuyf et al. 2010; Deschasaux et al. 2016; Souberbielle et al. 2010; Pludowski et al. 2013). Рецептор за витамин D присутан је и у костима, гастроинтестиналном тракту (танком и дебелом цреву), бубрезима, мишићима, кожи, срцу, мозгу, простати, гонадама, дојкама као и у ћелијама масног ткива, β ћелијама ендокриног панкреаса, Т и Б лимфоцитима, моноцитима и дендритичним ћелијама (Uitterlinden et al. 2004; Kawaguchi et al. 2015).

Своје геномске ефекте калцитриол остварује регулацијом активности преко 200 гена у хуманом организму, док се негеномски ефекте остварује кроз регулацију јонских канала и активност бројних ензима (фосфатазе, фосфолипазе, киназе) као и регулацијом сигналних путева који независно регулишу експресију гена (Carlberg, 2017; Carlberg et al. 2018; Wu et al. 2010; Khanal et al. 2007; Chun et al. 2014; Díaz et al. 2015). Такође, један мањи део својих ефеката овај витамин остварује и негеномским путем односно активацијом секундарних гласника (МАП киназе или цАМП) што директно утиче на метаболизам калцијума и отварање калцијумских канала.

Када је реч о повезаности између општег здравља људи са измереним серумским концентрацијама калцидиола резултати спроведених студија (опсервационих и рандомизираних) нису попутоно усаглашени. Већина опсервационих студија указује на повезаност ниских концентрација 25(OH) и лошег здравља, као и постојање повећаног ризика од настанка болести и краћег животног века код популације са ниским (<50 nmol/L) или веома ниским (<30 nmol/L) концентрацијама 25(OH)D. Са друге стране, рандомизиране клиничке студије сугеришу на позитивен ефекат суплементације витамина D на нескелетно здравље као и да је његов бенефит слаб код особа којих је серумска концентрација калцидиола нижа од 50 nmol/L (Autier et al. 2014; Theodoratou et al. 2014). Присуство ниских концентрација овог витамина је пре последица него узрочник лошег здравственог статуса код сваког појединаца.

Многобројне опсервационе студије, проспективне и ретроспективне сугеришу о **протективној улози витамина D код око петнаест различитих типова канцера** код људи (колона, дојке, оваријума, простате, мозга, панкреаса, коже, бубрега, милтиплог мијелома, леукемије итд) указујући на повезаност ниских серумских концентрација калцидиола и повећања ризика за настанак поменутих канцерогених обољења (Dimitrakopoulou et al. 2017; Garland et al. 2009; Moukayed et al. 2017; Giovannucci, 2008; Gorham et al. 2007). Своје антиканцерогено дејство витамин D остварује активацијом својих рецептора регулишући на тај начин процесе пролиферације, диференцијације, апоптозе и ангиогенезе малигних али и нормалних ћелија у хуманом организму (Wacker et al. 2013; Laktasic-Zerjavic et al. 2011).

Редукција ризика за настанак канцера дојке износи 58% уколико је серумска концентрација калцидиола >38mg/L (Garland et al. 2007). Такође, студија спроведене током четири године код жена које су биле у постменопаузи суплементација витамином Д заједно са калцијумом довела је до смањења релативног ризика од канцера за чак 60% код испитаница (Larpe et al. 2007). Канцерогена обољења су једна од водећих узрочника морбидитета и процене указују да се до 2025. године очекује скоро 20 милиона новодијагностикованих пацијената са канцером на годишњем нивоу (World Health Organisation, 2014).

Улога витамина Д је показана у превенцији и лечењу кардиоваскуларних болести као што је артеријска хипертензија, инфаркт миокарда, исхемијске болести срца и произилази из присуства његовог рецептора у епителним и васкуларним мишићним ћелијама као и кардијалним мишићним ћелијама. Наиме, показано је да хипотензивни ефекат овај витамин остварује инхибицијом система ренин-ангиотензин-алдостерон у јукстрагломеруларном апарату у бубрезима регулацијом преко генске експресије и смањеним лучењем ренина, али и својим директним ефектом на васкуларне ћелије, метаболизам калцијума и превенцијом хиперпаратиреоидизма (Ajabshir et al. 2014; Pilz et al. 2009; Carrara et al. 2016; Chlebna-Sokół et al. 2016). Такође, постојање инверзне корелације између крвног притиска и серумске концентрације 25-хидрокси витамина Д показано је и мета анализама, мада постоје и студије које нису потврдиле ову повезаност (Beveridge et al. 2015).

Важно је напоменути да постоје истраживања која указују на витамин Д има анти-атеросклеротични ефекат који остварује инхибицијом формирања пенастих ћелија, експримирањем адхезивних молекула на ендотелним ћелијама и кроз ослобађање инфламаторних медијатора (Carvalho et al. 2015).

Многобројне студије спроведене до данас указују на значајну **улогу витамина Д у превенцији настанка, развоју и модификацији тока многих важних аутоимуних обољења** као што су: дијабетес мелитус тип 1, мултипла склерозе, реуматоидног артритиса, системског лупуса еритематодеса, Кронове болести (Antico et al. 2012).

Резултати истраживања показују да овај витамин остварује свој утицај кроз модификацију продукције цитокина, смањење инфламације и доводи до идукције имуних ћелија организма. Запажено је смањење продукције проинфламаторних цитокина (интерлукин 1 и тумор некротичног фактора алфа) уз истовремено повећање проинфламаторних цитокина (интерлеукини 4, 5 и 10 (Chun et al. 2014; Martineau et al. 2016). Такође, витамин D доводи до повећања продукције Th2 лимфоцита, као индукције пролиферације дендритичних ћелија, макрофагама, док својим паракриним ефектом на Т и Б лимфоците постиже имуномодулаторна дејства (Adorini et al. 2008; Kamen et al. 2010).

Дијабетес тип 1 јесте аутоимуно обољење које настаје услед аутоимуног разарања бета ћелија панкреаса, што доводи најпре до недовољног а затим престанка лучења инсулина, повишеним нивоом глукагона и настанка хипергликемије (Јанковић, 2016). Резултати опсервационих студија указују на повезаност хиповитаминозе витамина D и са овим обољењем (Littorin et al. 2006; Pozzilli et al. 2005; Dong et al. 2013; Нуррönen et al. 2001; Cooper et al. 2011). Присуство једарног рецептора овог витамина у бета ћелијама панкреаса доводи до стимулације лучења инсулина. Такође, долази до смањења инсулинске резистенције у мишићним ћелијама и смањења инфламације (Candido et al. 2014). Учесталост овог типа дијабетеса је мања код особа које живе у земљама ближе екватору што је довело до хипотезе да фактори средине и утицај годишњег доба играју битну улогу у патогенези болести (Ball et al. 2014; Karvonen et al. 2013; Maddaloni et al. 2015; Patterson et al. 2015; Soltész et al. 2007). Утицај серумског нивоа витамина D насталог излагањем сунчевој светлости (зависност од годишњег доба) у патогенези ове болести је показана у истраживању спроведеног од стране Moltchanova и сарадника (Moltchanova et al. 2009). Такође, истраживања сугеришу и на улогу овог витамина у превенцији и развоју дијабетеса типа 2 чије се етиологија настанка потпуно разликује од типа 1 (Afzal et al. 2013; Song et al. 2013). Он има битну улогу у регулисању хомеостазе глукозе, код стања пред дијабетес, као и дијабетеса типа 2. Витамин D утиче и на секрецију инсулина кроз процесе регулације затварања и отварања калцијумових канала, тако да његов недостатак у организму утиче на промену флукса калцијума у бета ћелијама панкреаса и на ослобађање инсулина (Bland et al. 2004; Reusch et al. 1991).

Клиничке студије су показале широко распрострањену хиповитаминозу D код оболелих од мултипле склерозе (Sundström à Salzer 2015; Pierrot-Deseilligny and Souberbielle 2013; Vanherwegen et al. 2017; Manousaki et al. 2017; Gianfrancesco et al. 2017; Rhead et al. 2016). Данас се сматра да ниво калцидиола у серуму није само фактор ризика за настанак овог обољења, већ утиче на инфламаторну и на дегенеративну фазу болести (Burton et al. 2015). Истраживање спроведено код пацијената оболелих од овог обољења код којих је вршена суплементација дневним дозама витамина D од 1000 ИЈ долази до повећања не само серумске концентрације метаболита овог витамина, већ и вредности серумског трансформишућег фактора раста (TGF)-b1 који је изузетно важан анти-инфламаторни цитокин и који доводи до ублажавања симптома ове болести (Mahon et al. 2003). Суплементација витамина D3 у високим дневним дозама од 20 000 ИЈ утиче на функцију ЦД4 Т ћелија (Smolders et al. 2010). Мунгер са сарадницама је забележио и смањење ризика за настанак овог обољења (62%) уколико су присутне оптималне серумске концентрације 25-хидрокси витамина D (Munger et al. 2006).

Реуматодни артритис такође припада групи аутоимуних обољења. У настанку и развоју овог обољења значај утицај имају генетски фактори (Symmons, 2002). Још током прошлог века на експерименталним животињским моделима показано је да примена активног облика витамина D доводи до успорења прогресије и смањења озбиљности овог обољења (Cantorna et al. 1998).

Овај витамин својим имуномодулаторним и антиинфламаторним дејствима доприноси смањењу ризика од развоја овог обољења, као и прогресију саме болести (Adams, 1997; Merlino et al. 2004; Leventis et al. 2008; Cutolo et al. 2007). Постојање инверзне корелације између дефицијенције овог витамина и ризика од реуматоидног артритиса показана је у мета анализама и кохортним студијама (Song et al. 2012; Kostoglou-Athanassiou et al. 2012). Међутим, учесталост настанка овог обољења и потребна дневна доза витамина D није довољно разјашњена. Једанаестогодишње истраживање које је обухватало 30 000 жена, старости од 55-69 година, указује на постојање инверзне корелације између већег уноса витамина D и ризика за настанак реуматоидног артритиса код људи (Merlino et al. 2004).

Занимљив закључак овог истраживања био је да је витамин D унет путем суплемената остварио бољи ефекат у односу на његов унос путем хране. Међутим, неопходна су додатна истраживања, како би се утицај витамина D на превенцију и степен активности овог обољења потврдио.

Осим позитивних ефеката витамина D у превенцији, развоју или тежини различитих претходно описаних обољења, треба напоменути да је присуство дефицијенције витамина D повезано са повећањем морбидитета у општој популацији (Garland et al. 2014; Sun et al. 2017; Gaksch et al. 2017).

Последњих десетак година велика пажња истраживача и клиничара усмерена је на **протективну улогу витамина D у превенцији и лечењу респираторних обољења** као што су астма, хронична опструктивна болест плућа, туберкулоза и акутне респираторне инфекције (Gupta et al. 2012; Autier et al. 2014; Finklea et al. 2011; Foong et al. 2015). Иако још увек није познат тачан механизам овог витамина у поменутим обољењима описана су и научно доказана његова многобројна дејства на имуни систем указујући да витамин D има улогу имуномодулатора (Pfeffer et al. 2012). Од посебног значаја истиче се његова улога у пролиферацији, диференцијацији и апоптози Т и Б лимфоцита, смањењу продукције интерферона и проинфламаторних цитокина у моноцитима, у матурацији, диференцијацији и миграцији дендритичних ћелија као активацији макрофага.

Показано је да витамин D својом усходном регулацијом интерлеукина 10 од стране ЦД4⁺ Т ћелија доводи до побољшања имунолошке функције у плућима чиме остварује протективну улогу у развоју респираторних инфекција који могу бити окидачи за астму посебно код деце (Feng et al. 2017). Такође, резултати студија су показали да овај витамин доводи до усходне регулације антимикробних протеина (бета дефенсин и кателицидин), поседује антинфламаторно и антипролиферативно дејство на глатке мишиће респираторног тракта и смањује плућну хиперплазију. Рецептор за витамин D као и његови метаболички ензими идентификовани су у горе поменутим ћелијама имуног система, али у ћелијама бронхијалних глатких мишића остварујући своју улогу у ћелијској контракцији, пролиферацији и ремоделовању ваздушних путева.

Повезаност која се односи на ниске концентрације витамина D и појаву астме, код одрасле популације, није у потпуности разјашњена, међутим, недавна мета анализа указала је да оптимална концентрација витамина D важна за смањење ризика од појаве астме код деце и смањење плућне опструкције код одраслих (Martineau et al. 2016). Хронична опструктивна болест плућа представља озбиљан проблем за здравствени систем због значајне стопе морталитета. Истраживања су показала да је недостатак витамина D значајно присутна код пацијената са хроничном опструктивном болесшћу плућа (Kunisaki et al. 2011; Holmgaard et al. 2013).

1.9 Витамин D и ментално здравље

Светска Здравствена Организација процењује да скоро пола милијарде људи у свету пати од неког од менталних поремећаја. Такође, ментални поремећаји обухватају једну трећину популације особа са инвалидитетом (Baskovic, 2010). Истраживања спроведена у Европи паказала су да најмање 4 од 10 особа има неки облик хиповитаминозе витамина D (инсуфицијенцију и /или дефицијенцију) што резултује настанком многих негативних исхода, а сви ти проблеми се односе и на одржавање јавног здравља популације (Cashman et al. 2012; Quraishi et al. 2016).

Досадашња сазнања која указују на улогу витамина D за функционисање људског мозга произилазе услед широке распрострањености његовог једарног рецептора као и ензима 1, α хидроксилазе одговорне за продукцију биолошки активне форме витамина D.

Они се налазе у префронталној области, цингуларној кори, хипокампусу и хипоталамусу али у другим регијама мозга (Eyles et al. 2005). Присуство адекватне концентрације витамина D може допринети развоју мозга и одржавању интегритета зрелих синапси (Kesby et al. 2011). Резултати спроведених оспервационих студија и мета анализа указују на повезаност серумске дефицијенције витамина D и многих менталних болести, посебно са присуством депресије, шизофреније и деменције код одраслих особа (Zhao et al. 2010; Anglin et al. 2013; Valipour et al. 2014; Shen et al. 2015).

Истраживање проспективног дизајна које је обухватило велики број испитаника (1658), показало је да се код пацијената који су имали хронични недостатак витамина D вероватноћа за развој деменције повећава до два пута (Kwasky et al. 2012). Подаци добијени из NHANES (NHANES, National Health and Nutrition Examination Survey) студије указује да 42% популације у САД-у има концентрацију витамина D која је <20 ng/mL (Forrest et al. 2011). Спроведено истраживање показало је да 67% испитаника са озбиљним менталним поремећајима има недостатак витамина D. Најризичније групе су старије особе, особе које живе у старачким домовима као и жене у постменопаузи (Lam et al. 2009; Mannesse et al. 2010; Leth-Møller et al. 2016). Особе црне расе као и хиспано популација такође имају већи ризик од особа беле расе за развој хиповитаминозе витамина D (Rizzoli et al. 2012).

Постоји много доказа да појединци који имају дефицит витамина D у организму, имају већу ризик за настанак менталних поремећаја у односу на здраву популацију. Истраживања која су спроведена код ментално оболелих пацијената показала су присуство дефицијенције овог витамина у распону од 42-100% (Milovanovic et al. 2010; Tosevski et al. 2012; Vlahovic et al. 2010; Kavacic et al. 2013; Milovanovic et al. 2015; Doknic et al. 2011). Такође, студије спроведене код психијатријских хоспитализованих пацијената указују на значајно присуство хиповитаминозе витамина D (Milovanovic et al. 2015; Boricic et al. 2014).

1.9.1 Витамин D и присуство анксиозности

Присуство анксиозности је честа појава код старијих особа и често је повезана са повећањем степена инвалидитета, као и смањењем њиховог квалитета живота (Beurs et al. 1999). Присуство хроничног стреса и смањење когнитивних функција старијих особа узрокује појаву озбиљнијих симптома анксиозности (Bierman et al. 2008). Веома често, симптоми анксиозности коегзистирају и са присуством депресије (Mehta et al. 2003). Истраживања су показала да 43% особа старије доби са депресијом и 15% без дијагностиковане депресије имало је и симптоме анксиозности (Mehta et al. 2003). Иако постоје многобројни заједнички фактори ризика за настанак и развој ових менталних обољења, постоје значајне и битне разлике између њих (Vink et al. 2009).

Истраживање спроведено у Канади код старије популације указало је на повезаност ниске серумске концентрације 25(OH)D са присуством анксиозности и депресије, доводећи и до значајног смањења њиховог квалитета живота (Chao et al. 2014).

Промена годишњег доба је један од узрока појаве депресије и анксиозности код особа. Утицај годишњег доба на промене расположења назива се сезонски афективни поремећај (SAD), познат је и под термином "зимска депресија". Једно од фактора ризика за настанак овог поремећаја је присуство хиповитаминозе витамина D (Neumeister et al. 2001; Stumpf et al. 1989). Истраживање спроведено у зимском периоду које је обухватило 44 испитаника из здраве популације сугерише на ефикасност витамина D у поправљању расположења.

У пилот истраживању које је спроведено код пацијената са дијагностикованом сезонском депресијом и код којих је вршена суплементација витамином D током месец дана је забележена значајна редукције симптома депресије (мерени Хамилтоновом скалом) (Gloth et al. 1999). Клиничка истраживања подржавају хипотезу да суплементација витамином D може бити ефикасна не само за сезонске афективне поремећаје, депресију већ и за когнитивне поремећаје и опште психичко функционисање особа који припадају старијој популацији (више од 65 година) (Wilkins et al. 2006). У овој популацији је забележено преваленца дефицијенције витамина D (<20 ng/mL) од 58%.

1.9.2 Витамин D и присуство депресије

Повезаност између недовољног излагања сунцу и расположења људи је позната већ стотинама година. Резултати спроведених студија показали су да је недостатак витамина D повезан са повећаним ризиком од појаве депресије. Забележено је повећање преваланце депресије у распону од 8-14%, али и значајно повећање суицида до 30-50% код људи (McGrath et al. 2004; Hoogendijk et al. 2008; Hoang et al. 2011; Umhau et al. 2013). Недостатак витамина D и ниске концентрације серумског 25(OH)D повезане су са лошим расположењем и појавом депресије код људи (Jorde et al. 2006; Wilkins et al. 2008; Bailey et al. 2010).

Суплементација витамином D у трајању од 5 дана током зимског периода остварује позитиван ефекат на расположење и код здравих људи, али и код пацијената са ендокринолошким проблемима који иначе имају ниску концентрацију серумског 25(OH)D (Lansdowne et al. 1998; Vieth et al. 2004). Такође и многи други истраживачи су показали да концентрација серумског 25(OH) D и његовог активног облика 1,25(OH)₂D утичу на појаву депресивних симптома код здраве популације (Hoogendijk et al. 2008; Armstrong et al. 2007; Ozer et al. 2004).

Постоје многобројна истраживања, мета анализе и системски прегледни радови данас доступни у научној литератури који указују на повезаност између витамина D и појаве депресије, али присутна су и она која имају супротне резултате (Spedding, 2014; Ganji et al. 2010; Umhau et al. 2013; Anglin et al. 2013; Shaffer et al. 2014). Међутим, већина истраживања указује на директну повезаност између витамина D и депресије, односно присуство оптималне серумске концентрације 25-хидрокси витамина D доводи до редукције симптома депресије код људи (Looker et al. 1998).

Велики депресивни поремећај (MDD, major depressive disorder) се дефинише као ментални поремећај који се карактерише присуством лошег расположења, праћен губитком интересовања и одсуством осећаја задовољства који је иначе присутан у свакодневним нормалним активностима човека (Garcion et al. 2002; van Loo et al. 2012). Сматра се да око 20% укупне људске популације у току свог живота оболи од овог поремећаја (Kessler et al. 2005).

Фактори ризика који доприносе настанку MDD-а су многобројни: психолошки, наследни, еволутивни и биолошки (Sullivan et al. 2000). Присуство овог поремећаја код људи води значајном повећању стопе морбидитета, морталитета и смањењу квалитета живота (Li et al. 2014). Као што је претходно поменуто, витамин D остварује битну улогу у хомеостази калцијума и здрављу костију (Holick, 2007), али он остварује и јако битну улогу тј. можемо рећи да је кључан витамин који је неопходан за развој и функцију моздане активности (Garcion et al. 2002). Недостатак витамина D утиче на повећање степена преваленце депресије и повећање процента самоубиства (Hoang et al. 2011; Umhau et al. 2013).

Многобројне студије пресека су доказале инверзан однос између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и појаве симптома депресије (Armstrong et al. 2007; Hoogendijk et al. 2008). Недавно истраживање које је спроведено као мета анализа је показало да пацијенти са депресијом имају клиничко значајно смањење симптома након суплементације витамином D (Spedding et al. 2014). Витамин D може довести до смањења симптома депресије због утицаја који остварује на неуротрансмитере, инфламаторне маркере, хомеостазу калцијума у мозгу и синтезу нервних фактора раста (Buell et al. 2008; Song et al. 2011).

1.10 Витамин D и квалитет живота

Како због хроничног тока остеопорозе и присуства сталног бола у костима, тако и због прелома које често настају, квалитет живота жена са смањеном густином костију је значајно мањи (Garip et al. 2015). Само једна трећина особа које су имале остеопоротични прелом достигне претходни квалитет живота (Остеопороза. Национални водич за лекаре у примарној здравственој заштити, 2004). Истраживања су показала да су најчешћи преломи као последица остеопорозе су вертебрални преломи (Genant et al. 1993). Постојање бар једне вертебралног прелома повећава ризик до 5 пута за настап и другог прелома током наредних годину дана (Lindsay et al. 2001).

Последице ових прелома код пацијената са остеопорозом јесу присуство бола у леђима, кифоза, потешкоће у обављању свакодневних активности као и промене расположења (депресија, анксизност), што се одражава на физичко функционисање особе и губитак личне независности, њено ментално и друштвено функционисање (Black et al. 1999; O'Neill et al. 2004; Cooper et al. 2008; Gold, 1996; Lai et al. 2008; Bergland et al. 2011). Због свега наведеног здравствени третман пацијената са остопорозом не треба да се ограничи на клиничко лечење, већ пажњу треба усмерити и на унапређење његовог квалитета живота повезаног за здрављем (HRQOL, health related quality of life).

Данас је у свету развијено већи број упитника за мерење квалитета живота, како генеричких тако и специјализованих за пацијенте са остеопорозом. Један од често коришћених генеричких упитника јесте упитник који је развила СЗО за процену квалитета живота World Health Organization Quality of Life (WHOQOL), односно његова скраћена верзија WHOQOL BREF која садржи 26 питања. Овај краћа верзија упитника је валидирана и културолишки адаптирана у Србији (Николић Е et al. 2010).

Значајно интересовање научника и здравствених професионалаца за квалитет живота пацијената са смањеном густином костију, остеопенијом и остеопорозом, условило је последњих деценија и развој већег броја специјализованих упитника за процену квалитета живота код ове популације пацијената (Madureira et al. 2012). Најчешће коришћени упитници у овим истраживањима су: Quality of Life Questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO или његова краћа верзија QUALEFFO-41), Osteoporosis Quality-of-Life Questionnaire (OQLQ), Osteoporosis Assessment Questionnaire (OPAQ), Osteoporosis-Targeted Quality-of-Life Questionnaire (OPTQoL), Osteoporosis Functional Disability Questionnaire (OFDQ), Quality-of-Life Questionnaire in Osteoporosis (QUALIOST). Иако сви поменути упитници имају исту сврху, они се разликују по броју питања, домена и циљној популацији пацијената (Tosteson et al. 2002).

Литературни подаци и спроведена бројна истраживања показују да упитник који се најчешће користи за процену квалитета живота код популације којима је дијагностикована остеопенија и остеопороза јесте краћа верзија упитника о квалитету живота Европске фондације за остеопорозу QUALEFFO-41 (Oleksik et al. 2000; Van Schoor et al. 2009; Oleksik et al. 2005; Rostom et al. 2012; Lips et al. 1999; Cooper et al. 2008; Cockerill et al. 2004; Bergland et al. 2011). Преведен је и валидиран у бројним земљама широм света, као и у Србији (Tadic et al. 2012).

1.11 Популациона фармакокинетика

Популациона фармакокинетика (ПФК) представља посебну врсту или начин испитивања фармакокинетике лека или супстанце од интереса. За разлику од класичног фармакокинетичког испитивања који укључује мали број испитаника (најчешће здравих волонтера), релативно хомогених по својим карактеристикама и екстензивно узимање узорака крви (плазме, серума) да би се одредили фармакокинетички параметри, популациона фармакокинетика полази од популације, односно значајно већег броја испитаника како би се одредили фармакокинетички параметри (Milovanovic 2005; Milovanovic and Jankovic 2009; Han et al. 2013). За разлику од прве фазе клиничких студија, где се испитује фармакокинетика лека код малог броја здравих добровољаца у популационој фармакокинетичкој анализи уобичајено се користе узорци код конкретних пацијената, код који се лек примењује у рутинској клиничкој пракси. Следећа предност ове врсте анализе јесте то што је за њено спровођење довољан само један узорак по пацијенту, односно само једна серумска концентрација лека. Ова предност је посебно важна код испитивања која се спроводе у вулнерабилним популацијама, као што су педијатријска популација (посебно новорођена деца, одојчад или мала деца), код геријатријске популације, онколошких пацијената као и код свих пацијената са хроничним болестима код којих су потребне честе лабораторијске анализе. У складу са овим, за пацијенте важним предностима, предложено је од стране Америчке управе за храну и лекове (FDA Food and Drug Administration) да се фармакокинетичка испитивања код деце спроводе употребом популационе фармакокинетичке анализе.

Одређивање варијабилности фармакокинетичких параметара је такође једна од предности ове врсте код које је процена интериндивидуалне и интраиндивидуалне варијабилности фармакокинетичких параметара њен саставни део (Миловановић, 2009; FDA, 2018). За спровођење ове врсте анализе потребно је следеће: припрема истраживања и план рада укључују детаљно упознавање са до тада познатим фармакокинетичким параметрима лека, претрагу научних база и литературе у циљу упознавања са факторима који доприносе фармакокинетичкој варијабилности лека на основу чега се дефинишу полазне тачке у спровођењу ПФК анализе.

Ова фаза је посебно важна да би у каснијој ПФК анализи укључило што већи број фактора који би могао да има утицај на варијабилност у фармакокинетици лека што подразумева и детаљно испитивање потанцијалних лек-лек фармакокинетичких интеракција. После прикупљања свих важних података у припремној фази прави се датаљан план истраживања. Овај план подразумева прецизирање о испитиваној популацији (како у демографском погледу: старосна група, пол, итд. тако и у смислу здравственог статуса испитаника: здрави испитаници или пацијенти са присуством одређене болести), величина популације (код ове врсте анализе пожељно је да величина популације буде већа од 50 и више), тачно дефинисати факторе који ће се испитивати, као и фармакокинетичке параметре и њихове варијабилности (Миловановић, 2009).

Популациона фармакокинетичка анализа се, након прикупљања свих потребних података од испитаника, претходно дефинисаних, спроводи применом одговарајућег софтвера за ову врсту анализе. Постоји многобројни софтвери за ову врсту анализе, али је годинама у научном истраживању најзаступљенији и најчешће коришћен НОНМЕМ (Non linear mixed effect model) софтверски пакет који је развијен у двадесетом веку (Woesckmann et al. 2011). Данас се овај софтвер редовно усавршава и модификује у циљу пружања већих могућности истраживачима као и поједностављење његове употребе. Ипак, потребно је добро познавање руковања овим програмом како би се ПФК анализа спровела на адекватан начин. Тачност и прецизност прикупљених података од испитаника јесте један од основних предуслова за примену одговарајућег софтвера у спровођењу ПФК софтверске анализе. На основу дефинисаних почетних параметара и прикупљених података из НОНМЕМ програма се изабере субрутина која ће бити коришћена. Избор и комбинација субрутин/а зависи од фармакокинетице лека који се испитује као и времена када су узимани изорци крви од испитаника. У фармакокинетичком смислу, постоје два значајна времена када се узимају узорци крви када је успостављено равнотежно стање код испитаника или пацијената: T_{min} је време пред следећу дозу (када је очекивана концентрација лека најнижа) и T_{max} када јесте после узимања лека када се очекује максимална концентрација у оквиру постигнутог равнотежног стања (Milovanovic, 2009). Уколико се узорци узимају у T_{min} подаци о апсорпционој фази се не могу добити.

На основу тога селекује се субрутина која описује модел са једном или више одељака, са или без апсорпције и сходно томе и који се фармакокинетички параметри бити испитивани. Најчешће се у свим ПФК студијама испитује клиренс лека као основни фармакокинетички параметар, затим волумен дистрибуције али могу и константе апсорпције и елиминације лека. Затим следи процес конкретног моделирања који укључује три основне фазе који ће детаљније бити описане у поглављу Материјал и методе (Milovanovic and Jankovic, 2009, 2011, 2013).

Процес валидације коначног, добијеног ПФК модела може се спроводити на два начина. Интерна валидација укључује "bootstrap" анализу која се такође спроводи уз помоћ овог софтверског пакета. Она укључује неколико стотина реплика узорачких насумично изабраних од страна софтвера и даје процену ФК параметра и њихове варијабилности (FDA 2018; Matovic et al. 2018). Затим се врши њихово поређење са подацима добијених током развоја модела и уколико су вредности сличне, њихови интервали поверења као и одговарајуће грешке, сматра се да је добијени ПФК модел стабилан, прецизан и добрих предиктивних перформанси. Ова врста валидације обично се спроводи када је број прикупљених узорачких мањи (мањи од 100). Екстерна валидација укључује 10 до 20 узорачких односно испитаника који нису учествовали у изградњи ПФК модела, где се на основу њихових података поново гради базни и коначни ПФК модел како се показало да ли је добијени, коначни ПФК модел добро описао испитивани фармакокинетички параметар и његове варијабилности.

Посматра се разлика у МОФ-у између добијених модела, односно присуство смањења МОФ вредности као и обе испитиване варијабилности које би требало да буде праћено бољим фитовањем података у графичким приказима (претходно описаних). Такође, на основу ових података израчунавају се предиктивне грешке које указују на прецизност модела, постојање биаса и предиктивне карактеристике коначног, популационог фармакокинетичког модела (Milovanovic, 2009; Milovanovic, 2015).

Према литературној претрази постојећих истраживања о фармакокинетици 25-хидрокси витамина D тренутно нема доступних истраживања на тему популационе фармакокинетичке анализе 25-хидрокси витамина D код жена старијих од 35 година.

2 ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1 Циљеви истраживања

За спровођење овог истраживања постављени су следећи циљеви:

1. Одређивање средњих, популационих вредности фармакокинетичких параметара (клиренса и волумена дистрибуције) 25-хидрокси витамина D у популацији жена старијих од 35 година које долазе на остеодензитометрију у Клинички центар Крагујевац.
2. Развијање популационог фармакокинетичког модела клиренса витамина D и откривање и квантификација фактора који у значајној мери утичу на клиренс и интра- и интериндивидуалну варијабилност 25-хидрокси витамина D у популацији жена старијих од 35 година које долазе на остеодензитометријски преглед у Клинички центар Крагујевац.
3. Испитивање корелације серумских концентрација витамина D са вредностима густине костију (T или Z скор) и годинама старости у популацији жена старијих од 35 година.
4. Испитивање корелације серумских концентрација витамина D у популацији жена старијих од 35 година са њиховим квалитетом живота, степеном депресивности и присуством страха добијених употребом одговарајућих, валидираних упитника.

2.2 Хипотезе истраживања

Хипотезе постављене у овом истраживању биле су следеће:

1. Доза витамина D унета путем хране ће значајно утицати на вредности испитиваних фармакокинетичких параметара (клиренс и волумен дистрибуције).
2. Временски период изложености сунчевој светлости ће значајно утицати на вредности испитиваних фармакокинетичких параметара.
3. Серумски нивои калцијума и фосфата ће значајно утицати на вредности испитиваних фармакокинетичких параметара.
4. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D са густином костију (Т или Z скором) и годинама старости испитаница.
5. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и квалитета живота код жена старијих од 35 година.
6. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и депресивности код жена старијих од 35 година.
7. Претпоставља се да постоји корелација између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и страха код жена старијих од 35 година.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Врста студије

Истраживање је спроведено као проспективна студија пресека за коју је добијено одобрење Етичког комитета Клиничког центра у Крагујевцу 28.11.2016. године, заведено под бројем 01/15485. Истраживање је спроведено у периоду од фебруара до августа 2017. године на Интерној клиници, Клиничког центра у Крагујевцу.

3.2 Испитаници

Истраживање је обухватило популацију жена старости од 35. до 75. године живота које су долазиле на редовни или контролни остеодензитометријски преглед у Центар за остеодензитометрију на Интерној клиници, Клиничког центра у Крагујевцу.

Критеријуми за укључење у истраживање су били следећи:

- здраве жене старости од 35-75 година
- жене које нису мењале уобичајене навике у исхрани најмање током 6 месеци
- жене које се нису придржавале неких дијетских режима
- жене које нису користиле самоиницијативно витаминску суплементацију (осим прописане од стране специјалисте- реуматолога)
- жене које су добровољно прихватиле учешће у студији.

Искључујући критеријуми у спроведеном истраживању су били: труднице, дојиље, жене које имају секундарну остеопорозу и присуство следећих обољења: инфламаторних (реуматоидни артритис, системски лупус еритематодус, Кронова болест, улцерозни колитис, хипогонадизам, ендокринопатије (Кушингов синдром, хипертиреодизам, примарни хиперпаратиреодизам, хиперпролактинемија, акромегалија, дијабетес мелитус), малапсорпција, пернициозна анемија, целијачна

болест, гастректомија, хематолошка (мултипли мијелом, мијелопролифераторна обољења), Паџетова болест и други малигнитети костију као и хронична употреба следећих лекова: кортикостероиди, традиционални антиепилептици, хипогликемици (тиазолидиндиони), селективни блокатори преузимања серотонина, тироксин, инхибитори ароматазе, тамоксифен, гонадотропин рилизинг хормон, хемотерапија, имуносупресиви (циклоспорин, такролимус, метотрексат), литијум, хепарин инхибитори протонске пумпе, антациди који садрже алуминијум), жене које узимају активни облик витамина D (1,25-дихидрокси витамин D или алфа D3), дијететски режими исхране, акутно или хронично присуство бубрежних или обољења јетре и самоиницијативно прекидање учешћа у студији.

Пре спровођења истраживања извршено је одређивање величине узорка употребом компјутерског програма G power 3.1.2 при чему су дефинисани почетни параметри за снагу студије 80%, и вероватноћу грешке првог типа (α) од 0,05 за двосмерно тестирање хипотезе. Средња вредност концентрације витамина D, на основу доступних литературних података, износила је 23,63 ng/ml са стандардном девијацијом (SD) од $\pm 10,48$ ng/ml (Carpatina et al. 2014). На основу наведених параметара применом t-теста израчуната је величина узорка од 74 пацијенткиње. Обзиром да је студијска популација била подељена у три субгрупе, израчуната величина узорка је била утростручена, односно износила је најмање 222 испитанице.

У спроведеном истраживању је добровољно учествовало 224 испитаница. Студијска популација је била подељена у три подгрупе на основу два основна критеријума:

- према вредности измерене густине костију и T (или Z) скору добијених DXA методом: густина костију односно T (или Z) скор у оквиру физиолошких вредности (T скор већи од -1 SD или Z скор већи $-2,5$ SD), остеопенија (T скор у распону од -1 до $-2,5$ SD) и остеопороза (T скор мањи од $-2,5$ SD).
- према годинама живота, односно времену настајања менопаузе: жене у пременопаузи односно са редовним менструалним циклусом (од 35. године

до менопаузе), жене у пери и/или постменопаузи (од менопаузе до 65. године живота) и старије жене (од 65. до 75. године живота).

Протокол током спровођења овог истраживања је био следећи:

1. дан: разговор са испитаницама о истраживању и потписивање Информисаног пристанка, мерење густине костију DXA методом односно бележење вредности густине костију, T и Z скорa као и антропометријских мерења прописане комедикације и присуству коморбидитета из медицинске документације. Затим су испитанице биле замољене да попуне упитнике (укупно пет) који су били укључени о ово истраживање. Први упитник је био епидемиолошки упитник дизајниран за прикупљање демографских података и присуству фактора ризика за смањену коштану густину или настанак остеопеније или остеопорозе, друга два су се односила на процену депресије и страха, и још два упитника за процену њиховог квалитета живота. Након тога испитаницима је дато детаљно упутство за вођење Дневника исхране.

28. дан: прикупљени су Дневници исхране од испитаница и у раним јутарњим сатима, вршено је узимање узорака крви од стране стручног особља за потребне биохемијске и хормонске анализе.

Временски период посматрања испитаница у спроведеном истраживању био је 28 дана. У току овог периода испитанице су попуњавале Дневник исхране, где су током сваког дана прецизно уносиле податке о врсти и количини конзумирања намирница, као и податке о времену који су провеле током дана на сунчевој светлости (изражено у сатима или минутима). Количину намирница тј.оброка које су испитанице конзумирале наводиле у тежинским јединицама (g или mg) или "кухињским мерама" (кашика, кашичица, чаша, итд). На онову информација добијених током студијског периода из Дневника исхране сваке испитанице израчуната је просечна доза унетог витамина D из хране, као и просечно излагање сунцу.

Дневна доза витамина D које су испитанице унеле путем хране је прерачуната на основу препорука о садржају овог витамина у намирницама од стране америчког садржаја Националног нутритивног центра, одсека за пољопривреду (U. S. Department of Agriculture, USDA National Nutrient database for Stanard Reference Relase 24, 2011).

За испитанице које су уносиле витамин D кроз суплементацију, забележена је дневна доза овог витамина из медицинске документације и израчуната на основу декларацијских информација о дози витамина D која се налази у одређеној количини суплемената, а затим и сабрана са претходно поменутих. Током наведеног студијског периода редовно су бележене су и временске прилике на територији Крагујевца од стране истраживача, јер висока облачност и киша значајно утичу на апсорпцију витамина D.

3.3 Анализе крви

Узорци крви испитаница су узимани ујутру, пре доручка, након месец дана вођења Дневника исхране. Крв је била узимана венепункцијом од стране стручног медицинског особља на Клиници за реуматологију КЦ у Крагујевцу у укупној запремини око 25 ml. Укупно је било шест епрувета крви по испитаници: једна "Levender" епрувета за комплетну крвну слику и пет епрувете за: биохемијске анализе (серумски калцијум, фосфати, магнезијум, калијум, натријум, гликемија, уреа, креатинин, укупни протеини, албумини, липограм, ензиме јетре), хормонске анализе (тиреостимулирајући хормон, слободни тироксин; тиронин; антитироидна антитела), паратиреоидни хормон (посебна епрувета) и за мерење серумске концентрације 25-хидрокси витамина D у две епрувете (за ХПЛЦ и имунохемијску методу). Биохемијске анализе и мерење концентрације 25-хидрокси витамина D имуноесејем вршене су у биохемијској лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу, док су хормонске анализе вршене у Центру за нуклеарну медицину, Клиничког центра у Крагујевцу.

3.4 Мерење серумске концентрације 25-хидрокси витамина D

Мерење серумске концентрације калцидиола спроведено је са две аналитичке технике: имуноесејем и хроматографском методом, односно ХПЛЦ анализом.

Од имуноесеја коришћена је електро-хемилуминисцентна метода на Cobas®е 601 анализатору (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), према упутствима произвођача. Коефицијент варијације за интра- и интер-есеј износио је 4.1% односно 4.8%.

За мерење концентрације 25-хидрокси витамина D коришћен је комерцијално доступан кит под називом "Chromsystem реагенсни кит" (број: 38033) који садржи потребне хемикалије за екстракцију из билошког материјала (серума), стандард калцидиола, интерни стандард, контроле (I и II ниво), раствараче за мобилну фазу и колону односно стационарну фазу на којој се врши раздвајање (Meier, 2007). Потребна запремина узорка односно серума износи 0,5ml. Након спровођења екстракције на чврстој фази, 20 µl елуата ињектује се у ХПЛЦ систем. ХПЛЦ апаратура се састојала од: Chrompack ISOS/GRAS пумпе (Chrompack, Middelburg, Netherlands), UV-VIS Chrompack детектора (Chrompack, Middelburg, Netherlands) и Spectra Physics 4600 Data Jet интегратора (Spectra Physics, San Jose, California). Брзина протока износила је 0,7 ml/min, при таласној дужини од 265 nm подешеној на УВ детектору, док је ретенционо време за 25-хидрокси витамин D било 4,2 минута. Доња граница квантификације износила 1.4 µg/ L, а интра- и интериндивидуална варијабилност је била < 3 % и 3.3%, респективно (Erlenfeld, 2004).

3.5 Популациона фармакокинетичка анализа

Популациона фармакокинетичка анализа (ПФК) прикупљених података у овом истраживању извршена је употребом софтверског програма NONMEM-а (верзија 7.3.1). Прва фаза у овом моделирању јесте изградња базног модела у коме се добијају процене средњих, популационих вредности испитиваних ФК параметара (клиренс и волумен дистрибуције), њихове интериндивидуалне и интраиндивидуалне или

резидуалне варијабилности употребом наведеног софтвера и одговарајуће субрутине уз коришћење података из литературе (без испитивања утицаја било ког фактора).

Из доступне библиотеке софтвера у овом истраживању селектована је АДВАН 1 субрутина која описује модел са једним одељком без апсорпције, и која је најбоље описала фармакокинетичку диспозицију 25-хидрокси витамина D у испитиваним популацијама. У овој фази се такође испитују и различити модели грешака који најбоље описују испитиване варијабилности.

Интериндивидуална варијабилност је испитивана експоненцијалним и адитивним моделом грешке, док је за резидуалну варијабилност било спроведено испитивање четири различита модела грешке: адитивни, експоненцијални, константни коефицијент варијације и комбиновани модел грешке.

Спроведо испитивање указало је да експоненцијални модел грешке најбоље описује интериндивидуалну варијабилност, док је адитивни модел грешке био коришћен за описивање интраиндивидуалне варијабилности код све три испитиване субпопулације жена. Након тога и укључивања адекватног модела грешке добијају се процене ПФК параметара и њихових варијабилности. Програм такође у извешају даје и вредност минимума објективне функције (МОФ). Ова вредност се дефинише као негативни двоструки логаритам вероватноће података, чија промена вредности у даљем процесу моделирања јесте основни статистички критеријум за процену статистичке значајности утицаја фактора који се испитују (Velickovic-Radovanovic et al. 2015; Milovanovic et al. 2015). Поред тога, додатни критеријуми су били укључени у ову ПФК анализу (од базног модела све до формирања коначног ПФК модела): смањење обе варијабилности за клиренс испитиваног витамина, као и побољшање графичког приказа између популационих или индивидуалних предвиђених концентрација калцидиола насупрот његовим измереним серумским концентрацијама.

Други део анализе односно самог моделирања је веома сложен и укључује испитивање утицаја свих жељених и унапред дефинисаних фактора (демографски, биохемијски, хормонски и клинички) на варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина D.

Сваки појединачни фактор или коваријанта се додаје у базни модел на линеаран и нелинеаран начин при чему се бележи промена у МОФ вредностима у односу на базни модел. Уколико је смањење у МОФ вредностима веће од 3,84 јединица утицај испитиваног фактора се може сматрати статистички значајним (Velickovic-Radovanovic et al. 2015; Nikolic et al. 2016). Процес се спроводи за све факторе који су дефинисани на почетку и прикупљени у испитиваној популацији. По завршетку овог најкомплекснијег корака, истовремено се додају у модел сви фактори или коваријанте које су показале статистичку значајност. Овај модел се назива пуни модел у коме се истовремено добијају и квантитативне, процењене вредности значајних коваријанти као и вредности МОФ-а у пуном ПФК моделу.

Међутим, могући утицај фактора мора се још једном потврдити уз примену строжијих статистичких захтева. Спроводи појединачно искључивање свих фактора пуног модела, при чему МОФ вредност треба да се повећа за најмање 6,6 јединица да би се његов утицај сматрао статистички значајним. Овај процес се назива још и уназадна делеција, при чему само они фактори који су испунили и овај услов остају као коваријанте коначног ПФК модела. Коначни ПФК модел клиренса испитиваног витамина садржи једначину са процењеном популационом или типичном вредношћу клиренса 25-хидрокси витамина D, као и квантитативну вредност фактора који остварују значајан утицај на овај ФК параметар. Такође се добијају процене обе варијабилности и претходно поменути графички прикази који показују бољу дистрибуцију података између измерених и предвиђених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D. На основу ове једначине може се израчунати клиренс калцидиола код сваког индивидуалног испитаника или пацијента и на основу тога прилагодити индивидуална доза лека са циљем спровођења рационалне фармакотерапије у клиничкој пракси (Velickovic-Radovanovic et al. 2015; Milovanovic et al. 2015; Nikolic et al. 2018).

За процену предиктивних перформанси, валидности и стабилности добијених фармакокинетичких модела испитиваног витамина у све три субпопулације жена коришћена је интерна валидација употребом "bootstrapping" анализе уз израчунавање средње вредности фармакокинетичких параметара, стандардне девијације, стандардне

грешке и 95% интервала поверења за сваки испитивани параметар и обе испитиване варијабилности.

Ова метода валидације укључује да програм насумично и поновно врши узимање појединачних узорака (стотинама до хиљаду пута) из основног сета података на којима је модел развијен, при чему сваки пут даје процене ФК параметара, фактора коначног модела као и испитиваних варијабилности.

3.6 Упитници

Повећање учесталости настанка прелома код особа женског пола значајно доприноси присуство страха, анксиозности и депресије. Поред тога, резултати истраживања су показали да витамин D може бити значајан и за когнитивне функције код човека (обзиром да се његов рецептор налази и у мозгу) као и појаву депресивних симптома код пацијената (Milovanovic et al. 2015). Такође, смањена густина костију и присуство остеопеније или остеопорозе редукује значајно и квалитет живота пацијената. Због свега тога су у овом истраживању као инструменти процене коришћени следећи упитници:

- Епидемиолошки упитник
- Упитници за процену квалитета живота Европске Фондације за Остеопорозу под називом Quality of Life Questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QALFFO-41) и Светске Здравствене Организације под називом World Health Organization Quality of Life (WHOOL-BREF), њихове скраћене верзије
- Беков упитник за самопроцену депресивности (BDI, The Beck Depression Inventory)
- Упитник за процену страха од медицинских поступака (MFS, Medical Fear Survey).

Сви упитници су валидирани и културолошки адаптирани на српски језик (10-13). Такође, добијена је дозвола аутора за њихова коришћење у овом истраживању.

3.6.1 Епидемиолошки упитник

Овај упитник је посебно дизајниран за прикупљање потребних података од испитаника за спровођење овог истраживања. Подаци који су прикупљени овим упитником су се односили на идентификацију фактора ризика: године старости, да ли имају редовни менструални циклус, време протекло од последње менструације, породична анамнеза о остеопорози, да ли су имале преломе (место и број), комедикација, присуство коморбидитета као и начин живота (просечно дневно конзумирање кафе, алкохола, цигарета и физичка активност), као и одређивање типа коже коришћењем Fitzpatrick скале (Fitzpatrick, 1988).

3.6.2 Упитник за процену квалитета живота (QUALEFFO-41)

Процена квалитета живота испитаника се врши најчешће употребом упитника који могу генерички и специфични за одређења стања и болести.

Према доступним литературним подацима упитник о процени квалитета живота Европске Фондације за Остеопорозу, QUALEFFO-41 је најчешће коришћен специфични упитник за процену HRQOL пацијената, којима је дијагностикована остеопороза (са или без присуства прелома) и остеопенија (Cooper et al. 2008; Tosteson et al. 2002; Oleksik et al. 2000). Постоји неколико верзија овог упитника. Прва верзија овог упитника је садржала 48 питања али је процесом валидације број питања смањен на 41 (Lips et al. 1997). Такође, постоји и краћа верзија овог упитника која се састоји од 31 питања (Lai et al. 2010). Ипак, QUALEFFO-41 упитник је најшире коришћен и преведен је на велики број других језика, валидиран и адаптиран у различитим културама (Lai et al. 2008; Lips et al. 1999; Lips et al. 1997; Lai et al. 2010; Perez et al. 2008; Kocyigit et al. 2003; Rostom et al. 2011). QUALEFFO-41 упитник је дизајниран тако да обухвата главне аспекте живота: бол, физичко функционисање, социјално функционисање, опште здравствено стање и ментално здравље, односно садржи ових пет домена са одговарајућим бројем питања (Lips et al. 1999).

Домен који се односе на процену бола садржи 5 питања, домен којим се процењује физичко функционисање особе садржи 17 питања, социјално тј. друштвено функционисање врши се на основу 7 питања, домен који се односи на процену општег здравственог стања има 3 питања и последњи домен који се односи на процену менталног здравља садржи 9 питања. Већина питања у упитнику има по 5 понуђених одговора. Изузетак су питања под редним бројем 23, и 25 код којих је понуђено три одговара, као и питања са бројем 24, 27, 28, 29 (понуђено је 4 одговора). Скорирање ових питања у каснијој обради података мора се вршити према упутству за коришћење овог упитника. Понуђени одговори се бодују на специфичан начин, односно, "најбољи" одговор носи најмање бодова, а максималан број бодова додељује се "најгорем" одговору. Изузетак у оваквом начину бодовања су питања под редним бројем 33, 34, 35, 37, 39 и 40 код којих се мора применити реверзија у скорирању. Скор сваког домена се рачуна као средња вредност свих одговара из тог домена, а затим се врши линеарна трансформација на скали од 0 до 100.

Као што је већ речено, упитник је подељен на 5 домена и сваки домен се скорира посебно, као просечна математичка вредност свих одговора. Укупан резултат QUALEFFO-41 упитника се израчунава као збир свих питања, а затим се врши линеарна трансформација на скали од 0-100. Већи добијени укупни скор (и скор појединачних домена) код овог упитника указује на лошији квалитет живота. Алгоритам за бодовање направљен је како би се пропорционално израчунао укупан резултат у зависности од броја питања на које је дат одговор. Уколико постоје питања на које пацијент није дао одговор, прорачун се коригује према броју недостајућих вредности, тј. одговора. Према овом алгоритму укупан број питања на који нису добијени одговори од испитаника не сме да прелази 30% свих питања, јер се онда сваки домен па самим тим и укупан резултат сматрају нетачним (Tadic et al. 2012).

3.6.3 Упитник за процену квалитета живота (WHOQOL-BREF)

Током деведесетих година прошлог века WHOQOL група истраживача под надзором Светске здравствене организације је започела истраживање које је за циљ имало развој овог упитника који је за циљ имао процену квалитета живота у целом свету (Bergner et al. 1978). Прва верзија овог упитника је имала ознаку WHOQOL-100 и

он је направљен сарадњом 15 међународних центара а процес развоја ове верзије упитника се састојао из неколико етапа. Овакав облик упитника са ознаком WHOQOL-100 је омогућавао детаљну процену сваке посебне области, међутим, оваква верзија упитника је имала и својих недостатака, а то је да је упитник био сувише дугачак за практичну примену, па се започело са популационим истраживањем упитника са сврхом обезбеђивања кратке форме упитника за процену квалитета живота. Истраживачки центри који су учествовали у формирању нове верзије упитника (у формирању нове верзије је учествовало 18 различитих земаља) су формирали упитник који се састоји од 26 питања. Ова верзија се данас најчешће користи у истраживањима. (Atanasković-Marković et al. 2003).

WHOQOL-BREF упитник је једна од генеричких скала за процену квалитета живота код испитаника. Он се састоји из два дела: први део односи се на питања и податке о демографским подацима испитаника и садржи 6 питања (пол, старост, школска спрема, брачно стање и два питања се односе на здравствено стање) (World Health Organization, 1998). Други део упитника садржи 26 питања. Прва два питања се односе на самопроцену појединца о квалитету живота и осећају задовољства са сопственим здравственим стањем. Остала 24 питања су подељена у следећа 4 домена: то су физичко здравље, психичко здравље, социјални односи и околина.

- Физичко здравље
- Психичко здравље
- Социјална интеракција
- Животна средина

Одговори испитаника на сва питања треба да се односе на њихову процену у последње две недеље, укључујући и дан када су попуњавали упитник (Fass et al. 2002; Yuen et al. 2010). За скорирање овог упитника коришћена су упутства која су добијена од стране Светске здравствене организације (World Health Organization, 1998). Скор сваког од 4 домена се одређује сабирањем одговора свих питања у појединачном домену, израчуна њихова просечна вредност и потом помножи са четири. Затим се

добијене вредности преводе на скалу од 1-100. Укупан квалитет живота се одређује сабирањем одговора за свих 26 питања, а затим се добијена вредност преводи на скалу од 0-100, при чему што је добијена вредност нижа указује на лошији квалитет живота, односно што је добијени укупни скор већи то је квалитет живота бољи.

3.6.4 Беков упитник за самопроцену депресивности (BDI)

За процену симптома и тежине депресије код испитаника постоје многе скале. Међу најпознатијим и највише коришћеним упитницима је Беков упитник за самопроцену депресивности (BDI) (Beck et al. 1988; Beck et al. 1996). Овај упитник је намењен мерењу интензитета и симптома депресивности како код одрасле особе, тако и на популацији адолесцената (Dozois and Covin, 2004).

Иако је прва верзија упитника (BDI I) имала задовољавајуће психометријске карактеристике извршено је његово усаглашавање са психијатријском класификацијом болести и формирања нове верзије BDI II (Beck et al. 1988; Dozois et al. 1998). Временски период приликом одговарања на питања из упитника укључују "две недеље укључујући и данас", јер се сматра да је период од две недеље период који представља минимум за трајање велике депресивне епизоде. Упитник је тестиран на многобројним популацијама и показано је да показује изузетну унутрашњу конзистентност, тест-ретест поузданост и валидност (Beck et al. 1996; Steer et al. 1997; Kumar et al. 2002; Steerat et al. 1998; Dozois et al. 1998, Storch et al. 2004; Whisman et al. 2000; Sloan et al. 2002; Joe et al. 2008; Harris & D'Eon, 2008; Segal et al. 2008).

Психометријске особине и валидација овог упитника (BDI II) извршена је и у популацији у Србији од стране Нововића и сарадника (Нововић et al. 2011). Упитник садржи 21 питање при чему испитаник заокружује један од 4 могућа одговара. Свако питање се скорира од 0 до 3 поена, при чему веће вредности означавају већи интензитет присутних симптома код испитаника. Максималан број поена је 63, при чему постоји степен градације присутне депресивности. Скор од 0 до 13 односи се на одсуству депресивности, од 14 до 19 означава присуство благе депресије, од 20 до 28 умерену, док скор већи од 29 означава тешку депресију.

Упитник је преведен на много других језика и извршена је културолошка адаптација. У литератури је доступна португалска, арапска, јапанска, белгијска, кинеска верзија али и друге (Al-Musawi, 2001; Kojima et al. 2002; Vanheule et al. 2008; Wu, 2010; Coelho et al. 2002). Заједнички закључак у свим овим истраживањима је да BDI упитник представља тачну и поуздану меру и ван енглеског говорног подручја.

3.6.5 Упитник за процену страха од медицинских поступака (MFS)

МФС представља важан и практичан инструмент који има за сврху откривање поремећаја тј. фобија или страха код испитаника, као и примену одговарајућих превентивних мера. Идентификација ових особа је важна у циљу решавања важних здравствених проблема као што је одлазак код лекара (због успостављања дијагнозе или примене одговарајуће терапије) услед присуства страха од медицинских поступака.

Ganzeboom је са сарадницима спровео епидемиолошко истраживање на групи студената медицине који су током свог живота имали бар један губитак свести као последицу страха (Ganzeboom et al. 2003). Резултати до којих је дошао је да је 39% студената изгубило свест када је видело вену или приликом вађења крви из вене. Најчешћи узроци губитка свести се јављају као последице страха од медицинских поступака и поступака имобилизације, посебно је забележено присуство страха услед виђења и давања крви (Braun et al. 1997; Sutherland et al. 2008; Graham, 1961; Kleinknecht et al. 1996).

Kleinknecht је са сарадницима 1996. године је развио посебно користан инструмент којим процењује да ли је и у ком степену присутан страх од медицинских поступака. Упитник садржи питања која се односе на различите медицинске процедуре, осећај који је присутан када особа види крв, као и питања која се односе на повезаност између фобија, страхова и несвестице (Kleinknecht et al. 1996). Овај упитник садржи укупно 50 питања, подељених у 5 домена од којих сваки садржи по 10 питања. Домени су следећи: страх од призора осакаћених делова тела, страх од оштрих предмета, страх од крви, страх од медицинских прегледа, као и страхови који се јављају приликом давања инјекције или вађења крви. Питања се скорирају у нумеричкој вредности од 0 до 4.

Вредност 0 указује на непостојање страха, док бројеви 1,2,3 и 4 указује на постојање благог, значајног, јаког и ужасног страха код особе, респективно.

Овај упитник не садржи питања код којих постоји обрнуто скорирање, а укупан резултат се добија једноставним сабирањем и креће се у нумеричкој вредности од 0-200. Што је скор овог упитника већи указује на веће присуство страха код испитаника.

Упитник поседује високу ефикасност за успешно постављање дијагнозе фобије, као и могућност предвиђања настанка фобије уколико пацијент буде изложен некој појави или процесу који је описан у упитнику (Kleinknecht et al. 1996; Olatunji et al. 2012).

Сматра се да је фобија и страх од медицинских поступака широко распрострањена (3-4%) у општој популацији, а да свака пета особа која има фобију избегава дијагностичке процедуре, хоспитализацију и или употребу медикаментозне терапије (Ferenidou et al. 2012; Ayala et al. 2009; Ducasse et al. 2013). Упитник је преведен и валидиран у многим земљама ван енглеског говорног подручја. Психометријске особине, валидација и културолошка адаптација извршена је и у Србији (Djokovic et al. 2016). Упитник је показао добре психометријске особине и може се користити у нашој земљи.

3.7 Статистичка обрада података

У статистичкој обради прикупљених података у овом истраживању континуалне варијабле су презентоване као средња вредност \pm SD у тексту и табелама, док су категоријске варијабле презентоване као пропорција испитаника са одређеним исходом. Статистичка анализа је вршена помоћу SPSS софтверског пакета верзија 21.0. Анализирање нормалности расподеле за континуалне варијабле је вршено употребом Колмогоров-Смирнов теста. У случају постојања нормалне расподеле значајност разлике у овим варијаблама је испитивана параметријским Студентовим t тестом за две групе или анализом варијанси (ANOVA) за три и више група. За варијабле које нису имале нормалну расподелу података коришћен је непараметријски Mann-Whitney-ев

тест. Анализирање статистичке значајности категоријских варијабли вршено је употребом Pearson-овог χ^2 тест.

За утврђивање постојања корелације измерених концентрација витамина D са вредностима густине костију (T или Z скором), годинама старости, нивоом депресије, страха и квалитетом живота код испитаница вршено је методом линеарне регресионе анализе и утврђивањем коефицијента корелације употребом Excel-а из Microsoft Office програмског пакета и програма SPSS, верзија 21. Статистичка значајност у примењеним тестовима била је одређена вредношћу $p < 0.05$ као и 95% интервалом поверења.

4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Демографске карактеристике испитиване популације

Испитивана популација састојала се из три субпопулације жена које су долазиле на редовни или контролни преглед у Центар за остеодензитометрију у Клинички центар Крагујевац: жене које имају редовни менструални циклус, жене у менопаузи и старије жене (после 65. године живота). Просечна старост испитаница, са стандардном девијацијом (SD) и распонем, као и њиховом телесном масом и индексом телесне масе приказана је у Табели 3. Укупан број испитаница износио је 224 са следећом структуром: 74 жене које имају редован менструални циклус, 75 жена које су биле у менопаузи и исто толико (n=75) старијих жена.

Табела 3. Демографске карактеристике испитиване популације

Параметар	Средња вредност ± SD*	Распон	Јединице
Жене у циклусу (n=74)			
Старост	40,12 ± 4,35	35-50	године
Телесна маса	65,30 ± 5,80	53-86	kg
Индекс телесне масе	23,28 ± 2,02	19,92-28,73	kg/m ²
Жене у постменопаузи (n=75)			
Старост	57,92 ± 3,93	48-64	године
Телесна маса	69,76 ± 11,49	45-103	kg
Индекс телесне масе	26,88 ± 4,38	18,49-37,55	kg/m ²
Старије жене (n=75)			
Старост	67,41 ± 2,30	65-78	године
Телесна маса	70,67 ± 12,41	39-110	kg
Индекс телесне масе	27,74 ± 4,75	17,36-42,97	kg/m ²

* Стандардна девијација

Резултати мерења густине костију уз употребу DXA методе у испитиваним популацијама, изражене као минерална густина костију (BMD: Bone Mineral Density) и присуство остеопеније или остеопорозе код испитаница на основу вредности T или Z скорa приказани су у Табели 4. Субпопулација испитаница у менопаузи названа је жене у постменопаузи јер је код свих испитаница у овој групи прошло више од 12 месеци у континуитету од аменореје.

Табела 4. Минерална густина костију и присуство остеопеније/остеопорозе у испитиваним популацијама

Испитиване субпопулације	BMD• Средња вредност \pm SD*	BMD† Средња вредност \pm SD*	BMD‡ Средња вредност \pm SD*	Остеопенија / остеопороза
Жене у циклусу (n=74)	0,74 \pm 0,1	0,92 \pm 0,14	1,02 \pm 0,15	Z скор: - > 0 = 36 - \geq -1 < 0 = 25 - < -1 = 13
Жене у постменопаузи (n=75)	0,67 \pm 0,11	0,84 \pm 0,13	0,79 \pm 0,13	T скор (SD): - нормални = 30 - остеопенија = 36 - остеопороза = 9
Старије жене (n=75)	0,66 \pm 0,08	0,85 \pm 0,14	0,77 \pm 0,12	T скор (SD): - нормални = 12 - остеопенија = 32 - остеопороза = 11

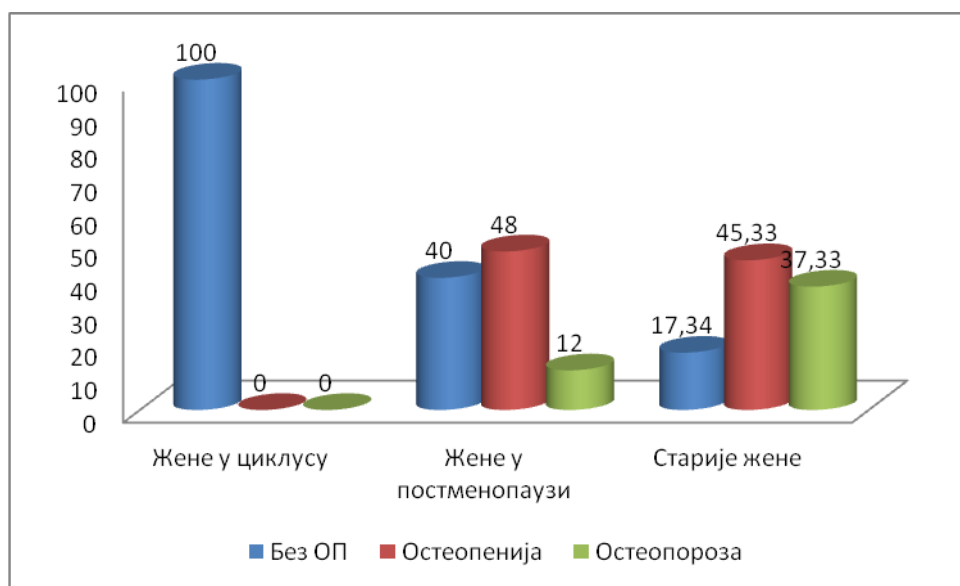
• врат бутне кости; † лумбални део (L1-L4);‡ укупна минерална густина костију

* стандардна девијације

Графички приказ присуства остеопеније и остеопорозе у испитиваним субпопулацијама жена приказан је на Графикону 1. Може се видети да је највеће присуство остеопеније забележено код жена у постменопаузи (n=36), док је у субпопулацији старијих жена била присутна код 34 испитанице, а код субпопулације жена које су у циклусу није забележена.

Присуство остеопорозе је највише заступљено код старијих жена (n=28), док је остеопороза такође била присутна код 9 испитаница које су постменопаузи. Њено присуство није забележено код жена које су имале редован менструални циклус.

Графикон 1. Присуство остеопорозе и остеопеније у испитиваним популацијама (%)



4.2 Популациона фармакокинетичка анализа

Ова анализа је, у све три испитиване субпопулације, спроведена употребом АДВАН 1 субрутине (модел са једним одељком без апсорпције), селектованом из НОНМЕМ (верзија 7.3.1.) софтверске библиотеке. Све концентрације 25-хидрокси витамина D добијене су након постизања равнотежног стања, где су узорци узети пред следећу дозу (у раним јутарњим сатима).

Испитивани модели грешака за интериндивидуалну варијабилност и интраиндивидуалну варијабилност, показали су да експоненцијални модел грешке најбоље описује интериндивидуалну варијабилност, док је адитивни модел грешке коришћен за описивање интраиндивидуалне варијабилности. Овај одабир је извршен на основу вредности МОФ-а међу појединим моделима грешака, као и графичком приказу између популационих, предвиђених вредности концентрација наспрам измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D код све три субпопулације испитаница.

4.2.1 Популациона фармакокинетичка анализа код жена у циклусу

4.2.1.1 Базни ПФК модел 25-хидрокси витамина D

За изградњу овог модела употребљено је 75 серумских концентрација 25-хидрокси витамина D добијених од исто толико испитаница (један узорак/пацијенту). На основу прикупљених података од пацијената, као и унетих вредности о дневној дози, дозном режиму као и времену протеклом од последње дозе до узимања узорака крви, као и иницијалних вредности фармакокинетичких параметара 25-хидрокси витамина D из литературе, добијене су популационе, средње вредности његовог клиренса, волумена дистрибуције, као и обе испитиване варијабилности у овој популацији жена. Њихове демографске карактеристике, биохемијске и хормонске анализе, као и медикаментозни и клинички подаци приказани су у Табели 5.

Табела 5. Демографски, биохемијски, хормонски, медикаментозни и клинички подаци жена у циклусу

Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност \pm SD)	Распон	Јединице
Број пацијената	74		
Број узорака	74		
Старост	40,11 \pm 4,35	35 – 50	године
Телесна маса	65,30 \pm 5,80	53 – 85	kg

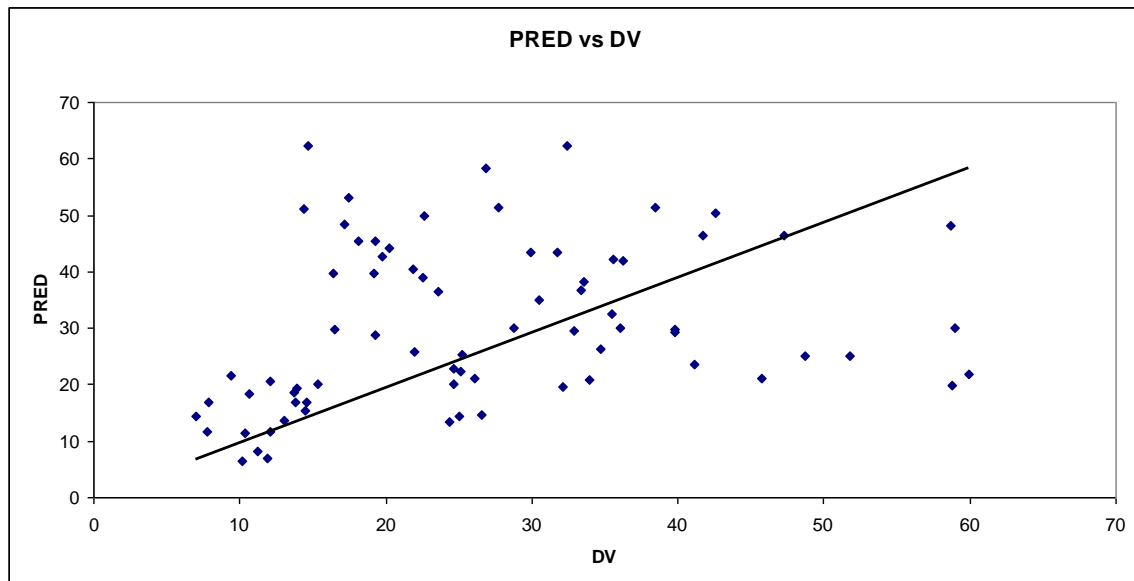
Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност ± SD)	Распон	Јединице
Индекс телесне масе	23,28 ± 2,02	19,92 – 28,73	kg/m ²
Дневна доза (из хране)	4,30 ± 2,02	0,9 – 8,8	µg/дан
Серумска концентрација 25 ОН D	26,51 ± 13,49	6,97 – 59,89	ng/mL
Серумски калцијум	2,37 ± 0,10	2,18 – 2,64	mmol/L
Серумски фосфати	11,1 ± 0,20	0,73 – 1,63	mmol/L
Серумски натријум	139,42 ± 1,82	135-144	mmol/L
Серумски калијум	4,44 ± 0,40	3,7 – 5,2	mmol/L
Серумски хлориди	103,84 ± 1,90	99 – 108	mmol/L
Серумски магнезијум	0,85 ± 0,07	0,66 – 1,09	mmol/L
Холестерол	5,78 ± 1,13	3,71 – 8,45	mmol/L
ХДЛ	1,52 ± 0,33	0,9 – 2,36	mmol/L
ЛДЛ	3,78 ± 0,93	2,23 – 6,14	mmol/L
Триглицериди	1,22 ± 0,50	0,55 – 3,1	mmol/L
Укупни серумски протеини	71,74 ± 4,4	62 – 81	g/L
Укупни серумски албумини	44,07 ± 2,97	37 – 52	g/L
Серумски глобулини	27,47 ± 4,22	18 – 37	g/L
Ниво глукозе	4,73 ± 0,49	3,5 – 5,8	mmol/L
Уреа	4,52 ± 1,24	1,9 – 7,7	mmol/L
Клиренс креатинина	97,74 ± 15,16	57 – 129	ml/min
Ниво билирубина	10,94 ± 4,77	3,9 – 25,6	umol/L
АСТ	22,08 ± 6,94	11 – 48	IU/L
АЛТ	19,86 ± 9,28	5 – 59	IU/L
ТСХ	2,13 ± 1,15	0,3 – 5,9	mIU/L

Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност ± SD)	Распон	Јединице
T4	11,52 ± 4,20	4,4 – 25,3	pg/mL
T3	3,45 ± 3,53	1,9 – 32,9	pg/mL
ТПОАт	306,71 ± 1074,02	1 – 7344	IU/ml
ПТХ	36,77 ± 14,81	11,7 – 89,4	pg/mL
ЛДХ	344,66 ± 64,31	192 – 555	U/L
ЦК	102,32 ± 111,72	28 – 982	U/L
Ц-реактивни протеин	1,92 ± 2,61	0,1– 15,2	mg/L
Ниво хемоглобина	133,58 ± 9,76	103,1– 155,3	g/L
Хематокрит	0,40 ± 0,03	0,32 – 0,47	L/L
РБЦ	4,41 ± 0,34	3,59 – 5,21	10 ¹² /L
МЦВ	91,48 ± 4,94	78,28 – 99,85	fL
МЦХ	30,26 ± 1,83	24,94 – 33,19	pg
МЦХЦ	330,43 ± 5,15	318,6 – 340	g/L
РДВ	14,11 ± 2,20	12,39 – 29,33	%
Излагање сунчевој светлости	2,20 ± 0,84	0,72 – 5,15	h
Излагање сунцу (<2h/ >2h)	33/42		h
БМД	0,73 ± 0,1	0,46 – 1,02	
Z скор (СД):			
- > 0	- 36/74		
- < 0 <-1	- 25/74		
- < -1	- 13/74		
Унос кафе (>3 шољице/ ≤3шољице)	13/61		
Алкохол (>3 чашице/ ≤3 чашице)	27/47		
Пушачи (да/не)	31/43		
Наследна предиспозиција (да/не)	33/41		
Тип коже (2/3)	9 /65		

Процењене, добијене вредности фармакокинетичких параметара 25-хидрокси витамина D и обе испитиване варијабилности (изражене као коефицијент варијације у %) као и вредности МОФ-а у базном моделу биле су следеће:

- Клиренс 25-хидрокси витамина D: 0,0938L/h
- Волумен дистрибуције: 0,206 L
- Интериндивидуална варијабилност: 53,29%
- Интраиндивидуална варијабилност: 56,53%
- Минимум објективне функције: 477,013
- Однос између предвиђених, популационих концентрација и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D приказани су на Графикону 2.

Графикон 2. Однос између предвиђених популационих вредности концентрација и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D



4.2.1.2 Резултати изградње пуног ПФК модела

Након формирања базног модела и добијених, процењених вредности фармакокинетичких парематара 25-хидрокси витамина D, као и вредности минимума објективне функције, испитиван је утицај појединачних фактора на популациону вредност клиренса. Укупно је испитивано 47 фактора који су приказани у Табели 6. Сваки од ових фактора: старост, телесна маса, индекс телесне масе, дневна доза (из хране), серумска концентрација калцидола, серумски калцијум, фосфати, натријум, калијум, хлориди, магнезијум, холестерол, ХДЛ, ЛДЛ, триглицериди, укупни серумски протеини, укупни срумски албумини, серумски глобулини, ниво глукозе, уреа, клиренс креатинина, ниво билирубина, АСТ, АЛТ, ТСХ, Т4, Т3, ТПОАт, ПТХ, ЛДХ, ЦК, Ц-реактивни протеин, ниво хемоглобина, хематокрит, РБЦ, МЦВ, МЦХ, МЦХЦ, РДВ, излагање сунчевој светлости, излагање сунцу, БМД, Z-скор (SD), унос кафе, алкохол, пушачи, наследне предизпозиције и тип коже је додаван у базни модел на линеаран или нелинеаран начин при чему је бележена разлика односно смањење у МОФ вредностима у односу на базни модел. Да би се фактор сматрао статистички значајним, разлика у МОФ вредности требала је бити мања од 3,84 ($p < 0,05$). Само оне коваријанте које су испуниле ове захтеве су биле саставни део пуног модела, у који су онда истовремено били укључени сви фактори који су претходно испољили свој утицај. То су били следећи фактори: аланин-аминотрансфераза и просечна дневна доза витамина D унета путем хране. Забележена вредност минимума објективне функције у овом моделу била је 433,085.

Табела 6. Изградња пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D код субпопулације жена у циклусу

Модел клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	P вредност
БАЗНИ МОДЕЛ CL= $\theta_1 * \text{EXP}(\text{ETA}(1))$	477,013		
ИНДИВИДУАЛНИ ИСПИТИВАНИ РЕГРЕСИОНИ МОДЕЛИ CL= $\theta_1 * \text{EXP}(\text{ETA}(1)) + \theta_3 * \text{TM}$	476,677	0,336	>0,05

Модели клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	Р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_4 * ИТМ$	475,779	1,234	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_5 * ГОД$	476,431	0,582	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_6 * ДД$	433,053	43,96	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_7 * Са$	477,012	0,001	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_8 * Фос$	477,003	0,01	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_9 * На$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{10} * К$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{11} * Хлор$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{12} * Мг$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{13} * Холе$	477,008	0,005	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{14} * ХДЛ$	476,887	0,126	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{15} * ЛДЛ$	476,532	0,481	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{16} * Триг$	476,957	0,056	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{17} * Прот$	476,901	0,112	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{18} * Алб$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{19} * Глоб$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{20} * Глук$	477,011	0,002	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{21} * Уреа$	473,589	3,424	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{22} * Ссг$	476,744	0,269	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{23} * Бил$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{24} * АСТ$	476,094	0,919	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{25} * АЛТ$	469,429	7,584	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{26} * ТСХ$	477,008	0,005	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{27} * Т4$	477,005	0,008	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{28} * Т3$	474,266	2,747	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{29} * ТПОАТ$	477,006	0,007	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{30} * ПТХ$	476,534	0,479	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{31} * ЛДХ$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{32} * ЦК$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{33} * ЦРП$	476,001	1,012	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{34} * Хем$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{35} * Хцт$	477,013	0	>0,05

Модели клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	Р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{36} * РБЦ$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{37} * МЦВ$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{38} * МЦХ$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{39} * МЦХЦ$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{40} * РДВ$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{41} * СУН_1$	477,003	0,01	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{42} * СУН_2$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{43} * БМДу$	475,669	1,344	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{44} * Z$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{45} * Коф$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{46} * Алк$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{47} * ПУШ$	477,011	0,002	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{48} * НП$	477,013	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{49} * ТК$	477,013	0	>0,05

CL: клиренс (l/h); ETA (1): интериндивидуална варијабилност CL; θ_3 до θ_{49} параметри коваријантних ефеката; ТМ: телесна маса; ИТМ: индекс телесне масе; ГОД: године живота; ДД: просечна дневна доза унета путем хране и суплементације; Са: серумски калцијум; Фос: серумски фосфати; На: серумски натријум; К: серумски калијум; Хлор: серумски хлориди; Мг: серумски магнезијум; Холе: холестерол; ХДЛ: хдл холестерол; ЛДЛ: лдл холестерол; Триг: триглицериди; Прот: укупни серумски протеини; Алб: укупни серумски албумини; Глоб: серумски глобулини; Глук: ниво глукозе; Уреа: уреа; С_{сг}: клиренс креатинина; Бил: ниво билирубина; АСТ: аспартат аминотрансфераза; АЛТ: аланин аминотрансфераза; ТСХ: тиреостимулирајући хормон; Т4: тироксин; Т3: тиронин; ТПОат: анти tiroидна антитела; ПТХ: паратиroidни хормон; ЛДХ: лактат дехидрогеназа; ЦК: креатин киназа; ЦРП: ц-реактивни протеин; Хем: ниво хемоглобина; Хцт: хематокрит; РБЦ: еритроцити; МЦВ: просечан волумен еритроцита; МЦХЦ: средња вредност концентрације хемоглобина у свим еритроцитима; РДВ: коефицијент варијације дистрибуције волумена еритроцита; СУН1 : просечно дневно излагање сунчевој светлости (h); СУН2 : СУН 2: просечно дневно излагање сунчевој светлости више/мање од 2 часа; Z: Z скор (SD); Коф: конзумирање више/мање од 3 шољице дневно кафе (1 ило 0) ; Алк: унос алкохола; ПУШ: пушачи; НП: наследне предиспозиције; ТК: тип коже.

4.2.1.3 Изградња коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D

Да би се утицај претходно испољеног фактора из пуног модела сматрао значајним потребна је била додатна његова провера и строжији статистички захтеви који су укључивали уназадно избацивање при је чему вредност МОФ-а требала да се повећа за најмање 6,6 ($p < 0,01$). Уколико било која појединачна коваријанта пуног модела није испунила овај услов била би избачена као фактор коначног ПФК модела. Резултати формирања коначног модела приказани су у Табели 7. Овом анализом показано је да је само један фактор имао значајан утицај на клиренс 25-хидрокси витамина D, а то је била просечна дневна доза витамина D унета путем исхране. Њене процењене вредности са интервалом поверења као и вредности клиренса 25-хидрокси витамина D и његове обе варијабилности приказани су у Табели 8.

Табела 7. Процес примењене уназадне делеције за формирање коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D код жена у циклусу

Једначина пуног ПФК модела:	МОФ вредности	Разлика у МОФ вредности	p вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_3 * ДД + \theta_4 * АЛТ$	433,085		
Избацивање ДД	476,966	-43,881	<0,01
Избацивање АЛТ	433,099	-0,014	>0,01

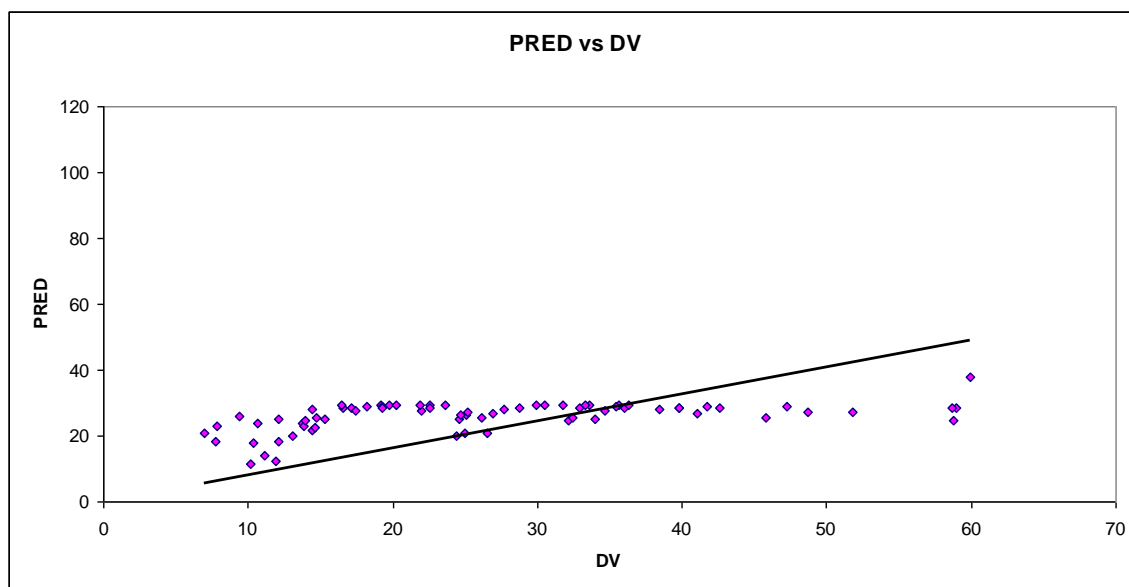
ДД: просечна дневна доза унета путем хране, АЛТ: аланин-аминотрансфераза

Једначина која описује коначни ПФК модел клиренса 25-хидрокси витамина D у овој субпопулацији жена је следећа:

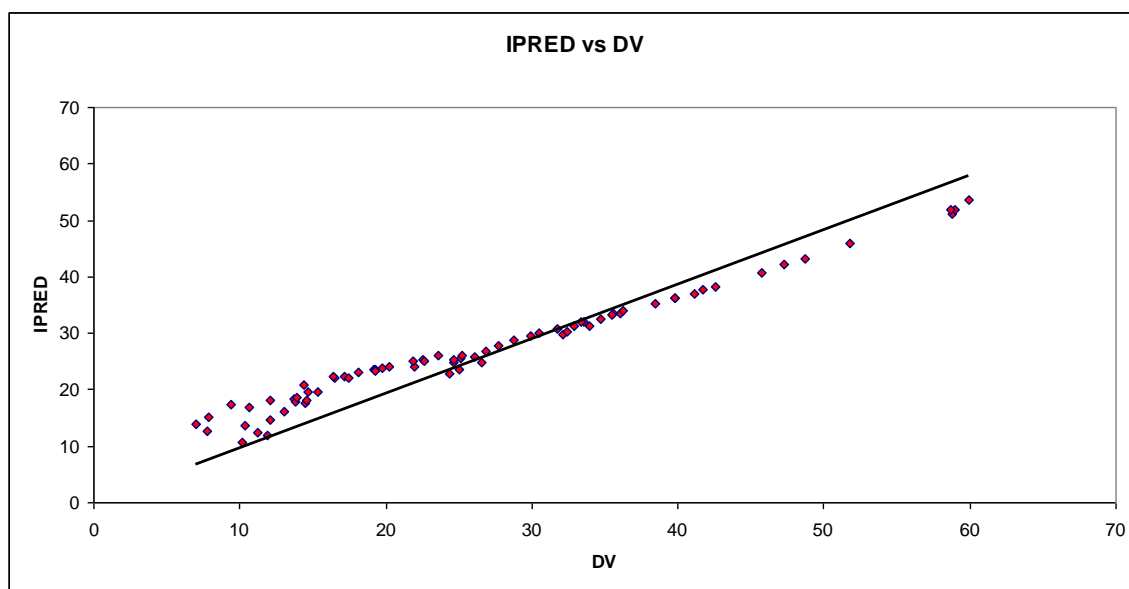
$$CL (L/h) = 0.0991 + 0.00401 \times ДД$$

Интериндивидуална варијабилност у добијеном коначном ПФК моделу износила је 27,95%, док је резидуална варијабилност била 27,64% (изражене као коефицијент варијације).

Графикон 3. Однос између предвиђених популационих вредности концентрација (PRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



Графикон 4. Однос између индивидуалних, предвиђених вредности концентрација (IPRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



4.2.1.4 Валидација коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D

За валидацију коначног модела ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D у овој испитиваној субпопулацији примењена је непараметријска метода односно интерна валидација путем "bootstrap" анализе. Употребом НОНМЕМ софтвера у ову анализу било је укључено 200 насумично изабраних података из основног сета. Средње, добијене вредности ФК параметара и обе варијабилности (интериндивидуалне и резидуалне), просечне дневне дозе витамина D унете путем хране као фактора коначног модела и њихови 95% интервали поверења добијени овом анализом и приказани су у Табели 8 у циљу поређења са процењеним вредностима добијених током изградње коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D. Сличне вредности сугеришу на добру стабилност и предвидљивост коначног ПФК модела.

Табела 8. Процене ФК параметара и фактора коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D добијених НОНМЕМ и "bootstrap" анализом

Параметар	НОНМЕМ анализа		Bootstrap анализа	
	Процењена вредност	95% CI*	Процењена вредност	95% CI [‡]
CL/F (L/h)	0,0991	0,0818 – 0,1164	0,1017	0,0943 – 0,1091
Дневна доза унета путем хране	0,00401	0,00299– 0,00503	0,00398	0,00301– 0,00495
Интериндивидуална варијанса of CL- ω^2_{CL}	0,0752	0,0525 – 0,0979	0,0746	0,0469 – 0,1023
Резидуална варијанса - σ^2	0,0736	0,0447 – 0,1025	0,0742	0,0441 – 0,1043

* (процењена вредност) \pm 1.96 x (стандардна грешка)

[‡] 2,5. и 97,5. перцентици процењених параметара "bootstrap" анализом

4.2.2 Популациона фармакокинетичка анализа код жена у постменопаузи

4.2.2.1 Базни ПФК модел 25-хидрокси витамина D

Применом већ поменутих принципа и употребом НОНМЕМ софтвера уз селектовану АДВАН 1 субрутину као и на основу прикупљених података у овој испитиваној субпопулацији испитаница (n =75) развијен је базни ПФК модел клиренса 25-хидрокси витамина D. Демографски, биохемијски, хормонски, медикаментозни и клинички подаци жена у постменопаузи приказани су у Табели 9. Такође, спроведено испитивање модела грешака указало је да је интериндивидуална варијабилност најбоље описана експоненцијалним моделом грешке, док је за резидуалну варијабилност примењен адитивни модел грешке.

Табела 9. Демографски, биохемијски, хормонски, медикаментозни и клинички подаци жена у постменопаузи

Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност ± SD)	Распон	Јединице
Број пацијената	75		
Број узорака	75		
Старост	57,92 ± 3,93	48 - 64	године
Телесна маса	69,76 ± 11,49	45 - 103	kg
Индекс телесне масе	26,88 ± 4,38	18,49-37,55	kg/m ²
Дневна доза (из хране и	24,01 ± 15,3	1,6 – 70,06	µg/дан
Серумска концентрација 25 ОН D	26,19 ± 10,95	3,45 – 61,92	ng/mL
Серумски калцијум	2,38 ± 0,13	2,0 – 2,7	mmol/L
Серумски фосфати	1,11 ± 0,19	0,7 – 1,81	mmol/L
Серумски натријум	140,23 ± 1,72	135-145	mmol/L
Серумски калијум	4,54 ± 0,92	3,9 – 11,8	mmol/L
Серумски хлориди	103,47 ± 2,12	96 – 108	mmol/L
Серумски магнезијум	0,86 ± 0,08	0,66 – 1,05	mmol/L
Холестерол	6,21 ± 1,10	3,71 – 9,09	mmol/L
ХДЛ	1,49 ± 0,30	0,83 – 2,44	mmol/L

Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност ± SD)	Распон	Јединице
ЛДЛ	4,05 ± 0,91	2,36 – 6,96	mmol/L
Триглицериди	1,44 ± 0,70	0,43 – 3,93	mmol/L
Укупни серумски протеини	70,89 ± 4,4	63 – 82	g/L
Укупни серумски албумини	43,07 ± 4,34	16 – 50	g/L
Серумски глобулини	27,45 ± 4,08	17 – 41	g/L
Ниво глукозе	5,14 ± 0,82	3,5 – 9,09	mmol/L
Уреа	5,32 ± 1,64	3,1 – 10,2	mmol/L
Клиренс креатинина	85,84 ± 17,3	58 – 127	ml/min
Ниво билирубина	9,15 ± 3,66	3,8 – 20,7	g/L
АСТ	21,87 ± 4,22	13 – 37	IU/L
АЛТ	20,19 ± 7,42	7 – 54	IU/L
ТСХ	2,05 ± 1,22	0,3 – 5,4	mIU/L
Т4	10,99 ± 3,24	2,1 – 19,3	pg/mL
Т3	3,95 ± 6,93	1,9 – 62,9	pg/mL
ТПОАт	506,30 ± 1592,79	1 – 8901	IU/ml
ПТХ	37,54 ± 14,4	10,2 – 82,4	pg/mL
ЛДХ	369,52 ± 56,47	206 – 521	U/L
ЦК	105,35 ± 40,86	47 – 249	U/L
Ц-реактивни протеин	3,40 ± 7,67	0,2– 65,1	mg/L
Ниво хемоглобина	133,96 ± 10,53	104,9– 155,8	g/L
Хематокрит	0,40 ± 0,03	0,32 – 0,47	L/L
РБЦ	4,42 ± 0,32	3,59 – 5,09	10 ¹² /L
МЦВ	91,82 ± 5,32	72,99 – 103,8	fL
МЦХ	30,32 ± 2,06	22,11 – 34,52	pg
МЦХЦ	329,06 ± 18,31	226,4 – 341,9	g/L
РДВ	14,22 ± 2,18	11,85 – 29,33	%
Излагање сунчевој светлости	2,69 ± 1,34	0,78 – 6,7	h
Излагање сунцу (<2h/ >2h)	42/33		h
БМД	0,79 ± 0,13	0,44 – 1,01	

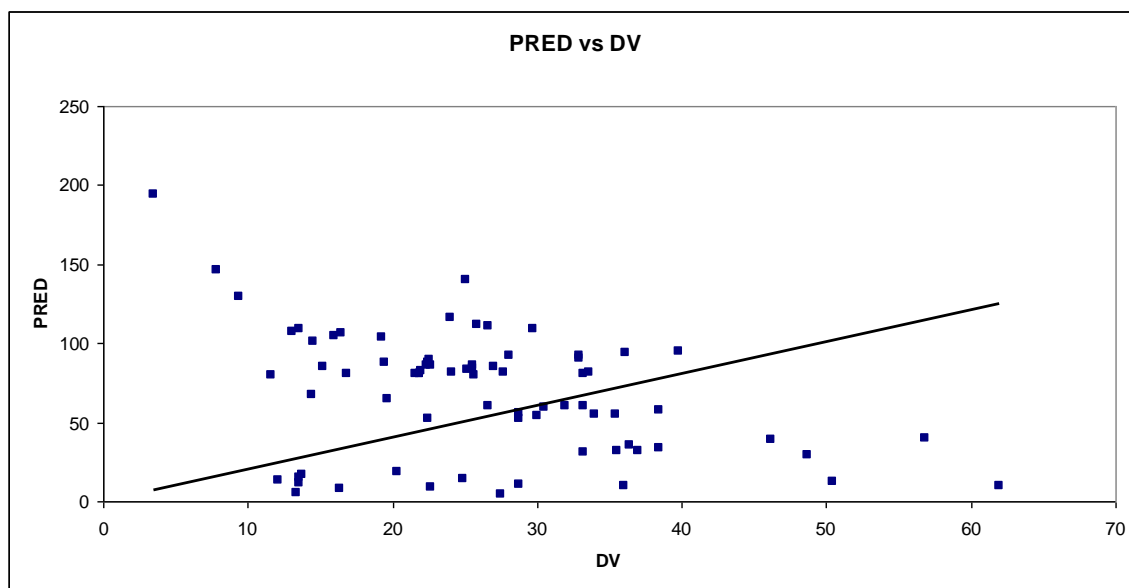
Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност ± SD)	Распон	Јединице
Т скор (СД):			
- нормални	- 30/75		
- остеопенија	- 36/75		
- остеопороза	- 9/75		
Унос кафе (>3 шољице/ ≤3шољице)	22/53		
Алкохол (>3 чашице/ ≤3 чашице)	10/65		
Пушачи (да/не)	37/48		
Наследна предиспозиција (да/не)	20/55		
Тип коже (2/3)	23 /52		
Комедикација са:			
- бифосфонатима	- 35/40		
- калцијумом	- 12/63		
- статинима	- 13/62		
- бензодиазепинима	- 20/55		

Сprovedено испитивање модела грешака указало је да је интериндивидуална варијабилност најбоље описана експоненцијалним моделом грешке, док је за резидуалну варијабилност примењен адитивни модел грешке. Процењене, средње вредности фармакокинетичких параметара 25-хидрокси витамина D и обе испитиване варијабилности (изражене као коефицијент варијације у %) као и вредности МОФ-а у базном моделу износиле су:

- Клиренс 25-хидрокси витамина D: 0,0722L/h
- Волумен дистрибуције: 0,126 L
- Интериндивидуална варијабилност: 39,50%

- Интраиндивидулна варијабилност: 44,81%
- Минимум објективне функције: 695,112
- Однос између предвиђених, популационих концентрација и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D приказани су на Графикону 5.

Графикон 5. Однос између предвиђених популационих вредности концентрација (PRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



4.2.2.2 Резултати изградње пуног ПФК модела

Након добијања базног модела и процене средњих, популационих вредности фармакокинетичких парематара 25-хидрокси витамина D, као и вредности минимума објективне функције, испитиван је утицај појединачних фактора на популациону вредност клиренса. Укупно је испитиван 51 фактор који су приказани у Табели 10.

Сваки од ових фактора: старост, телесна маса, индекс телесне масе, дневна доза (из хране), серумски калцијум, фосфати, натријум, калијум, хлориди, магнезијум, холестерол, ХДЛ, ЛДЛ, триглицериди, укупни серумски протеини, укупни серумски албумини, серумски глобулини, ниво глукозе, уреа, клиренс креатинина, ниво билирубина, АСТ, АЛТ, ТСХ, Т4, Т3, ТПОАт, ПТХ, ЛДХ, ЦК, Ц-реактивни протеин, ниво хемоглобина, хематокрит, РБЦ, МЦВ, МЦХ, МЦХЦ, РДВ, излагање сунчевој

светлости, излагање сунцу, БМД укупни, Т-скор (SD), унос кафе, алкохол, пушачи, непушачи, тип коже, бифосфонати, калцијум, статини, бензодиазепини су додавани у базни модел на претходно описан начин при чему је бележена разлика односно смањење у МОФ вредностима као и графички приказ између процењених, популационих вредности концентрација 25-хидрокси витамина D и његових измерених серумских концентрација. Статистичка значајност сваког фактора, поштујући претходно наведене критеријуме, приказана је у Табели 10. Овај процес је резултовао формирањем пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D кога су чиниле следеће коваријанте: просечна дневна доза витамина D унета путем хране и суплементације, просечно дневно излагање сунцу као и излагање сунчевој светлости више или мање од два часа дневно, ТПО антитела, конзумирање кафе више од три шољице дневно и комедикација са бензодиазепинима. Вредности минума објективне функције у пуном моделу износила је 497,718 јединица.

Табела 10. Изградња пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D код субпопулације жена у постменопаузи

Модел клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	Р вредност
БАЗНИ МОДЕЛ CL= θ_1 *EXP(ETA(1))	695,112		
ИНДИВИДУАЛНИ ИСПИТИВАНИ РЕГРЕСИОНИ МОДЕЛИ			
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_3 * ТМ	695,101	0,011	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_4 * ИТМ	695,007	0,105	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_5 * ГОД	695,068	0,044	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_6 * ДД	503,377	191,735	<0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_7 * Са	695,058	0,054	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_8 * Фос	695,067	0,045	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_9 * На	695,112	0	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_{10} * К	695,112	0	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_{11} * Хлор	695,112	0	>0,05
CL= θ_1 *EXP(ETA(1)) + θ_{12} * Мг	695,068	0,044	>0,05

Модели клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	Р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{13} * \text{Холе}$	694,344	0,768	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{14} * \text{ХДЛ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{15} * \text{ЛДЛ}$	694,105	1,007	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{16} * \text{Триг}$	694,745	0,367	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{17} * \text{Прот}$	695,068	0,044	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{18} * \text{Алб}$	695,060	0,052	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{19} * \text{Глоб}$	695,062	0,05	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{20} * \text{Глук}$	695,069	0,043	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{21} * \text{Уреа}$	695,052	0,06	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{22} * \text{Слсг}$	695,069	0,043	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{23} * \text{Бил}$	695,087	0,025	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{24} * \text{АСТ}$	695,069	0,043	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{25} * \text{АЛТ}$	695,069	0,043	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{26} * \text{ТСХ}$	695,063	0,049	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{27} * \text{T4}$	695,068	0,044	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{28} * \text{T3}$	695,098	0,014	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{29} * \text{ТПОАт}$	675,645	19,467	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{30} * \text{ПТХ}$	694,175	0,937	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{31} * \text{ЛДХ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{32} * \text{ЦК}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{33} * \text{ЦРП}$	694,004	1,108	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{34} * \text{Хем}$	694,100	1,012	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{35} * \text{Хцт}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{36} * \text{РБЦ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{37} * \text{МЦВ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{38} * \text{МЦХ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{39} * \text{МЦХЦ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{40} * \text{РДВ}$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{41} * \text{СУН}_1$	684,529	10,583	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{42} * \text{СУН}_2$	642,866	52,246	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{43} * \text{БМДy}$	693,668	1,444	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{44} * \text{T}$	695,008	0,104	>0,05

Модел клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	Р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{45} * Коф$	689,664	5,448	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{46} * Алк$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{47} * ПУШ$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{48} * НП$	695,068	0,044	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{49} * ТК$	695,112	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{50} * БИФ$	695,081	0,031	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{51} * Цал$	695,068	0,044	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{52} * СТАТ$	695,067	0,045	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{53} * БЕНЗ$	689,791	5,321	<0,05

CL: клиренс (l/h); ETA (1): интериндивидуална варијабилност CL; θ_3 до θ_{53} параметри коваријантних ефеката; ТМ: телесна маса; ИТМ: индекс телесне масе; ГОД: године живота; ДД: просечна дневна доза унета путем хране и суплементације; Са: серумски калцијум; Фос: серумски фосфати; На: серумски натријум; К: серумски калијум; Хлор: серумски хлориди; Мг: серумски магнезијум; Холе: холестерол; ХДЛ: хдл холестерол; ЛДЛ: лдл холестерол; Триг: триглицериди; Прот: укупни серумски протеини; Алб: укупни серумски албумини; Глоб: серумски глобулини; Глук: ниво глукозе; Уреа: уреа; Слс: клиренс креатинина; Бил: ниво билирубина; АСТ: аспартат аминотрансфераза; АЛТ: аланин аминотрансфераза; ТСХ: тиреостимулирајући хормон; Т4: тироксин; Т3: тиронин; ТПОАт: анти tiroидна антитела; ПТН: паратироидни хормон; ЛДХ: лактат дехидрогеназа; ЦК: креатин киназа; ЦРП: ц-реактивни протеин; Хем: ниво хемоглобина; Хцт: хематокрит; РБЦ: еритроцити; МЦВ: просечан волумен еритроцита; МЦХЦ: средња вредност концентрације хемоглобина у свим еритроцитима; РДВ: коефицијент варијације дистрибуције волумена еритроцита; СУН1 : излагање сунчевој светлости; СУН2 : СУН 2: просечно дневно излагање сунчевој светлости више/мање од 2 часа; Т: Т скор; Коф: конзумирање више/мање од 3 шољице дневно кафе (1 ило 0); Алк: унос алкохола; ПУШ: пушачи; НП: непушачи; ТК: тип коже; БИФ: бифосфонати; Цал: калцијум; СТАТ: статини (1 ако је присутна, 0 ако није присутна); БЕНЗ: присуство комедикације са бензодиазепинима (1 ако је присутна, 0 ако није присутна).

4.2.2.3 Изградња коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D

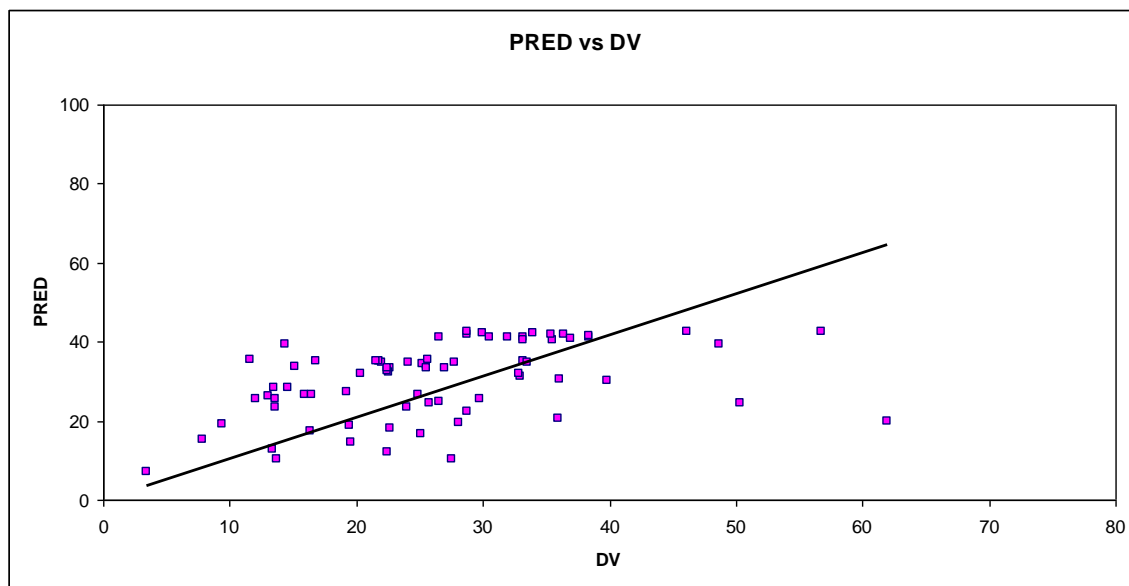
Додатна провера, применом методе уназдног избацивања сваког од шест фактора пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D уз поштовање потребних статистичких захтева добијен је коначан ПФК модел клиренса испитиваног витамина. Овај процес приказан је у Табели 11.

Током овог процеса није показан утицај просечног дневног излагање сунцу као и излагање сунчевој светлости више или мање од два часа дневно, ТПО антитела, конзумирање кафе и комедикација са бензодиазепинима. Фактор који је једини испољио значајан утицај на клиренс витамина D у коначном ПФК моделу је просечна дневна доза унета храном и суплементацијом. Једначина коначног модела у овој субпопулацији испитаница била је:

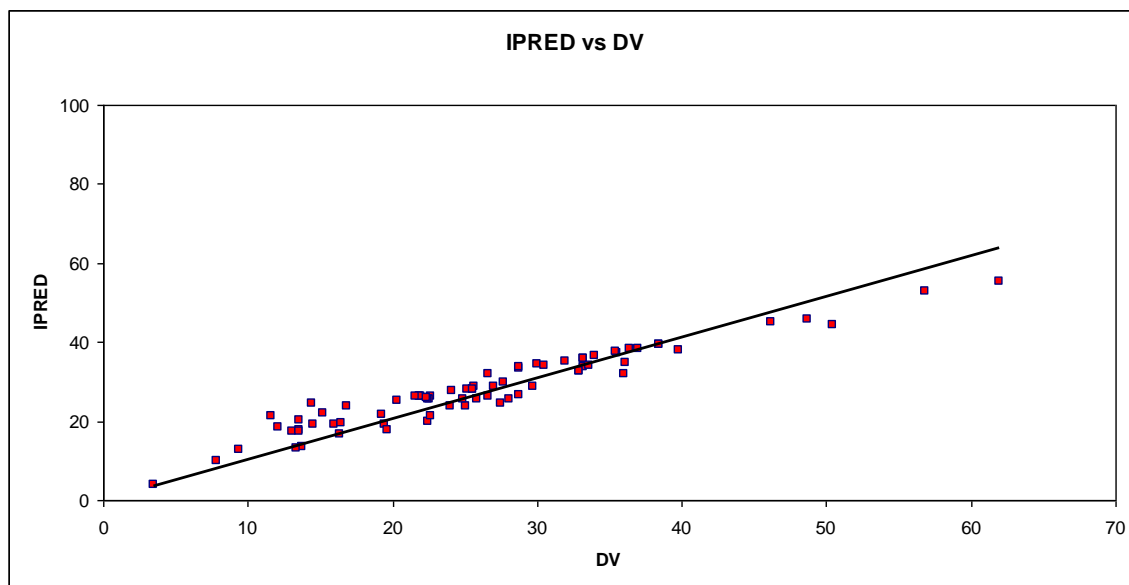
$$CL (L/h) = 0.0886 + 0.00097 \times ДД$$

Процењене средње, популационе вредности клиренса 25-хидрокси витамина D добијене у коначном моделу, просечна дневна доза овог витамина унета храном и суплементацијом, као и процењене вредности интериндивидуалне и резидуалне варијабилности приказане су у Табели 12. Изражена као коефицијент варијације интериндивидуална варијабилност у овом моделу износила је 24,01%, док је за резидуалну варијабилност добијена вредност од 15,26% у овој испитиваној субпопулацији жена. Графички приказ односа између процењених популационих или индивидуалних вредности концентрација у коначном ПФК моделу наспрам измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D приказане су на Графиконима 6 и 7.

Графикон 6. Однос између предвиђених популационих вредности концентрација (PRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



Графикон 7. Однос између индивидуалних, предвиђених вредности концентрација (IPRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



Табела 11. Процес примењене уназадне делеције у формирању коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D код жена у постменопаузи

Једначина пуног ПФК модела:	МОФ вредности	Разлика у МОФ вредности	Р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_3 * ДД + \theta_4 * СУН1 + \theta_5 * СУН2 + \theta_6 * ТПОат + \theta_7 * кафа + \theta_8 * БЕНЗ$	497,718		
Избацивање ДД	665,997	-168,279	<0,01
Избацивање СУН1	498,897	-1,179	>0,01
Избацивање СУН2	497,714	0,004	>0,01
Избацивање ТПО ат	503,883	-6,165	>0,01
Избацивање кафа	497,718	0	>0,01
Избацивање БЕНЗ	497,718	0	>0,01

ДД: просечна дневна доза унета путем хране и суплементације; СУН 1: просечно дневно излагање сунчевој светлости (h); СУН 2: просечно дневно излагање сунчевој светлости више/мање од 2 часа, ТПОат: антитироидна антитела; кафа: конзумирање више/мање од 3 шољице дневно кафе (1 ило 0); БЕНЗО: присуство комедикације са бензодиазепинима (1 ако је присутна, 0 ако није присутна).

4.2.2.4 Валидација коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D

За валидацију коначног модела ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D у овој субпопулацији жена у постменопаузи примењена је интерна валидација употребом "bootstrap" анализе. Коришћењем НОНМЕМ софтвера било је укључено 200 насумично изабраних података из основног сета. Средње, добијене вредности ФК параметара и обе варијабилности (интериндивидуална и резидуална), просечне дневне дозе витамина D унете путем хране и суплементације, као фактора коначног модела и њихови 95% интервали поверења добијени овом анализом и приказани су у Табели 12 у циљу поређења са процењеним вредностима добијених током изградње коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D. Сличне вредности сугеришу на добру стабилност и предвидљивост коначног ПФК модела.

Табела 12. Процене ФК параметара и фактора коначног ПФК модела клиренса 25 хидрокси витамина D добијених НОНМЕМ и "bootstrap" анализом

Параметар	НОНМЕМ анализа		Bootstrap анализа	
	Процењена вредност	95% CI*	Процењена вредност	95% CI [†]
CL/F (L/h)	0,0886	0,071 – 0,106	0,0888	0,0807 – 0,096
Дневна доза храном и суплементацијом	0,00097	0,00075 – 0,00119	0,00098	0,00081 – 0,00115
Интериндивидуална варијанса of CL- ω^2_{CL}	0,0237	0,0171 – 0,0303	0,0235	0,019 – 0,028
Резидуална варијанса - σ^2	0,0838	0,0618 – 0,1058	0,0841	0,0595 – 0,1087

* (процењена вредност) \pm 1.96 x (стандардна грешка)

[†] 2,5. и 97,5. перцентили процењених параметара "bootstrap" анализом

4.2.3 Популациона фармакокинетичка анализа код старијих жена

4.2.3.1 Базни ПФК модел 25-хидрокси витамина D

Употребом НОНМЕМ софтвера и АДВАН 1 субрутинe, као и прикупљених података у овој испитиваној субпопулацији испитаница (n=75) развијен је базни ПФК модел клиренса 25-хидрокси витамина D. Демографски, биохемијски, хормонски, медикаментозни и клинички подаци старијих жена (≥ 65 година) приказани су у Табели 13. Интериндивидуална варијабилност је описана експоненцијалним моделом грешке, док је за резидуалну варијабилност примењен адитивни модел грешке.

Табела 13. Демографски, биохемијски, хормонски, медикаментозни и клинички подаци старији жена (65 година живота и више)

Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност \pm SD)	Распон	Јединице
Број пацијената	75		
Број узорака	75		
Старост	67,41 \pm 2,30	65 – 78	године
Телесна маса	70,67 \pm 12,41	39 – 110	kg
Индекс телесне масе	27,74 \pm 4,75	17,36 – 42,97	kg/m ²
Дневна доза (из хране и	39,03 \pm 20,86	4,64 – 93,46	μ g/дан
Серумска концентрација 25 ОН D	25,37 \pm 12,04	3,44 – 68,72	ng/mL
Серумски калцијум	2,41 \pm 0,13	2,09 – 2,73	mmol/L
Серумски фосфати	1,08 \pm 0,19	0,58 – 1,91	mmol/L
Серумски натријум	140,76 \pm 1,63	135-144	mmol/L
Серумски калијум	4,52 \pm 0,38	3,7 – 5,3	mmol/L
Серумски хлориди	103,48 \pm 2,16	97 – 109	mmol/L
Серумски магнезијум	0,88 \pm 0,15	0,63 – 1,91	mmol/L
Холестерол	6,14 \pm 1,19	3,09 – 8,85	mmol/L
ХДЛ	1,47 \pm 0,34	0,84 – 2,30	mmol/L
ЛДЛ	3,91 \pm 1,12	1,47 – 6,39	mmol/L
Триглицериди	1,47 \pm 0,55	0,56 – 3,12	mmol/L
Укупни серумски протеини	70,65 \pm 4,83	61 – 83	g/L
Укупни серумски албумини	43,21 \pm 3,11	36 – 50	g/L
Серумски глобулини	27,37 \pm 4,07	21 – 40	g/L

Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност \pm SD)	Распон	Јединице
Ниво глукозе	5,65 \pm 1,51	3,9 – 13,0	mmol/L
Уреа	5,51 \pm 1,42	2,8 – 9,5	mmol/L
Клиренс креатинина	72,35 \pm 11,29	56 – 109	ml/min
Ниво билирубина	9,52 \pm 2,88	4,2 – 19,8	umol/L
АСТ	25,45 \pm 4,93	14 – 36	IU/L
АЛТ	19,64 \pm 5,97	7 – 36	IU/L
ТСХ	1,96 \pm 1,36	0,1 – 7,1	mIU/L
T4	11,17 \pm 3,02	4,4 – 20,6	pg/mL
T3	3,06 \pm 0,63	1,3 – 4,5	pg/mL
ТПОАт	603,08 \pm 1634,78	1 – 8140	IU/ml
ПТХ	46,35 \pm 21,93	9,8 – 143	pg/mL
ЛДХ	376,09 \pm 63,44	188– 618	U/L
ЦК	104,55 \pm 56,26	36 – 280	U/L
Ц-реактивни протеин	2,89 \pm 4,46	0,2 – 32,9	U/L
Ниво хемоглобина	135,38 \pm 10,97	109– 152,5	g/L
Хематокрит	0,41 \pm 0,03	0,33 – 0,47	L/L
РБЦ	4,46 \pm 0,39	2,81 – 5,23	10 ¹² /L
МЦВ	92,17 \pm 4,51	81,2 – 119,1	fL
МЦХ	30,46 \pm 1,61	26,32 – 39,79	pg
МЦХЦ	330,64 \pm 4,78	317,6 – 344,0	g/L
РДВ	13,75 \pm 0,89	12,34 – 17,86	%
Излагање сунчевој светлости	2,99 \pm 1,40	0,58 – 6,96	h
Излагање сунцу (<2h/ >2h)	44/31		h
БМД	0,77 \pm 0,12	0,49 – 1,07	
Т скор (СД):			
- нормални	- 13/75		
- остеопенија	- 34/75		
- остеопороза	- 28/75		
Унос кафе (>3 шољице/ ≤3шољице)	10/65		
Алкохол (>3 чашице/ ≤3 чашице)	22/53		

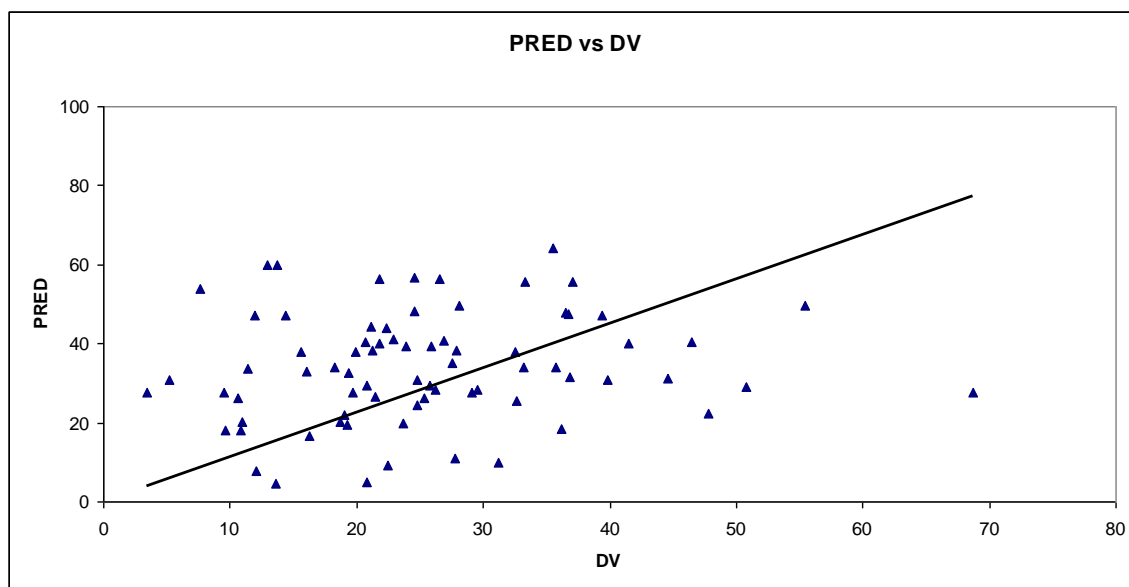
Карактеристике пацијената	Основни сет (средња вредност ± SD)	Распон	Јединице
Пушачи (да/не)	26/49		
Наследна предиспозиција (да/не)	5/70		
Тип коже (2/3)	7 /68		
Комедикација са:			
- бифосфонатима	- 57/18		
- калцијумом	- 45/30		
- бета блокатори	- 18/57		
- бензодиазепинима	- 23/52		

Процењене, средње популационе вредности фармакокинетичких параметара 25-хидрокси витамина D, као и испитиване варијабилности (изражене као коефицијент варијације у %) и вредности МОФ-а у базном моделу износиле су:

- Клиренс 25-хидрокси витамина D: 0,082L/h
- Волумен дистрибуције: 0,124 L
- Интериндивидуална варијабилност: 35,23%
- Интраиндивидуална варијабилност: 37,41%
- Минимум објективне функције: 599,423

Однос између предвиђених, популационих концентрација и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D приказани су на Графикону 8.

Графикон 8. Однос између предвиђених популационих вредности концентрација (PRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



4.2.3.2 Резултати изградње пуног ПФК модела

Након добијања базног модела и процене средњих, популационих вредности фармакокинетичких парематара 25-хидрокси витамина D, као и вредности минимума објективне функције, испитиван је утицај појединачних коваријанти на популациону вредност клиренса. Укупно је испитивано 51 фактор који су приказани у Табели 14. Сваки од ових фактора старост, телесна маса, индекс телесне масе, дневна доза (из хране), серумски калцијум, фосфати, натријум, калијум, хлориди, магнезијум, холестерол, ХДЛ, ЛДЛ, триглицериди, укупни серумски протеини, укупни серумски албумини, серумски глобулини, ниво глукозе, уреа, клиренс креатинина, ниво билирубина, АСТ, АЛТ, ТСХ, Т4, Т3, ТПОАт, ПТХ, ЛДХ, ЦК, Ц-реактивни протеин, ниво хемоглобина, хематокрит, РБЦ, МЦВ, МЦХ, МЦХЦ, РДВ, излагање сунчевој светлости, излагање сунцу, БМД укупни, Т-скор (SD), унос кафе, алкохол, пушачи, непушачи, тип коже, бифосфонати, калцијум, бета блокатори, статини, бензодиазепини су додавани у базни модел при чему је забележена разлика односно смањење у МОФ вредностима, као и графички приказ између процењених, популационих вредности

концентрација 25-хидрокси витамина D и његових измерених серумских концентрација.

Статистичка значајност сваке испитиване коваријанте, поштујући претходно наведене критеријуме, приказана је Табели 14. Резултат овог испитивања јесте формирање пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D кога су чиниле следеће коваријанте (укупно 4): просечна дневна доза витамина D унета путем хране и суплементације, паратиреоидни хормон, вредности T скора и комедикација са бензодиазепинима. Вредност минимума објективне функције у пуном моделу била је 515,471.

Табела 14. Изградња пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D код субпопулације старијих жена

Модел клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	p вредност
БАЗНИ МОДЕЛ $CL = \theta_1 * EXP(ETA(1))$	599,423		
ИНДИВИДУАЛНИ ИСПИТИВАНИ РЕГРЕСИОНИ МОДЕЛИ			
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_3 * TM$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_4 * ITM$	598,007	1,416	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_5 * ГОД$	599,203	0,22	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_6 * ДД$	526,011	73,412	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_7 * Ca$	599,211	0,212	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_8 * Фос$	598,078	1,345	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_9 * На$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{10} * К$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{11} * Хлор$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{12} * Мг$	599,400	0,023	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{13} * Холе$	599,411	0,012	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{14} * ХДЛ$	599,420	0,003	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{15} * ЛДЛ$	599,388	0,035	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{16} * Триг$	599,300	0,123	>0,05

Модели клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{17} * \text{Прот}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{18} * \text{Алб}$	599,410	0,013	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{19} * \text{Глоб}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{20} * \text{Глук}$	599,419	0,004	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{21} * \text{Уреа}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{22} * \text{Слср}$	599,024	0,399	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{23} * \text{Бил}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{24} * \text{АСТ}$	599,420	0,003	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{25} * \text{АЛТ}$	599,132	0,291	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{26} * \text{ТСХ}$	598,741	0,682	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{27} * \text{T4}$	589,429	9,994	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{28} * \text{T3}$	599,028	0,395	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{29} * \text{ТПОАт}$	598,534	0,889	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{30} * \text{ПТХ}$	589,344	10,079	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{31} * \text{ЛДХ}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{32} * \text{ЦК}$	599,125	0,298	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{33} * \text{ЦРП}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{34} * \text{Хем}$	599,197	0,226	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{35} * \text{Хцт}$	599,420	0,003	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{36} * \text{РБЦ}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{37} * \text{МЦВ}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{38} * \text{МЦХ}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{39} * \text{МЦХЦ}$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{40} * \text{РДВ}$	599,420	0,003	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{41} * \text{СУН}_1$	599,005	0,418	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{42} * \text{СУН}_2$	599,322	0,101	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{43} * \text{БМДy}$	589,100	10,323	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{44} * \text{T}$	583,652	15,771	<0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{45} * \text{Каф}$	599,420	0,003	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{46} * \text{Алк}$	599,422	0,001	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{47} * \text{ПУШ}$	599,422	0,001	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{48} * \text{НП}$	599,410	0,013	>0,05

Модел клиренса	Минимум објективне функције	Разлика у МОФ-у	р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{49} * ТК$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{50} * БИФ$	599,419	0,004	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{51} * Цал$	599,416	0,007	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{52} * ББ$	599,423	0	>0,05
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_{53} * БЕНЗ$	593,188	6,235	<0,05

CL: клиренс (l/h); ETA (1): интериндивидуална варијабилност CL; θ_3 до θ_{53} параметри коваријантних ефеката; ТМ: телесна маса; ИТМ: индекс телесне масе; ГОД: године живота; ДД: просечна дневна доза унета путем хране и суплементације; Са: серумски калцијум; Фос: серумски фосфати; На: серумски натријум; К: серумски калијум; Хлор: серумски хлориди; Мг: серумски магнезијум; Холе: холестерол; ХДЛ: хдл холестерол; ЛДЛ: лдл холестерол; Триг: триглицериди; Прот: укупни серумски протеини; Алб: укупни серумски албумини; Глоб: серумски глобулини; Глук: ниво глукозе; Уреа: уреа; Clcr: клиренс креатинина; Бил: ниво билирубина; АСТ: аспартат аминотрансфераза; АЛТ: аланин аминотрансфераза; ТСХ: тиреостимулирајући хормон; Т4: тироксин; Т3: тиронин; ТПОАт: анти tiroидна антитела; ПТН: паратироидни хормон; ЛДХ: лактат дехидрогеназа; ЦК: креатин киназа; ЦРП: ц-реактивни протеин; Хем: ниво хемоглобина; Хцт: хематокрит; РБЦ: еритроцити; МЦВ: просечан волумен еритроцита; МЦХЦ: средња вредност концентрације хемоглобина у свим еритроцитима; РДВ: коефицијент варијације дистрибуције волумена еритроцита; СУН₁: излагање сунчевој светлости; СУН₂: просечно дневно излагање сунчевој светлости више/мање од 2 часа; Т: Т скор; Коф: конзумирање више/мање од 3 шољице дневно кафе (1 ило 0); Алк: унос алкохола; ПУШ: пушачи; НП: непушачи; ТК: тип коже; БИФ: бифосфонати; Цал: калцијум; ББ: бета блокатори (1 ако је присутна, 0 ако није присутна); СТАТ: статини (1 ако је присутна, 0 ако није присутна); БЕНЗ: присуство комедикације са бензодиазепинима (1 ако је присутна, 0 ако није присутна).

4.2.3.3 Изградња коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D

Применом методе уназадног избацивања поново су испитани фактори пуног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D уз поштовање потребних статистичких захтева и онда формиран коначан ПФК модел клиренса главног циркулишег метаболита витамина D. Овај процес приказан је у Табели 15. Током овог испитивања није показан утицај укупног Т скорa испитаница, као ни утицај комедикације са бензодиазепинима. Укупно два од четири фактора пуног ПФК модела, просечна дневна доза унета исхраном и суплементацијом и паратиреоидни хормон су имали значајан утицај на варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина D у овој субпопулацији жена.

Једначина коначног ПФК модела клиренса овог витамина код старијих жена је била:

$$CL (L/h) = 0.0597 + 0.000104 \times ДД + 0.0000992 \times ПТХ$$

Процењене средње, популационе вредности клиренса 25-хидрокси витамина D добијене у коначном ПФК моделу код ове испитиване субпопулације жена, просечна дневна доза витамина D унета храном и суплементацијом, као и паратиреоидног хормона уз обе процењене варијабилности приказане су у Табели 16. Изражене као коефицијент варијације, интериндивидуална варијабилност у овом моделу износила је 22,57%, док је за резидуалну варијабилност добијена вредност од 25,85% у овој субпопулацији жена.

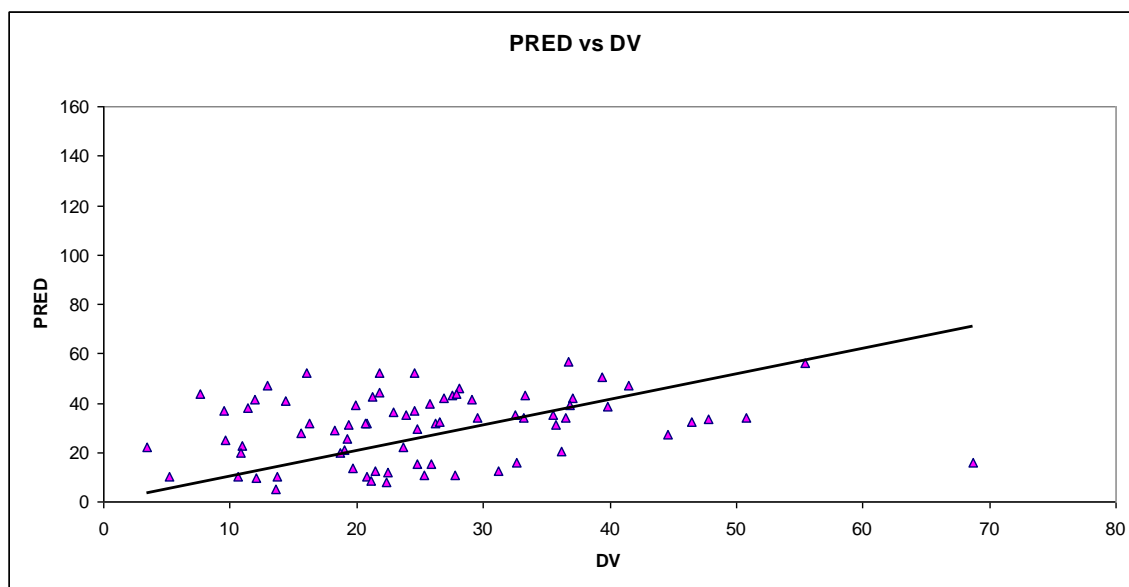
Графички приказ односа између процењених популационих или индивидуалних вредности концентрација у коначном ПФК моделу наспрам измереним серумским концентрацијама 25-хидрокси витамина D приказане су на Графиконима 9 и 10.

Табела 15. Процес примењене уназадне делације у формирању коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D код старијих жена

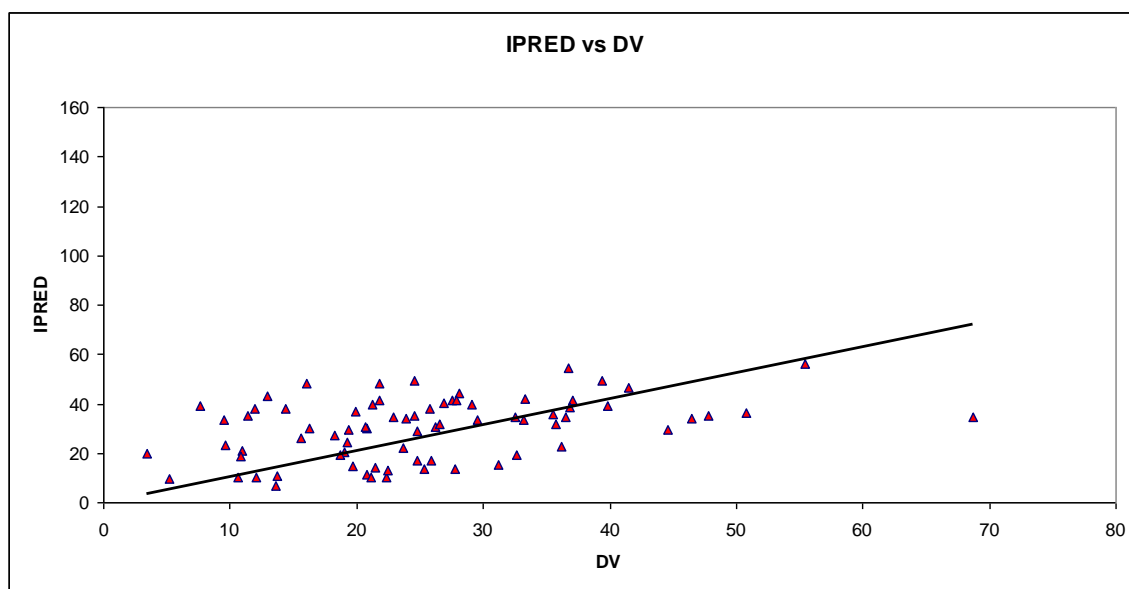
Једначина пуног ПФК модела:	МОФ вредности	Разлика у МОФ вредности	Р вредност
$CL = \theta_1 * EXP(ETA(1)) + \theta_3 * ДД + \theta_4 * ПТХ + \theta_5 * T + \theta_6 * БЕНЗ$	515,471		
Избацивање ДД	640,056	-124,585	<0,01
Избацивање ПТХ	604,396	-88,925	<0,01
Избацивање T скорa	520,484	-5,013	>0,01
Избацивање БЕНЗ	523,411	-7,94	>0,01

ДД: просечна дневна доза унета путем хране и суплементације; ПТХ: паратиреоидни хормон; T скор: има вредност 0 за нормалну вредност (више од 0), 1 за присуство остеопеније и 2 за присуство остеопорозе; БЕНЗ: присуство комедикације са бензодиазепинима (1 ако је присутна, 0 ако није присутна).

Графикон 9. Однос између предвиђених популационих вредности концентрација (PRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



Графикон 10. Однос између индивидуалних, предвиђених вредности концентрација (IPRED) и измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D (DV)



4.2.3.4 Валидација коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D

За валидацију коначног модела ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D у овој субпопулацији жена, исто као и у претходним субпопулацијама употребљена је интерна валидација, "bootstrap" анализа. Коришћењем НОНМЕМ софтвера било је укључено 200 насумично изабраних података из основног сета. Средње, добијене вредности ФК параметара и обе варијабилности (интериндивидуална и резидуална), просечне дневне дозе витамина D унете путем хране и суплементације и паратиреоидног хормона, њихови 95% интервали поверења добијени овом анализом и приказани су у Табели 16 у циљу поређења са процењеним вредностима добијених током изградње коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D.

Табела 16. Процене ФК параметара и фактора коначног ПФК модела клиренса 25-хидрокси витамина D добијених НОНМЕМ и "bootstrap" анализом

Параметар	НОНМЕМ анализа		Bootstrap анализа	
	Процењена вредност	95% CI*	Процење на вредност	95% CI [‡]
CL/F (L/h)	0,0597	0,0486 – 0,0708	0,0602	0,0484 – 0,072
Дневна доза храном и суплементацијом	0,000104	0,000074 – 0,000134	0,000122	0,000069 – 0,000175
Паратиреоидни хормон	0,0000992	0,000060 – 0,000138	0,00012	0,000065 – 0,00017
Интериндивидуална варијанса of CL- ω^2_{CL}	0,0497	0,034 – 0,0654	0,0495	0,038 – 0,0652
Резидуална варијанса - σ^2	0,0647	0,0466 – 0,0828	0,065	0,0471 – 0,0833

* (процењена вредност) \pm 1.96 x (стандардна грешка)

[‡] 2,5. и 97,5. перцентили процењених параметара "bootstrap" анализом

4.3 Процена статуса витамина D

Мерење серумских концентрација 25-хидрокси витамина D на основу којих је процењен статус овог витамина у испитиваним популацијама вршено је имунохемијском и HPLC анализом.

4.3.1 Процена статуса витамина D код жена у циклусу

Просечна серумска концентрација у овој субпопулација жена износила је $26,51 \pm 13,49$ ng/mL измерених имунохемијском методом, и $25,96 \pm 10,13$ ng/mL HPLC методом. Суфицијенција испитиваног витамина забележена је код 27 жена (36,49%), инсуфицијенција код 18 жена (24,32%), док је дефицијенција витамина D забележена код 29 жена (39,19%) на основу серумских концентрација добијених имунесејом. Анализом серумских концентрација 25-хидрокси витамина D добијених HPLC методом суфицијентни ниво витамина D је био забележен код 25 жена (33,78%), док је инсуфицијенција била присутна код 28 жена (37,84%), а дефицијенција код 21 жене (28,38%). Средње вредности серумских концентрација 25-хидрокси витамина D за сваки од процењеног статуса у испитиваној популацији приказане су у Табели 17.

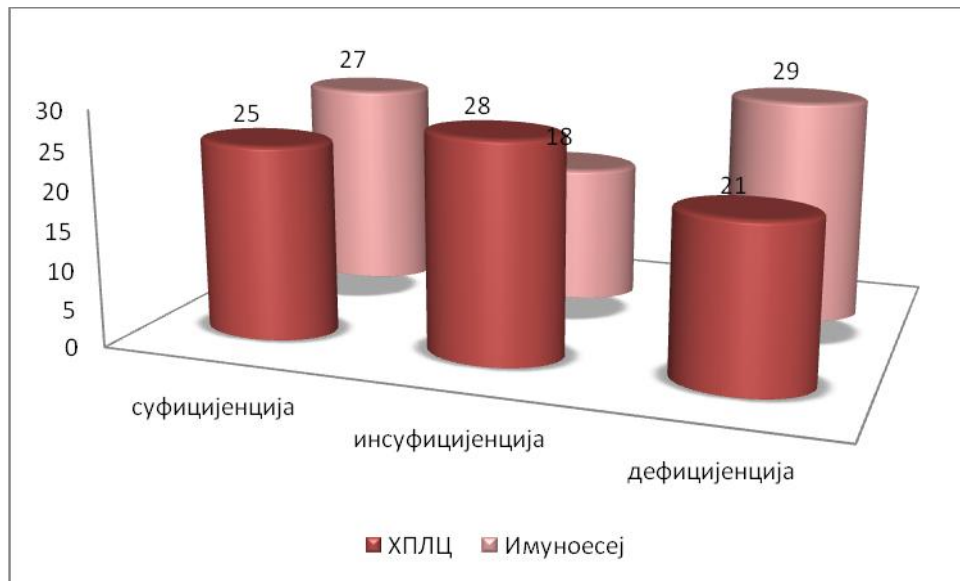
Табела 17. Вредности серумских концентрација 25-хидрокси витамина D

Статус витамина D	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D средња вредност \pm SD *	
	Имунохемијска метода	HPLC метода
Суфицијенција	$41,18 \pm 9,37$ ng/mL	$37,40 \pm 5,89$ ng/mL
Инсуфицијенција	$24,87 \pm 2,53$ ng/mL	$24,51 \pm 2,87$ ng/mL
Дефицијенција	$13,85 \pm 3,67$ ng/mL	$14,29 \pm 3,52$ ng/mL

* стандардна девијација

Дистрибуција статуса витамина D на основу ове две аналитичке методе у испитиваној субпопулацији приказана је на Графикону 11.

Графикон 11. Дистрибуција статуса витамина D (број испитаница)



4.3.2 Процена статуса витамина D код жена у постменопаузи

Анализом измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D имунохемијском методом код 75 жена у постменопаузи добијена је просечна вредност од $26,19 \pm 10,95$ ng/mL, док је HPLC мерењем она износила $25,30 \pm 9,62$ ng/mL. Суфицијенција витамина D је била присутна код 24 испитанице (32%), инсуфицијенција код 30 жена (40%) и дефицијенција код 21 (28%) на основу измерених серумских концентрација 25-хидрокси витамина D имунохемијском методом. Измерене концентрације главног циркулишућег витамина D употребом методе високо-ефикасне течне хроматографије под високим притиском показале су присуство суфицијентног нивоа овог витамина код 25 жена (33,34%), инсуфицијенције код 28 (37,33%) и дефицијенције код 22 испитанице (29,33%). Средње вредности серумских концентрација 25-хидрокси витамина D за сваки од процењеног статуса у испитиваној популацији приказане су у Табели 18.

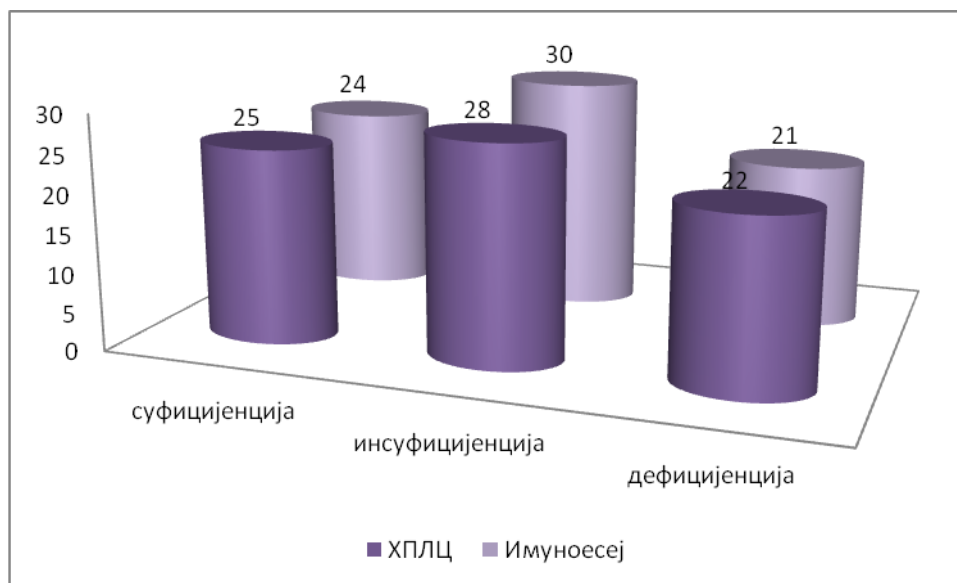
Табела 18. Вредности серумских концентрација 25-хидрокси витамина D

Статус витамина D	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D средња вредност \pm SD *	
	Имунохемијска метода	HPLC метода
Суфицијенција	38,44 \pm 8,33 ng/mL	35,90 \pm 6,21 ng/mL
Инсуфицијенција	24,94 \pm 2,61 ng/mL	24,43 \pm 2,56 ng/mL
Дефицијенција	14,02 \pm 3,72 ng/mL	14,37 \pm 3,70 ng/mL

* стандардна девијација

Дистрибуција статуса витамина D на основу две аналитичке методе у овој субпопулацији жена приказана је на Графикону 12.

Графикон 12. Дистрибуција статуса витамина D (број испитаница)



4.3.3 Процена статуса витамина D код старијих жена

Просечна серумска концентрација 25-хидрокси витамина D код жена старости 65. година и више износила је $25,37 \pm 12,04$ ng/mL на основу мерења извршеног имуноесејом, и $23,53 \pm 9,30$ ng/mL мерењем HPLC анализом.

Процена статуса испитиваног витамина у овој субпопулацији је била следећа: 21 жена је имало суфицијенцију (28%), 29 жена је имало инсуфицијенцију (38,67%) и 25 жена (33,33%) је било са дефицијенцијом витамина D на основу имуноесеј анализе.

Са друге стране, дистрибуција статуса овог витамина употребом HPLC мерења серумских концентрација 25-хидрокси витамина D је показала присуство суфицијенције код 17 жена (22,67%), инсуфицијенције код 33 (44%) и дефицијенције код 25 испитаница (33,33%). Средње вредности серумских концентрација 25-хидрокси витамина D за сваки од процењеног статуса у овој субпопулацији приказане су у Табели 19.

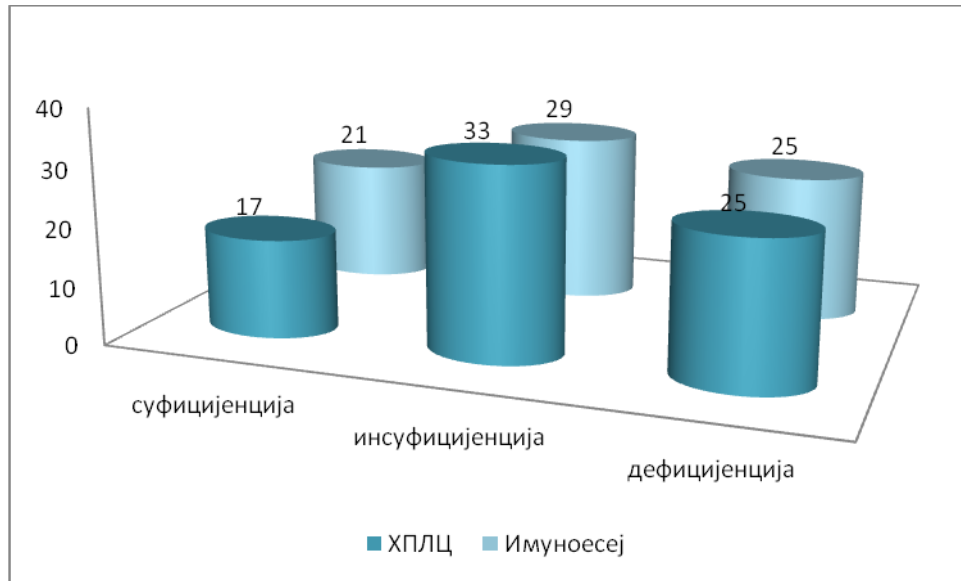
Табела 19. Вредности серумских концентрација 25-хидрокси витамина D

Статус витамина D	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D средња вредност \pm SD *	
	Имунохемијска метода	HPLC метода
Суфицијенција	$40,58 \pm 9,15$ ng/mL	$35,58 \pm 5,45$ ng/mL
Инсуфицијенција	$24,49 \pm 2,72$ ng/mL	$25,04 \pm 3,34$ ng/mL
Дефицијенција	$13,61 \pm 4,62$ ng/mL	$13,34 \pm 4,27$ ng/mL

* стандардна девијација

Дистрибуција статуса витамина D на основу примењене две аналитичке методе за мерење концентрације 25-хидрокси витамина D у овој субпопулацији жена приказана је на Графикону 13.

Графикон 13. Дистрибуција статуса витамина D (број испитаница)



4.4 Анализа квалитета живота

Процена квалитета живота у испитиваној популацији вршена је уз коришћење два упитника: WHOQOL BREF и QUALEFFO 41. Средње вредности и стандардне девијације припадајућих домена ових упитника, као и укупни процењени квалитет живота приказани су у Табелама 20 и 21.

Табела 20. Процена квалитета живота у испитиваној популацији коришћењем WHOQOL BREF упитника

Домени упитника	Жене у циклусу	Жене у постменопаузи	Старије жене	Укупна популација
Домен 1	70,31±15,70	65,03±17,09	65,59±17,63	66,98±16,81
Домен 2	64,73±14,03	62,91±17,92	64,89±16,89	64,18±16,28
Домен 3	64,15±18,24	64,59±18,63	65,44±16,74	64,73±17,94
Домен 4	67,35±12,44	64,64±16,69	64,65±16,36	65,55±15,13
Укупни	66,64±15,10	64,32±17,58	65,14±16,90	65,37±16,54

Анализом група, односно испитиваних субпопулација жена може се видети да најнижи скор за укупни квалитет живота коришћењем WHOQOL BREF упитника имају жене које се налазе у постменопаузи, док је највиши скор забележен код популације средњих година (35-45), односно код жена које имају редовни менструални циклус. Када се разматрају појединачни домени овог упитника, у целокупној испитиваној популацији жена најнижи скор за процењени квалитет живота односи се на домен 2 којим се процењује психолошко здравље испитаница, док је највиша вредност забележена за домен 1 којим се процењује квалитет живота повезан са физичким здрављем.

Табела 21. Процена квалитета живота у испитиваној популацији коришћењем QUALEFFO 41 упитника

Домен упитника	Жене у циклусу	Жене у постменопаузи	Старије жене	Укупна популација
Домен 1	6,76±12,51	50,93±25,41	49,07±23,29	35,59±20,41
Домен 2	15,58±11,90	63,27±31,78	53,00±24,65	33,95±22,78
Домен 3	39,40±18,67	58,15±22,11	55,91±20,02	51,15±20,27
Домен 4	11,76±8,62	35,00±13,25	33,27±11,10	26,68±10,99
Домен 5	53,65±21,46	65,80±20,27	64,60±19,08	61,35±20,27
Укупни	30,51±4,18	37,77±13,40	35,27±12,80	34,52±10,12

Анализа процене квалитета живота у испитиваним субпопулацијама указује да је добијени укупни скор употребом QUALEFFO 41 упитника највиши код жена које се налазе у постменопаузи, затим за старије жене док је најнижи скор за целокупни упитник забележен код жена у циклусу.

4.5 Анализа присуства депресије

Процена присуства депресивних симптома у испитиваној популацији вршена је употребом Бековог упитника (скеале) за мерење интензитета и симптома депресивности. Обзиром на описане граничне вредности овог упитника, присуство депресивних симптома означено је као: минимална депресивност или без присуства депресије, блага, умерена и тешка депресивност. Средње вредности овог упитника са стандардним девијацијама (СД) по испитиваним субпопулацијама и сходно описаној подели депресије приказане су у Табели 22. Пошто је гранична вредност за присуство депресије употребом овог упитника 13, може се видети да просечна вредност овог упитника у целокупној испитиваној популацији 14,25, односно да постоји присуство благе депресије код испитиваних жена (Табела 22). Детаљнија анализа је показала да половина испитаница нема депресивне симптоме, док је код једне четвртине забележено присуство благе депресије. Тешка депресија је била најмање заступљена у испитиваној популацији (12,5%). Такође, анализа по субпопулацијама показала је слично присуство благе депресије у све три испитиване популације жена.

Присуство тешке депресије забележено у највећем проценту код жена у постменопаузи (17,34%) и старије популације (16%). Умерена и блага депресија у највећем проценту је присутна код жена које имају редован менструални циклус.

Табела 22. Процена депресивних симптома у испитиваној популацији

Испитиване субпопулације	Просечан скор Бековог упитника (\pm SD)	Без депресије	Блага депресија	Умерена депресија	Тешка депресија
Жене у циклусу	14,36 \pm 9,22	n =24 (32,43%)	n =31 (41,90%)	n =16 (21,62%)	n =3 (4,5%)
Жене у постменопаузи	14,36 \pm 10,90	n =45 (60%)	n =10 (13,33%)	n =7 (9,33%)	n =13 (17,34%)
Старије жене	14,03 \pm 10,55	n =43 (57,33%)	n =12 (16%)	n =8 (10,67%)	n =12 (16%)
Укупна популација	14,25 \pm 10,22	n =112 (50%)	n =53 (23,66%)	n =31 (13,84%)	n =28 (12,5%)

4.6 Анализе процене страха од медицинских поступака

Процена страха од медицинских поступака у испитиваним субпопулацијама жена вршена је употребом претходно споменутог, валидираног упитника који садржи пет домена: страх од инјекција и вађења крви, од оштрих предмета, од испитивања и симптома као наговештаја болести, страх од крви и од осакаћења. За разлику од оригиналне верзије на енглеском језику где сваки домен садржи по 10 питања у валидираној верзији на српском језику домен који се односи на страх од крви садржи 11 питања, док први домен односно страх од инјекција и вађења крви садржи 9 питања. Средња вредност поменутих домена у укупној испитиваној популацији и субпопулацијама са стандардним девијацијама приказана је у Табели 23. Већи скор указује на присуство већег страха код испитаница.

Табела 23. Процена присуства страха од медицинских поступака у испитиваној популацији

Домени упитника	Жене у циклусу	Жене у постменопаузи	Старије жене	Укупна популација
Домен 1	3,49±3,51	9,88±6,56	9,91±6,54	7,76±5,54
Домен 2	5,59±5,49	11,60±7,86	11,35±7,97	9,51±7,12
Домен 3	7,13±4,41	13,39±7,07	13,04±8,07	11,19±6,52
Домен 4	3,64±4,44	11,33±8,69	10,61±8,10	8,53±7,08
Домен 5	14,28±9,40	23,01±11,70	22,49±10,80	19,93±10,63
Укупни скор упитника	33,92±19,25	68,93±35,85	66,59±34,76	66,48±29,95

Обзиром на максималну вредност примењеног упитника, из Табеле 23 може се видети да је у укупној популацији присуство страха од медицинских поступака изузетно ниско, са просечно забележеном вредношћу од 66,48. Највећа вредност појединачних домена односи се на домен 5 (19,93) којим се процењује присуство страха од осакаћења.

Са просечном вредношћу у укупној популацији, следећи присутан страх код испитиваних жена односи на испитивање и симптоме као наговештај болести. Преостала три домена имали су укупан збир у целокупној популацији испод 10.

Детаљнијом анализом испитиваних субпопулација запажено је најмање присуство страха код жена са редовним менструалним циклусом и распоном година 35-45, док је највеће присуство испитиваног страха присутно код жена које се налазе у постменопаузи и распону година 45-65. Анализом појединачних домена у све три субпопулације жена највише је присутан страх од осакаћења. Сличне вредности из домена 3 овог упитника забележене код жена у постменопаузи и старијих жена (13,39 vs 13,04), док је код жена средњих година забележена изузетно ниска вредност овог домена (7,13). Страх од инјекција и вађења крви је био најмањи код све три испитиване субпопулације, али такође и у укупној популацији испитаница.

4.7 Анализа корелације између серумских концентрација 25-хидрокси витамина D и минералне густине костију (Z или T скорa), годинама старости, квалитетом живота, присуства страха и депресивности у испитиваним субпопулацијама жена старијих од 35 година

Испитивање постојања корелације између измерених серумских концентрација измерених имунохемијском и HPLC методама и укупне минералне густине костију, вредностима Z и T скорa добијених DXA методом, годинама старости, процењеним квалитетом живота (мереног генеричким и специфичним упитником), присуством страха од медицинских поступака као и присуством депресивних симптома у испитиваној популацији спроведено је одговарајућим статистичким тестовима. Резултати овог испитивања приказани су у Табели 24, 25, 25 за субпопулације жена у циклусу, постменопаузи и старијих жена, респективно.

Табела 24. Испитивање корелације серумске концентрације витамина D измерене имунохемијском и HPLC методом са одређеним варијаблама код жена у циклусу

Параметар	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D одређена имунохемијском методом (статистичи тест/ значајност нулте хипотезе)	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D одређена HPLC методом (статистичи тест/ значајност нулте хипотезе)
БМД	r= -0,048* p= 0,683	r= -0,067* p= 0,569
Z скор	r= -0,112** p= 0,340	r= -0,080** p= 0,497
старост	r= -0,104* p= 0,379	r= -0,117* p= 0,322
Квалитет живота према упитнику Светске Здравствене Организације (WHOOL-BREF)	r= -0,254* p= 0,029	r= -0,173* p= 0,141
Квалитет живота према упитнику Европске Фондације за Остеопорозу (QUALEFFO-41)	r= 0,067 p= 0,573	r= 0,048* p= 0,685
Скор на упитнику за процену страха од медицинских поступака (MFS)	r= 0,035 p= 0,770	r= -0,004* p= 0,976
Скор на Бековом упитнику за самопроцену депресивности	r= -0,006** p= 0,960	r= -0,046** p= 0,695

* - Pearson-ов коефицијент корелације; ** - Spearman-ов коефицијент корелације

Табела 25. Испитивање корелације серумске концентрације витамина D измерене имунохемијском и HPLC методом са одређеним варијаблама код жена у постменопаузи

Параметар	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D одређена имунохемијском методом (статистички тест/ значајност нулте хипотезе)	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D одређена HPLC методом (статистички тест/ значајност нулте хипотезе)
БМД	$r = -0,279^*$ $p = 0,015$	$r = -0,222^*$ $p = 0,056$
Т скор	$r = -0,350^*$ $p = 0,002$	$r = -0,303^*$ $p = 0,008$
старост	$r = 0,079^{**}$ $p = 0,503$	$r = 0,073^{**}$ $p = 0,532$
Квалитет живота према упитнику Светске Здравствене Организације (WHOOL-BREF)	$r = -0,038^*$ $p = 0,747$	$r = 0,014^*$ $p = 0,908$
Квалитет живота према упитнику Европске Фондације за Остеопорозу (QUALEFFO-41)	$r = 0,315^*$ $p = 0,006$	$r = 0,250^*$ $p = 0,030$
Скор на упитнику за процену страха од медицинских поступака (MFS)	$r = 0,026^*$ $p = 0,824$	$r = 0,046^*$ $p = 0,695$
Скор на Бековом упитнику за самопроцену депресивности	$r = -0,045^{**}$ $p = 0,700$	$r = -0,076^{**}$ $p = 0,516$

* - Pearson-ов коефицијент корелације; ** - Spearman-ов коефицијент корелације

Табела 26. Испитивање корелације серумске концентрације витамина D измерене имунохемијском и HPLC методом са одређеним варијаблама код старијих жена

Параметар	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D одређена имунохемијском методом (статистичи тест/ значајност нулте хипотезе)	Серумска концентрација 25-хидрокси витамина D одређена HPLC методом (статистичи тест/ значајност нулте хипотезе)
БМД	$r = -0,087^{**}$ $p = 0,459$	$r = -0,110^*$ $p = 0,350$
Т скор	$r = -0,226^{**}$ $p = 0,052$	$r = -0,220^{**}$ $p = 0,058$
старост	$r = -0,020^{**}$ $p = 0,867$	$r = -0,001^{**}$ $p = 0,990$
Квалитет живота према упитнику Светске Здравствене Организације (WHOOL-BREF)	$r = -0,091^{**}$ $p = 0,438$	$r = -0,061^*$ $p = 0,604$
Квалитет живота према упитнику Европске Фондације за Остеопорозу (QUALEFFO-41)	$r = -0,011^{**}$ $p = 0,923$	$r = -0,027^*$ $p = 0,821$
Скор на упитнику за процену страха од медицинских поступака (MFS)	$r = -0,046^{**}$ $p = 0,695$	$r = -0,067^*$ $p = 0,568$
Скор на Бековом упитнику за самопроцену депресивности	$r = 0,085^{**}$ $p = 0,466$	$r = 0,061^{**}$ $p = 0,606$

* - Pearson-ов коефицијент корелације; ** - Spearman-ов коефицијент корелације

Сprovedна статистичка анализа указала је на постојање корелације између квалитета живота процењеног употребом WHOOL-BREF упитника и серумске концентрације 25-хидрокси витамина D код жена у циклусу ($p=0,029$) измерених имуноесејом, док није забележена за остале испитиване параметре код жена у репродуктивном периоду. Код субпопулације жена које су у постменопаузи показано је постојање корелације између серумске концентрације 25-хидрокси витамина D, мереног и имуноесејом и HPLC анализом, са T скором добијеног употребом DXA методе ($p=0,002$; $p=0,008$), као и њиховим квалитетом живота процењеног QUALEFFO-41 упитником ($p=0,006$; $p=0,030$). Такође, показано је постојање корелације између минералне густине костију и серумске концентрације 25-хидрокси витамина D мерене имуноесејом ($p=0,015$) у овој субпопулацији испитаница, док за остале испитиване параметре није показано. Код жена старијих од 65.-те године живота није показано постојање корелације између измерених серумских концентрација калцидиола употребом обе аналитичке методе са њиховим годинама старости, минералном густином костију и T скором добијених остеодензитометријским мерењем, односно DXA методом, као ни са процењеним квалитетом живота, присуством страха и степеном депресије.

5 ДИСКУСИЈА

Витамин D је током последњих неколико деценија испитиван како у експерименталним тако и у дескриптивним, епидемиолошким истраживањима при чему су потврђени плејотропни ефекти овог витамина у хуманом организму (Spiro et al. 2014). Првобитна испитивања јасно су указивала на значај витамина D у постизању и одржавање хомеостазе два елемента, калцијума и фосфора, и последичном одржавању и унапређењу функционисања мишићно-скелетног система. Након поменутих истраживања је уследио период постизања револуционарних открића о повезаности серумске концентрације 25(OH)D са великим бројем хроничних обољења различитих органских система попут кардиоваскуларних, респираторних, метаболичких, канцерогених као и психичких болести. Ниво витамина D корелирао је како са превенцијом појединих обољења тако и са клиничким током болести што је значајно утицало на потребу подизања свести како стручне, тако и опште популације о важности евалуације статуса овог витамина како у вулнерабилној тако и у здравој популацији (Delle Monache et al. 2018; Milovanovic, 2017).

С'обзиром на утицај витамина D на мишићно-скелетни и ендокрини систем, његов статус је од посебног значаја за здравље жена током читавог животног циклуса. Хиповитаминоза D се у различитим популацијама може манифестовати на различите начине. У дечијој популацији као последица дефицита овог витамина може развити рахитис, док код одраслих може узроковати остеомаластију која ако се не дијагностикује и не третира на време у великом броју случајева прогредира до остеопеније и остеопорозе у току каснијег живота што је посебно карактеристично за женску популацију (Delle Monache et al. 2018; Khashayar et al. 2016). Истраживања која су вршена у популацији жена у репродуктивном периоду указују на постојање позитивне корелација између смањење серумске концентрације 25-хидрокси витамина D у серуму и синдрома полицистичних јајника, ендометриозе, смањење функције јајника као и ирегуларних или продужених менструалних крварења, метаболичког синдрома као и канцерогених промена на дојкама, јајницима и колону (Irani et al. 2014; Lerchbaum et al. 2014; Jukic et al. 2016; Jukic et al. 2015; Bohon et al. 2013).

Позитивне ефекте суфицијентног статуса витамина D код жена у репродуктивном периоду потврђују истраживања чији резултати верификују повезаност адекватног нивоа витамина D са регуларним месечним циклусима и побољшањем оваријалне фоликулогенезе (Rashidi et al. 2009; Thys-Jacobs et al. 1999; Jukic et al. 2018). Студија спроведена почетком ове године а која је према дизајну представљала систематски преглед литературе потврдила је још један користан ефекат постизања оптималне серумске концентрације 25-хидрокси витамина D код жена које су у репродуктивном периоду. Наведени резултати су показали корелацију између статуса витамина D и повећане могућности за остваривање мајчинства код жена које су биле изложене *in vitro* фертилизацији. Осим позитивних ефеката суфицијентног статуса витамина D показано је и да дефицијенција овог витамина може повећати ризик од слабљења плаценте, настанка гестацијског дијабетеса, прееклампсије и еклампсије током гестације или чак довести до нарушавања нормалног раста и развоја фетуса или спонтаног побачаја (Aghajafari et al. 2013, Zhao et al. 2012, Cashman and Kiely 2014). Трудноћа и продужетак периода лактације код жена последично може довести до смањења минералне густине костију што предиспонира појаву пременопаузалне остеопорозе и указује на потребу за скринингом ради правовремене детекције хиповитаминозе у популацији жена у репродуктивном добу (Langdahl 2017).

Након завршетка репродуктивног периода менструални циклус жене пролази кроз више фаза који најпре укључује период перименопаузе након чега настаје финална менопауза која за сваку жену представља јако осетљив и некада непријатан период услед присуства одређених карактеристичних симптома који настају као последица хормонског дисбаланса у овом периоду. Период менопаузе је начешће праћен променама попут значајне редукације или потпуног губитка нивоа естрогена, смањења минералне густине костију и слабости мишића које последично бивају праћене појавом остеопеније и/или остеопорозе које могу довести до падова и настанка прелома што значајно нарушава и умањује квалитет живота жена у овом периоду.

У току менопаузе жене су често изложене и повећаном ризику од кардиоваскуларних нежељених догађаја попут хипертензије, срчане инсуфицијенције или možданог удара као и ризику од метаболичких поремећаја, психичких поремећаја попут анксиозности и депресије (Lerchbaum, 2014; Santoro, 2016; Christakos et al. 2013; de Azevedo et al. 2009). Како хиповитаминоза D може значајно утицати на све наведене симптоме и клиничка стања која прате период менопаузе онда се њен значај у овој популацији посебно наглашава. То потврђују и резултати проспективне студије код жена у средњим годинама које су имале високе нивое 25-хидрокси витамина D имале су мању вероватноћу за настанак не-трауматских прелома у току временском посматрања од 9,5 година (Cauley et al. 2015).

На основу доступних литературних података се може закључити да статус витамина D може имати врло значајан утицај на здравствени статус и нежељене догађаје код жена како у репродуктивном периоду тако и у периоду менопаузе. Како хиповитаминоза D код жена у репродуктивном периоду може изазвати далекосежније последице по здравље жена у каснијем животном добу то је период када треба започети скрининг тестове за процену статуса витамина D и спречити последичне компликације које се могу јавити у средњем и каснијем животном добу.

Правовремено октивање дефицијенције/инсуфицијенције витамина D у популацији жена различите старосне доби подразумева започињање суплементације витамином D у дозама дефинисаним од стране европских и светских организације на основу старосне припадности. Недостатак тренутно доступних препорука је што не укључују утицај великог броја фактора на статус витамина D у хуманом организму а самим тим не подразумевају ни корекцију примењене дозе суплемента на основу индивидуалних карактеристика појединца што је у клиничкој пракси често праћено изостанком жељеног терапијског ефекта тј. непостизањем оптималне серумске концентрације витамина D (Milovanovic et al. 2015).

Фактори који показују значајан утицај на ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина D у хуманом организму су многобројни и обухватају географско подручје, старост, пол, тип коже, употребу козметичких препарата са заштитним факторима, нутритивне карактеристике појединца, период године као и временски период директне изложености сунчевој светлости у одређеном делу дана и друге (Milovanovic et al. 2015; Milovanovic, 2017). Од наведених фактора издвајају се два која су у досадашњим истраживањима показала најзначајнији утицај а то су излагање сунчевој светлости и егзогени унос витамина D.

На основу претраге доступних медицинских база података до сада није вршена популациона фармакокинетичка анализа 25-хидрокси витамина D у нашој или другој земљи у популацији жена различитог менструалног статуса што донекле може бити значајан податак за креирање будућих здравствених политика за суплементацију витамина D у популацији жена различитог менструалног статуса, али са друге стране представља лимитирајући фактор са аспекта не постојања могућности компарације добијених резултата са подацима из других земаља.

Циљ спроведеног истраживања је био да развије популациони фармакокинетички модел 25-хидрокси витамина D у популацији жена старијих од 35 година и да испита потенцијални утицај одређених фактора на средњу вредност клиренса и интра- и интериндивидуалну варијабилност 25-хидрокси витамина D у испитиваној популацији. Како је испитивана популација обухватала три субпопулације испитаника у нашем истраживању, дефинисани су фактори за сваку појединачну субпопулацију а то су жене које имају редовни менструални циклус, жене у менопаузи односно постменопаузи и старије жене (након 65. године живота).

Извршена ПФК анализа у субпопулацији жена у циклусу испитивала је утицај 47 фактора на средњу вредност клиренса при чему је значајан утицај показала само једна од 47 коваријанти и то је била просечна дневна доза витамина D унета путем хране. Добијена формула коначног модела клиренса у популацији испитаника јасно указује на постојање линеарне корелације између клиренса 25-хидрокси витамина D и просечне дневне дозе витамина D унете путем исхране.

Постојање ове позитивне корелације је донекле и очекивани ефекат ако се узме у обзир да је дневни унос витамина D путем хране један од два основна елемента за постизање оптималног нивоа серумске концентрације калцидиола. Још један аспект који добијени фактор у коначном моделу посебно наглашава је то што је модел обухватао испитанице које су припадале популацији здравих жена и које нису користиле витаминску суплементацију.

У нашем истраживању просечна дневна доза витамина D унета путем хране је износила $4,30 \pm 2,02 \mu\text{g}$, при чему је забележен један шири опсег у коме су се биле вредности ДД (од 0,9 до чак 8, $\mu\text{g}/\text{дневно}$). Посматрајући нижу граничну вредност овог опсега уочава се да је одређени део испитиване популације имао изузетно низак ниво ДД, само $0,9 \mu\text{g}/\text{дневно}$, што је неадекватна количина за остваривање оптималног статуса витамина D. Политике различитих земаља у погледу нутритивне регулативе за обогаћивање одређених производа витамином D могу довести до драстичних диспропорција у нивоу витамина D унетог путем хране код различитих становника упркос чињеници да постоје исти нутритивни режими (Holick et al. 2011). Препоруке National Institution of Health from US and European Food Safety Authority као горњу границу за дневни унос витамина D наводе $15 \mu\text{g}$, што је знатно виша вредност у односу на забележене количине у испитиваној популацији. Интересантно запажање у односу на забележену вредност ДД је да су просечне дневне дозе у овој субпопулацији испитаница биле знатно више у односу на раније доступне податке за популацију испитаника на територији Србије (Milovanovic, 2015; Matovic, 2018). Више вредности ДД које су забележене у нашем истраживању су карактеристика популације жена средње доби (старости од 35 до 50 година) које за себе саме одлучују на дневном нивоу шта ће унети од нутријената у организам, за разлику од студијске популације претходних истраживања која су вршена на студентима и деци који своје нутритивне уносе често сами не одређују. Ову сумњу поткрепљује чињеница да је у поменутој студији вршеној у студентској популацији опсег просечне дневне дозе унете путем исхране је био за скоро 50% нижи и износио $0,46\text{--}4,47 \mu\text{g}$ (Milovanovic, 2015).

Неадекватан унос витамина D путем хране забележен је у суседним земљама Европе које имају сличну политику и нутритивне препоруке, док су изузеци забележени у земљи попут Шведске где је просечан дневни унос витамина D путем хране износио око 3.3 μ g што се може објаснити честим конзумирањем рибе која је богата садржајем витамина D попут лососа (Spiro and Buttriss, 2014).

Други есенцијални параметар који показује значајан утицај на постизање физиолошког статуса витамина D у хуманом организму је излагање сунчевој светлости у адекватном периоду годину тј. дана када може доћи до максималне апсорпције сунчевих зрака и последичног формирања витамина D из превитамина D у кожи. Излагање сунчевој светлости није показало утицај на вредност клиренса 25-хидрокси витамина D у развијеном ПФК моделу за популацију жена у циклусу. Велики број спроведених експерименталних и клиничких истраживања широм света на различитим типовима испитаника је показао да постоје велики број фактора који утичу на синтезу витамина D у кожи појединца. У широкој палети ових фактора посебно се у литератури истиче улога географског подручја, годишњег доба, типа коже, употребе козметике са заштитним факторима као и стила облачења на синтезу витамина D у кожи (Holick et al. 2011; Milovanovic, 2017; Hilger et al. 2014). Временски период који су испитаници у нашем истраживању проводили у излагању сунчевој светлости износио је 2,20 \pm 0,84 часова. Иако се наведени временски период може сматрати адекватним за ендегену продукцију витамина D у кожи, постојали су одређени фактори који су умањили значај дужине временског периода излагања УВ сунчевим зрацима жена у циклусу а то је пре свега период године када је студија спроведена. Временски хоризонт спровођена студије је био од децембра до априла када је услед географске позиције Србије на Балканском полуострву онемогућена адекватна синтеза витамина D у кожи током дужег временског периода дана. Додатни фактор који умањује значај дужине излагања сунчевој светлости у нашој студији је период дана када су се жене у циклусу излагале сунцу. С'обзиром да је истраживање вршено на женама средње животне доби које представљају радну популацију у нашем друштву и које услед све већег броја обавеза које „модерна жена“ поседује имају мало времена да се излажу сунчевој светлости у периоду од 10 до 14 часова када је положај сунца на хоризонту и апсорпција УВ зрака најоптималнија у нашем региону (Stege and Schwarz, 2017).

Још један горе поменути фактор који утиче на смањену синтезу витамина D у кожи био је присутан у испитиваној популацији а то је употреба козметичких препарата са заштитним фактором са нарочитим нагласком на козметику лица која је саставни део модерног стила живота жена (Saraff and Shaw, 2016).

Истраживања вршена током последњих неколико година су научном аудиторијуму представила два параметра која су доведена у директну везу са серумском концентрацијом 25-хидрокси витамина D и која могу бити добри предиктори његовог статуса. Интересантан податак је да ова два параметра нису ни у каквој релацији са минералном хомеостазом већ одражавају хепатичну функцију а то су ниво аланин аминотрансферазе (АЛТ) и аспартат аминотрансферазе (АСТ). У наредном истраживању један од ова два биохемијска маркера, ниво аланин аминотрансферазе је показао утицај на ниво клиренса 25(OH)D у пуном ПФК моделу, да би се након изградње коначног модела овај ефекат изгубио чиме се закључило да АЛТ-а нема утицај на ниво клиренса витамина D у популацији жена у циклусу. Популациона студија, вршена током ове године у Ирану, је потврдила корелацију између нивоа АЛТ, АСТ-а и 25(OH)D што је донекле и очекивани резултат с'обзиром на познату чињеницу да је јетра орган у коме започиње први корак трансформације неактивног облика витамина D у биолошки активан облик (Nikniaz et al. 2018). Просечан ниво АЛТ-а у популацији жена у циклусу је износио $19,86 \pm 9,28$ IU/L, при чему је најнижа забележена вредност износила 5 IU/L а највиша 59 IU/L. Ови резултати указују на то да је код појединих испитаника била присутна нарушена функција јетре, што је могло последично да се одрази на серумску концентрацију 25(OH)D забележену у испитиваној субпопулацији жена али без утицаја на ниво клиренса калцидиола.

Параметар чији је утицај на серумску концентрацију показан како у различитим старосним групама, тако и код различитог пола, јесте индекс телесне масе (ИТМ). Истраживање које је вршио Delle Monache са сарадницима је испитивало управо утицај ИТМ-е на серумску концентрацију 25(OH)D код жена при чему је показана јака инверзна корелација између ова два параметра (Delle Monache et al. 2018).

До истих резултата дошла је и студија која је ово питање обрађивала још 2009. године при чему је ИТМ утицао не само на ниво 25(ОН)D, већ и на ниво активног облика 1,25(ОН)₂ витамина D. Још једна верификација овог сазнања уследила је као резултат мета-анализе урађене од стране Saneei и сарадника 2013. године (Saneei et al. 2013). У нашем истраживању ИТМ није показао значајан утицај на ниво клиренса 25(ОН)D у финалном и коначном ПФК моделу.

Овај резултат се донекле могао и очекивати с'обзиром да није било испитаница који су имали више ИТМ вредности тј. који би верификовале присуство клиничке гојазности. У светлу изнетих информација може се приметити да корекција суплементационе дозе витамина D у односу на ИТМ код здравих жена средње животне доби није сврсисходан приступ.

Поред параметара које смо у претходном тексту поменули, постоји велики број доказа који доказују присуство широке палете фактора чији је утицај на серумску концентрацију 25(ОН)D потврђен. Хиповитаминоза D је стање које на основу литературних доказа пријемчивије за старију популацију, мушки пол, тамнији тип коже, за посебан стил облачења (Holick et al. 2011, Milovanovic, 2017). Градска средина тј. фактори околине који подразумевају присуство загађујућих честица у ваздуху такође стварају подеснију средину за настанак дефицијенције/инсуфицијенције витамина D код становника. Посматрајући женски пол, фактори који нарочито предиспонирају настанак хиповитаминозе D су градска средина, млађе животно доба, жене са вишим нивоом образовања и запослењем које услед радног окружења мало времена проводе изложене сунчевој светлости (Holick et al. 2011, Alzaheb, 2018).

Приступ који омогућава превазилажење свих наведених потенцијалних препрека за постизање оптималног нивоа витамина D код здравих жена у циклусу подразумева адекватан ниво суплементације витамином D путем хране или суплемента, и адекватно излагање сунчевој светлости. Формирање јавних здравствених стратегија за ову популацију су идеално решење које је већ примењивано у појединим земљама, као што су Америка и Канада (Manios et al. 2017).

За сада у Европи овакве здравствене стратегије о суплементацији витамином D постоје само за специфичне популације као што су новорођенчад, старија популација и жене у менопаузи или са остепорозом, док за здраве жене средње животне доби не постоје.

Изградња ПФК модела за субпопулацију жена у постменопаузи, старости до 65 година, обухватала је испитивање утицаја 51 фактора на вредност клиренса 25-хидрокси витамина D. Од укупног броја испитиваних фактора, након изградње пуног модела значајним се показао утицај чак шест фактора а то су били: просечна дневна доза витамина D унета путем хране и суплементације, просечно дневно излагање сунцу као и излагање сунчевој светлости више или мање од 2h дневно, ниво ТРО антитела, конзумирање кафе више од три шољице дневно и комедикација са бензодиазепинима.

Након изградње коначног модела од наведених шест фактора само једна варијабла је задржала значајан утицај на вредност клиренса 25-хидрокси витамина D у субпопулацији жена у постменопаузи, а то је просечна дневна доза витамина D унета храном и суплементацијом.

Забележена количина просечне дневне дозе витамина D унета путем хране и суплементације код жена у постменопаузи износила је $24,01 \pm 15,3 \mu\text{g}$ са једним широким дијапазоном између најниже и највише забележене вредности. Најнижа вредност износила је $1,06 \mu\text{g}$, док је највиша била $70,06 \mu\text{g}$. Овако висока вредност горње границе је последица присуства примене суплемента витамина D у испитиваној популацији услед присуства остеопеније и остепорозе код 60% испитиване популације. Забележена просечна вредност у овој субпопулацији је знатно виша од просечне вредности у субпопулацији жена у циклусу $4,30 \pm 2,02 \mu\text{g}$ што је одражавало само унос путем хране. На основу резултата публикованих у медицинским базама података може се приметити различита процентуална заступљеност суплементације витамином D у свету, па је тако процентуална заступљеност примене суплемената који садрже витамин D у северним земљама скоро 61,7% док је Европским земљама попут Италије, Немачке и Француске присутна знатно нижа вредност од 7 до 27% (Spiro, 2014). Утицај просечне дневне дозе витамина D унете путем хране и суплемената се најјасније види кроз сагледавање редукције вредности МОФ-а за 191.477 јединица.

Добијени резултати у изграђеном ПФК моделу субпопулације жена у постменопаузи су у складу са претходно вршеним популационим фармакокинетичким анализама у Србији на популацији деце и здравих одраслих особа (Matovic, 2018; Milovanovic, 2017).

Излагање сунчевој светлости је фактор чији је утицај из пуног модела елиминисан након изградње коначног модела. С'обзиром да је испитивана популација обухватала жене у постменопаузи до 65.-те године може се претпоставити да је велики део испитиване популације жена заправо радно ангажован, и да не поседују довољно слободног времена да се излажу сунчевој светлости у најповољнијем периоду у току дана који смо већ навели у појашњењима првог популационог модела.

То потврђује и просечно излагање сунчевој светлости које је износило $2,69 \pm 1,34$ h, што је компаративно са временом које су проводиле и жене у циклусу. Други фактор који је утицао на овај резултат је временски период вршења истраживања који је за територију Крагујевца неповољан у периоду зиме и пролећа. Овај податак корелира са чињеницом да је суплементација витамином D у нашем истраживању у субпопулацији жена у постменопаузи заступљена у високом проценту, код чак 80%, док су остепороза и остеоенија биле присутне код 60%, из чега се закључује да је суплементацију у превенцији постменопаузалне остепорозе вршило чак 20% жена. Поједина истраживања бавила су се испитивањем утицаја излагања сунчевој светлости на одлагање почетка менопаузе али резултати нису поставили јасне доказе ове научне хипотезе (Aydin et al. 2005). Наспрам ових резултата истраживање која су вршено по типу кохортних студија су код жена у постменопаузи показали директну корелацију 25-хидрокси витамина D и излагања сунчевој светлости (Cheng et al. 2014).

Одређене животне навике попут конзумирања никотина, кофеина и алкохола могу значајно да детерминишу ниво серумске концентрације 25-хидрокси витамина D код људи. Услед ових познатих и научно верификованих постулата испитивали смо утицај наведена три фактора на ниво клиренса у нашој ПФК анализи, али нисмо показали позитивне резултате што корелира са резултатима ПФК студије на младој, здравој популацији у Србији (Milovanović et al. 2015).

Утицај конзумирања кофеина у количини већој од три шољице кафе дневно је испитиван у различитим популацијама и различитим дизајнима истраживања, при чему је Yang са сарадницима испитивао утицај конзумирања кофеина на остеопорозу код постменопаузалних жена и дошао до контраверзних података а то је да је остеопороза имала већу фреквенцу код жена које нису конзумирале кафу (Yang et al. 2015). Насупрот овим резултатима, Liu са сарадницима је вршио мета-анализу чији резултати су показали да унос кофеина повећава ризик од прелома за 4,9% што је објашњено директним утицајем кофеина на смањење серумске концентрације 25(OH)D (Liu et al. 2012).

Rapuri са сарадницима је својим експерименталним истраживањима пружио стручној јавности потенцијално објашњење на постојеће контраверзне закључке, а то је да кофеин утиче на ниво 25(OH)D путем утицаја на експресију рецептора за витамин D и то у великом обиму од 50 до 70% (Rapuri et al. 2001; Rapuri et al. 2007). Негативна корелација забележена је и између конзумирања никотина и нивоа витамина D (Brot, 1999).

Утицај нивоа ТПО антитела на вредности клиренса витамина D код жена у постменопаузи је такође испитиван, али није потврђен. Присуство рецептора за витамин D је доказано на многим ткивима и органима и самим тим је следствено постојање мултиплих ефеката овог витамина укључујући и имуномодулаторни ефекат који може бити јако користан код пацијената са имунодефицијенцијом (Spiro and Buttriss, 2014). Shin са сарадницима је доказао повезаност између неадекватног статуса витамина D у хуманом организму и аутоимуног тиреодизма, тј. присуство антитиреоидних антитела код особа са хиповитаминозом D (Shin et al. 2014). Директан утицај нивоа витамина D на смањење нивоа ТПО антитела показан је у рандомизираној студији која је испитивала утицај суплементације витамином D на тиреоидни статус (Chaudhary et al. 2016).

Испитивања која су вршена током последњих неколико година, а која су имала у фокусу витамин D испитивала су утицај комедикације на метаболизам витамина D и последично и на његов статус. Услед ове чињенице у циљу дефинисања коначног ПФК модела клиренса витамина D код жена у постменопаузи испитиван је утицај бифосфоната, калцијума, статина и бензодиазепина. Дефинисањем формуле коначног модела комедикација није показала значајне ефекте на вредност клиренса 25(OH)D. Утицај употребе бензодиазепина на статус витамина D био је фокус одређених експерименталних истраживања, а добијени резултати показали су контраверзне податке (Van Orten-Luiten et al. 2014). Низак ниво витамина D индукован лековима може бити нарочито штетан за жене у постменопаузи, јер промена у коштаном ткива које настају услед хормонских промена које се дешавају у том животном периоду. Једно од потенцијалних појашњења утицаја бензодиазепина на статус 25(OH)D може бити фармакокинетска интеракција на нивоу метаболизма у јетри.

Фармакокинетске анализе су показале да се бромазепам метаболише у јетри путем изоформе CYP1A2 и CYP2D6, лоразепам путем изоформе UGT2B15 док се витамин D примарно метаболише путем изоформи CYP27A1, CYP27B1 и CYP24A1. Приликом прописивања бензодиазепина женама у постменопаузи треба размишљати о потенцијалним интеракцијама на нивоу метаболизма и последичном штетном исходу.

Трећа спроведена популациона фармакокинетичка анализа у овом истраживању била је дефинисање коначног модела клиренса 25-хидрокси витамина D код старијих жена. У овом поступку испитиван је утицај 51 коваријанте при чему је изградњом пуног модела показан утицај 4 коваријанте на вредност клиренса у овој субпопулацији. Добијене коваријанте су биле просечна дневна доза витамина D унета путем хране и суплементације, ниво паратиреоидног хормона, вредност T скора и комедикација бензодиазепинима. Након наредног корака у фармакокинетичкој анализи од претходно набројаних 4 коваријанте само две су задржале значајност у коначном моделу, а то су биле просечна доза витамина D унета путем хране и суплементације и ниво паратиреоидног хормона.

Просечна доза витамина D унета путем хране и суплементације у субпопулацији старијих жена је износила $39,03 \pm 20,86 \mu\text{g}$ што представља вишу просечну вредност у односу на претходне две субпопулације испитаника у нашем истраживању. Ова карактеристика је важила и за опус у коме су биле вредности ове коваријанте ($4,64\text{--}93,46 \mu\text{g}$). Овако висока вредност горње границе опуса може бити последица вишег степена адхеренце у овој популацији и редовније примене суплемената витамина D услед непостојања радне ангажованости у овом животном добу и поседовања више времена за бригу о сопственом здрављу.

Ниво ПТХ у хуманом организму је фактор који у значајној мери доприноси постизању и одржавању оптималног нивоа витамина D што је и доказано у клиничким испитивањима. Утицај нивоа ПТХ на вредност клиренса 25(OH)D код старијих жена може се јасно уочити на основу смањења вредности МОФ-а.

Каскадна реакција повезаности између серумске концентрације 25(OH)D и нивоа ПТХ заснива се на метаболизму 25(OH)D који се обаља у јетри путем специфичног ензима, 1- α хидроксилазе чија активност, а самим тим последично и метаболизам витамина D, зависи од серумског нивоа фосфата и калцијума тј. од нивоа ПТХ-а (Milovanović, 2017).

Испитивање корелације између серумске концентрације калцидиола и старости, минералне густине костију (Т или Z скорa) добијених DXA методом, квалитетом живота, присуством страха и степена депресије у испитиваним популацијама жена показало је њено постојање са квалитетом живота мереног генеричким упитником код жена у репродуктивном периоду, са минералном густином костију, вредностима Т скорa и квалитетом живота процењеног употребом специфичног упитника код жена у постменопаузи, док корелација није показана код жена које припадају старијој популацији, односно код жена старије од 65.-те године.

6 ЗАКЉУЧАК

На основу резултата спроведеног истраживања произилазе следеће закључци:

- Добијене су популационе, средње вредности фармакокинетичких параметара (клиренса и волумена дистрибуције) код популације жена старијих од 35 година коју чиниле три испитиване субпопулације (жене са редовним менструалним циклусом, жене у менопаузи односно постменопаузи и жене старије од 65.-те године живота).
- Фармакокинетичку варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина D код жена које имају редован менструални циклус значајно одређује просечна доза овог витамина унета храном.
- Фармакокинетичку варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина D код жена у постменопаузи значајно одређује просечна доза овог витамина унета храном и суплементацијом.
- Фармакокинетичку варијабилност клиренса 25-хидрокси витамина D код жена старијих од 65 година значајно одређују: просечна доза овог витамина унета храном и суплементацијом, и вредности паратиреоидног хормона.
- Серумски нивои калцијума и фосфата није значајно утицао на вредности испитиваних фармакокинетичких параметара у популацији жена старијих од 35 година.
- Временски период изложености сунчевој светлости није значајно утицао на вредности испитиваних фармакокинетичких параметара у популацији жена старијих од 35 година.
- Потврђене су добре предиктивне перформансе развијених популационо, фармакокинетичких модела клиренса 25-хидрокси витамина D код све три испитиване субпопулације жена.

- Развијени фармакокинетички модели клиренса 25-хидрокси витамина D, односно добијене једначине, могу се користити у доношењу препорука за кориговање и индивидуализацију дозе овог витамина код жена у циклусу, постменопаузи као и старијих жена у Србији.
- Показано је постојање корелације између серумских концентрација 25-хидрокси витамина D са квалитетом живота код жена са редовним менструалним циклусом; минералном густином костију и вредностима T скора добијених DXA методом и квалитетом живота код жена у постменопаузи.
- Није показано постојање корелације између серумских концентрација 25-хидрокси витамина D са годинама старости, присуством страха и степеном депресивности у популацији жена старијих од 35 година.

7 ЛІТЕРАТУРА

1. Adachi JD, Adami S, Gehlbach S, Anderson FA, Boonen S, Chapurlat RD, et al (2010). Impact of Prevalent Fractures on Quality of Life: Baseline Results From the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women. *Mayo Clinic Proc* 85(9): 806-13.
2. Adams JE (2013). Advances in bone imaging for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol* 9(1): 28-42.
3. Adams JS (1997). Extra-renal production and action of active vitamin D metabolites in human lymphoproliferative diseases. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press; 903–922.
4. Adorini L, Penna G (2008). Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(8): 404-12.
5. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG (2013). Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and metaanalysis. *Clin Chem* 59(2): 381–391.
6. Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O’Beirne M, Rabi DM (2013). Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and metaanalysis of observational studies. *BMJ* 346: f1169.
7. Ajabshir S, Asif A, Nayer A (2014). The effects of vitamin D on the renin-angiotensin system. *J Nephropathol* 3(2): 41-3.
8. Al Kaissi A, Windpassinger C, Chehida FB, et al (2017). How frequent is osteogenesis imperfecta in patients with idiopathic osteoporosis? Case reports. *Medicine (Baltimore)* 96(35): e7863.
9. Al-Musawi NM.(2001). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory-II with university students in Bahrain. *J Pers Assess* 77(3): 568–579.

10. Alshahrani F, Aljohani N (2013). Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity. *Nutrients* 5(9): 3605-3616.
11. Anglin RE, Samaan Z, Walter SD, McDonald SD (2013). Vitamin D deficiency and depression in adults: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatr* 202: 100-7.
12. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N (2012). Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 12(2): 127-36.
13. Araki T, Holick MF, Alfonso BD, et al (2011). Vitamin D intoxication with severe hypercalcemia due to manufacturing and labeling errors of two dietary supplements made in the United States. *J ClinEndocrinol Metab* 96(12): 3603-3608.
14. Armstrong DJ, Meenagh GK, Bickle I, Lee AS, Curran ES, Finch MB (2007). Vitamin D deficiency is associated with anxiety and depression in fibromyalgia. *Clin Rheumatol* 26(4): 551-4.
15. Atanasković-Marković Z, Bjegović V, Janković S, et al (2003). The Burden of Disease and Injury in Serbia. Belgrade: Ministry of Health of the Republic of Serbia. *Eur J Public Health* 17(1):80-5.
16. Audran M (2003). Clinical and biological elements in osteoporosis in: Treves PrR, editor. *Osteoarthritis and Osteoporosis What is the relationship?* Expanscience laboratories 23-39.
17. Australian Institute of Health and Welfare (2008). Osteoporosis and fractures. Arthritis and osteoporosis in Australia. 89-109. Available at: <https://www.aihw.gov.au/getmedia/5fa77112-acfa-4989-a1ce-a4a89a09c9fa/aoa08-c06.pdf.aspx> (Last accessed: 14.03.2018).
18. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P (2014). Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2(1): 76-89.
19. Ayala ES, Meuret AE, Ritz T (2009). Treatments for blood-injury-injection phobia: a critical review of current evidence. *J Psychiatr Res* 43(15): 1235-1242.

20. Bachrach LK (2005). Assessing bone health in children: who to test and what does it mean? *Pediatr Endocrinol Rev Suppl* 3: 332-6.
21. Backovic D (2010). Mental health and mental hygiene between two millennia. *Med Pregl* 63: 833-838.
22. Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K (2013). Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem* 46(3): 190–196.
23. Bailey SJ, McCaffery PJ (2010). Vulnerability of the brain to neuropsychiatric disorders resulting from abnormal thyroid hormone or vitamin D homeostasis. *Brain protection in schizophrenia, mood and cognitive disorders*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer.
24. Ball SJ, Haynes A, Jacoby P, et al (2014). Spatial and temporal variation in type 1 diabetes incidence in Western Australia from 1991 to 2010: increased risk at higher latitudes and over time. *Health Place* 28: 194–204.
25. Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E (2006). Vitamin D deficiency: A global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(4): 640-6.
26. Bandirali M, Poloni A, Sconfienza LM et al (2015). Short-term precision assessment of trabecular bone score and bone mineral density using dual-energy X-ray absorptiometry with different scan modes: an in vivo study. *Eur Radiol* 25(7): 2194-2198.
27. Beck AT, Steer R A, Garbin, MG. (1988). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clin Psychol Rev* 8(1): 77–100.
28. Beck AT, Steer RA, Brown GK. (1996). *Manual for the Beck Depression Inventory-II*. San Antonio, TX: Psychological Corporation.
29. Becker C (2006). Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. *Clin Cornerstone* 8(1): 19-27.

30. Bergland A, Thorsen H, Kåresen R (2011). Association between generic and diseasespecific quality of life questionnaires and mobility and balance among women with osteoporosis and vertebral fractures. *Aging Clin Exp Res* 23 (4): 268-272.
31. Bergland A, Thorsen H, Kåresen R (2011): Association between generic and disease-specific quality of life questionnaires and mobility and balance among women with osteoporosis and vertebral fractures. *Aging Clin Exp Res* 23(4): 268–272.
32. Bergman GJD, Fan T, Mcfetridge JT, Sen SS (2010). Efficacy of vitamin D3 supplementation in preventing fractures in elderly women: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 26(5): 1193–1201.
33. Bergner M, Bobbit R, Carter W, Gilson B (1978). The Sickness Impact Profile: Development Flanagan J. A research approach to improving our quality of life. *Am Psychol* 33: 138-147.
34. Beurs E, Beekman AT, van Balkom AJ, Deeg DJ, van Dyck R, van Tilburg W (1999). Consequences of anxiety in older persons: its effect on disability, well-being and use of health services. *Psychol Med* 29(3): 583–593.
35. Beveridge LA, Struthers AD, Khan F, et al (2015). D-PRESSURE Collaboration. Effect of Vitamin D Supplementation on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-analysis Incorporating Individual Patient Data. *JAMA Intern Med* 175(5): 745-754.
36. Bierman EJM, Comijs HC, Rijmen F, Jonker C, Beekman ATF (2008). Anxiety symptoms and cognitive performance in later life: results from the longitudinal aging study Amsterdam. *Aging Ment Health* 12(4): 517–523.
37. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, et al (2014). Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 99(10): 3561-3569.

38. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, et al (2016). Vitamin D measurement standardization: the way out of the chaos. *J Steroid Biochem Mol Biol* 173:117-121.
39. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, et al (2009). Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 339: b843–846.
40. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, et al (2009). Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br Med J* 339: b369.
41. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, et al (2012). A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med* 367(1): 40-49.
42. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B (2005). Fracture prevention by vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Med Assoc* 293(18): 2257–64.
43. Black DM, Palermo L, Nevitt MC, Genant HK, Christensen L, Cummings SR (1999). Defining incident vertebral deformity: a prospective comparison of several approaches. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res* 14(1): 90–101.
44. Black LJ, Anderson D, Clarke MW, Ponsonby AL, Lucas RM (2015). An investigator group, analytical bias in the measurement of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations impairs assessment of vitamin D status in clinical and research settings. *PLoS One* 10(8): e0135478.
45. Bland R, Markovic D, Hills CE, et al (2004). Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89–90(1-5): 121–125.

46. Blank S, Scanlon KS, Sinks TH, Lett S, Falk H (1995). An outbreak of hypervitaminosis associated with the overfortification of milk from a home-delivery dairy. *AM J Public Health* 85(5): 656-659.
47. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, et al (2007). Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 92(9): 3517–3522.
48. Bodnar LM, Catov JM, Zmuda JM, et al (2010). Maternal serum 25- hydroxyvitamin D concentrations are associated with smallfor-gestational age births in white women. *J Nutr* 140 (5): 999–1006.
49. Body JJ (2011). How to manage postmenopausal osteoporosis? *Acta Clin Belg* 66(6): 443-447.
50. Body JJ, Bergmann P, Boonen S, et al (2011). Non-pharmacological management of osteoporosis: a consensus of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int* 22(11): 2769-2788.
51. Boeckmann AJ, Sheiner LB, Beal SL (2011). *NONMEM users guide*. Ellicott City: ICON Developmenty Solutions.
52. Bohon TM, Goolsby MA (2013). The Role of Vitamin D Supplements in Women's Health. *Clin Med Insights Womens Health* 6: 67-70.
53. Bonjour JP, Carrie AL, Ferrari S, et al (1997). Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Invest* 99(6): 1287–1294.
54. Boricic K, Vasic M, Grozdanov Jet al (2014). Results of research of Serbian population health, year 2013. Public Health Institute “Dr Milan Jovanovic Batut,” Belgrade (in Serbian).
55. Borissova AM, Shinkov A, Vlahov J, et al (2013). Vitamin D status in Bulgaria-winter data. *Arch Osteoporos* 8:133.

56. Bosomworth NJ (2011). Mitigating epidemic vitamin D deficiency: The agony of evidence. *Can Fam Physician* 57(1): 16–20.
57. Bowyer L, Catling-Paull C, Diamond T, et al (2009). Vitamin D, PTH and calcium levels in pregnant women and their neonates. *Clin Endocrinol* 70(3): 372–377.
58. Branković S, Vukojević P, Vujasinović-Stuopar N, Palić-Obradović D (2000). Role of exercise program on bone mass in patients with osteoporosis. *Acta rheum Belgrad* 30: 34–38.
59. Braun MM, Patriarca PA, Ellenberg SS (1997). Syncope after immunization. *Arch Pediatr Adolesc Med* 151(3): 255–259.
60. Brixen K, Abrahamsen B, Kassem M (2005). Prevention and treatment of osteoporosis in women. *Curr Obstet Gynaecol* 15(4): 251–258.
61. Brooks SPJ, Greene-Finestone L, Whiting S, Fioletov VE, Laffey P, Petronella N (2017). An Analysis of Factors Associated with 25-Hydroxyvitamin D Levels in White and Non-White Canadians. *J AOAC Int* 100(5): 1345-1354.
62. Brot C, Jorgensen NR, Sorensen OH (1999). The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *Eur J Clin Nutr* 53(12): 920-926.
63. Brown RB, Haq A, Stanford CF, Razzaque MS (2015). Vitamin D, phosphate, and vasculotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 93(12): 1077-1082.
64. Buell JS, Dawson-Hughes B (2008). Vitamin D and neurocognitive dysfunction: Preventing “D” decline? *Mol Aspects Med* 29(6): 415–422.
65. Burton JM, Costello FE (2015). Vitamin d in multiple sclerosis and central nervous system demyelinating disease-a review. *J Neuroophthalmol* 35(2): 194-200.
66. Callahan R, Edelman EB, Smith MS & Smith JJ (1963). Study of the incidence and characteristics of blood donor “reactors”. *Transfusion* 3: 76–82.
67. Candido FG, Bressan J (2014). Vitamin D: link between osteoporosis, obesity, and diabetes? *Int J Mol Sci* 15(4): 6569-6591.

68. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF (1998). 1,25-dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 128(1): 68–72.
69. Capatina C, Carsote M, Caragheorgheopol A, Poiana C, Berteanu M (2014). Vitamin D deficiency in postmenopausal women - biological correlates. *Maedica (Buchar)* 9(4): 316-322.
70. Carlberg C (2017). Molecular endocrinology of vitamin D on the epigenome level. *Mol Cell Endocrinol* 453: 14–21.
71. Carlberg C, Haq A (2018). The concept of the personal vitamin D response index. *J Steroid Biochem Mol Biol* 175: 12–17.
72. Carnevale V, Modoni S, Pileri M, et al (2001). Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. *Osteoporos Int* 12(12): 1026-1030.
73. Carrara D, Bruno RM, Bacca A, et al (2016). Cholecalciferol treatment downregulates renin-angiotensin system and improves endothelial function in essential hypertensive patients with hypovitaminosis D. *J Hypertens* 34(11): 2199–2205.
74. Carvalho LS, Sposito AC (2015). Vitamin D for the prevention of cardiovascular disease: Are we ready for that? *Atherosclerosis* 241(2): 729-740.
75. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, et al (2012). Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 103(4): 1033-1044.
76. Cashman KD, Kiely M (2014). Recommended dietary intakes for vitamin D: Where do they come from, what do they achieve and how can we meet them? *J Hum Nutr Diet* 27(5): 434-442.
77. Caspi R, Altman T, Dreher K, et al (2012). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 40: 742-753.

78. Cauley JA, Greendale GA, Ruppert K, et al (2015). Serum 25 hydroxyvitamin D, bone mineral density and fracture risk across the menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 100(5): 2046-2054.
79. Cauley JA, Lacroix AZ, Wu L, et al (2008). Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. *Ann Intern Med* 149(4): 242–250.
80. Cavalier E, Souberbielle JC (2018). Vitamin D and its metabolites: from now and beyond. *EJIFCC* 29(2): 105-110.
81. Cawthon P (2011). Gender Differences in Osteoporosis and Fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. *Clin Orthop Relat Res* 469(7): 1900-1905.
82. Chamnongpol S, Groisman EA (2002). Mg²⁺ homeostasis and avoidance of metal toxicity. *Mol Microbiol* 44(2): 561-571.
83. Chao YS, Ekwaru JP, Ohinmaa A, Griener G, Veugelers PJ (2014). Vitamin D and health-related quality of life in a community sample of older Canadians. *Qual Life Res* 23(9): 2569–2575.
84. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, et al (1992). Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *N Engl J Med* 327(23): 1637–1642.
85. Chaudhary S, Dutta D, Kumar M, et al (2016). Vitamin D supplementation reduces thyroid peroxidase antibody levels in patients with autoimmune thyroid disease: An open-labeled randomized controlled trial. *Indian J Endocrinol Metab* 20(3): 391-398.
86. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, et al (2007). Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 460(2): 213-217.
87. Chen Y, Du J, Zhang Z, et al (2014). MicroRNA-346 mediates tumor necrosis factor alpha-induced downregulation of gut epithelial vitamin D receptor in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 20 (11): 1910-1918.

88. Cheng TY, Millen A, Wactawski-Wende J, et al (2014). Vitamin D Intake Determines Vitamin D Status of Postmenopausal Women, Particularly Those with Limited Sun Exposure. *J Nutr* 144(5): 681–689.
89. Chlebna-Sokół D, Michałus I, Rusińska A, et al (2016). Evaluation of vitamin D levels in children hospitalized with symptoms suggesting metabolism disorders in skeleton system. *Pediatr Endocrinol* 15.4.57: 23–32.
90. Chon SJ, Koh YK, Heo JY, et al (2017). Effects of vitamin D deficiency and daily calcium intake on bone mineral density and osteoporosis in Korean postmenopausal woman. *Obstet Gynecol Sci* 60(1): 53-62.
91. Christakos S, Hewison M, Gardner DG, et al (2013). Vitamin D: beyond bone. *Ann NY Acad Sci* 1287: 45-58.
92. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M (2014). Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol* 21(5): 151.
93. Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S (2014). Vitamin d and its relationship with obesity and muscle. *Int J Endocrinol* 2014: 841248.
94. Cockerill W, Lunt M, Silman AJ, et al (2004). Healthrelated quality of life and radiographic vertebral fracture. *Osteoporosis Int* 15(2): 113-119.
95. Coelho R, Martins A, Barros H (2002). Clinical Profiles relating gender and depressive symptoms among adolescents ascertained by the Beck Depression Inventory-II. *European Psychiatry* 17(4): 222–226.
96. Cooper C, Jakob F, Chinn C, et al (2008). Fracture incidence and changes in quality of life in women with an inadequate clinical outcome from osteoporosis therapy: the Observational Study of Severe Osteoporosis (OSSO). *Osteoporosis Int* 19(4): 493-501.
97. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, et al (2011). Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes* 60(5): 1624–1631.

98. Cosman F, Beur J, LeBoff S, et al (2014). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int* 25(10): 2359-2381.
99. Cummings SR, Bates D, Black DM (2002). Clinical use of bone densitometry - Scientific review. *JAMA* 288(15): 1889-1897.
100. Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Serio B (2007). Vitamin D in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 7(1): 59-64.
101. Davies JS, Poole CD, Feldschreiber P (2014). The medico-legal aspects of prescribing vitamin D. *Br J Clin Pharmacol* 78(6): 1257-1263.
102. Dawson-Hughes B, Lindsay R, Khosla S, et al (2008). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington. *Osteoporos Int* 25(10): 2359-2381.
103. Dawson-Hughes B, Lindsay R, Khosla S, et al (2008). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington DC: National Osteoporosis Foundation. dostupno na: http://www.natap.org/2008/HIV/071508_07.htm (Last accessed: 21.02 2018.).
104. de Azevedo MN, Nunes JV, Pasqualette HA, Tuma MdeF, Nunes LC (2009). Bone mineral density at 45 years of age, before menopause. *J Natl Med Assoc* 101(8): 788-792.
105. de Rouffignac C, Quamme G (1994). Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev* 74(2): 305-322.
106. Deepthi S, Narayan G, Naidu J (2012). Study of biochemical bone turnover markers in postmenopausal women leading to osteoporosis. *Int J Appl Biol Pharm Technol* 3: 301-305.
107. Delle Monache S, Di Fulvio P, Iannetti E, et al (2018). Body mass index represents a good predictor of vitamin D status in women independently from age. *Clin Nutr* pii: S0261-5614(18)30089-X.

108. Delnevo A, Bandirali M, Di Leo G, et (2013). Differences among array, fast array, and high-definition scan modes in bone mineral density measurement at dual-energy x-ray absorptiometry on a phantom. *Clin Radiol* 68(6): 616-619.
109. DeLuca H (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep* 3: 479.
110. Denimal D, Ducros V, Dupré T, et al (2014). Agreement of seven 25-hydroxy vitamin D3 immunoassays and three high performance liquid chromatography methods with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 52(3): 511–520.
111. Deschasaux M, Souberbielle JC, Partula V, et al (2016). What do people know and believe about vitamin D? *Nutrients* 8(11): E718.
112. Dey V, Farrah TE, Traynor JP, Spalding EM, Robertson SE, Geddes CC (2017). Symptomatic fracture risk in the renal replacement therapy population. *Nephrol Dial Transplant* 32(7): 1211–1216.
113. Díaz L, Díaz-Muñoz M, García-Gaytán AC, Méndez I (2015). Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology. *Nutrients* 7(6): 5020–5050.
114. Diaz-Curiel M (2013). Effects of Exercise on Osteoporosis. *J Osteopor Phys Act* 1:e104.
115. Dimitrakopoulou VI, Tsilidis KK, Haycock PC, et al (2017). Circulating vitamin D concentration and risk of seven cancers: mendelian randomisation study. *BMJ* 359: j4761.
116. Djokovic J, Milovanovic B, Milovanovic JR et al (2016). Translation of the Medical Fear Survey to Serbian: psychometric properties. *Hippokratia* 20(1): 44-49.
117. Doknic M, Maric NP, Britvic D, et al (2011). Bone remodeling, bone mass and weight gain in patients with stabilized schizophrenia in real-life conditions treated with long-acting injectable risperidone. *Neuroendocrinology* 94: 246-254.

118. Dong JY, Zhang WG, Chen JJ, Zhang ZL, Han SF, Qin LQ (2013). Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients* 5(9): 3551–3562.
119. Dontas I, Yiannakopoulos C (2007). Risk factors and prevention of osteoporosis-related fractures. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7(3): 268-272.
120. Dozois DJA, Dobson KS, Ahnberg JL (1998). A psychometric evaluation of the Beck Depression Inventory-II. *Psychol Assess.* 10(2): 83–89.
121. Dozois DJA, Covin, R. (2004). The Beck Depression Inventory-II (BDI-II), Beck Hopelessness Scale (BHS), and Beck Scale for Suicide Ideation (BSS). In M. Hersen (Series Ed.), D. L. Segal, & M. Hilsenroth (Vol. Eds.), *Comprehensive handbook of psychological assessment Personality assessment and psychopathology*: pp. 50–69. Hoboken, NY: Wiley.
122. Du J, Chen Y, Shi Y, et al (2015). 1,25-Dihydroxyvitamin D Protects Intestinal Epithelial Barrier by Regulating the Myosin Light Chain Kinase Signaling Pathway. *Inflamm Bowel Dis* 21(11): 2495-2506.
123. Ducasse D, Capdevielle D, Attal J, et al (2013). Blood-injection-injury phobia: Physiochophysiological and therapeutical specificities. *Encephale* 39(5): 326-331.
124. Dušek T, Kaštelan D, Pečina M (2012). Tjelesna aktivnost u prevenciji osteoporoze. *Arh Hig Rada Toksikol* 63(3): 41-46.
125. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): 8-28.
126. E.H.A.M. Elsenberg, E. ten Boekel, H. Huijgen, A.C. Heijboer (2017). Standardization of automated 25-hydroxyvitamin D assays: how successful is it? *Clin Biochem* 50(18): 1126-1130.
127. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2016). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of vitamin D. Available at: www.efsa.europa.eu/efsajournal. (Last accessed: 01.03 2018).

128. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2012): Scientific opinion on the tolerable upper intake level of vitamin D. *EFSA Journal* 10:2813: 1-45.
129. Elin RJ (2010). Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. *Magnes Res* 23(4): 194-S198.
130. El-Khoury F, Cassou B, Charles MA, Dargent-Molina P (2013). The effect of fall prevention exercise programmes on fall induced injuries in community dwelling older adults: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 347: f6234.
131. Elsenberg, E, Boekel E, Huijgen H, Heijboer AC (2017). Standardization of automated 25-hydroxyvitamin D assays: how successful is it? *Clin. Biochem* (18): 1126-1130.
132. Engelke K, Adams J, Armbrecht G, et al (2008). Clinical use of quantitative computed tomography and peripheral quantitative computed tomography in the management of osteoporosis in adults: the 2007 D Official Positions. *J Clin Densitom* 11(1): 123–162.
133. Engelsen O (2010). The relationship between ultraviolet radiation exposure and vitamin D status. *Nutrients* 2(5): 482-495.
134. Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, Worf E, Halwachs-Baumann G (2015). Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. *Biochem Medica* 25(2): 203–212.
135. Ensrud KE (2013). Epidemiology of fracture risk with advancing age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(10): 1236-1242.
136. Eriksen E (2012). Treatment of osteopenia. *Rev Endocr Metab Disord* 13(3): 209-223.
137. Erlenfeld G, editor (2004). *Chromsystems: Reagent kits, instruments and controls*. Munchen: Chromsystems.

138. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005). Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 29(1): 21-30.
139. Fan T, Nocea G, Modi A, Stokes L, Sen SS (2013). Calcium and vitamin D intake by postmenopausal women with osteoporosis in Spain: an observational calcium and vitamin D intake (CaVIT) study. *Clin Interv Aging* 8: 689-696.
140. Farrell CJ, Herrmann M (2013). Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(5): 675-688.
141. Fass R, Tougas G (2002). Functional heartburn: the stimulus, the pain, and the brain. *Gut* 51(6): 885-892.
142. Feng H, Xun P, Pike K, et al (2017). In utero exposure to 25-hydroxyvitamin D and risk of childhood asthma, wheeze, and respiratory tract infections: a meta-analysis of birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol* 139(2): 1508-1517.
143. Ferenidou F, Chalimourdas T, Antonakis V, Vaidakis N, Papadimitriou G (2012). Combined Case of Blood-Injury-Injection Phobia and Social Phobia: Behavior Therapy Management and Effectiveness through Tilt Test. *Case Rep Psychiatry* 2012: 368039.
144. Ferrer J, Neyro JL, Estevez A (2005). Identification of risk factors for prevention and early diagnosis of asymptomatic postmenopausal women. *Maturitas* 52(1): S7-22.
145. Finklea JD, Grossmann RE, Tangpricha V (2011). Vitamin D and chronic lung disease: a review of molecular mechanisms and clinical studies. *Adv Nutr* 2(1): 244-253.
146. Fisher L, Byrnes E, Fisher AA (2009). Prevalence of vitamin K and vitamin D deficiency in patients with hepatobiliary and pancreatic disorders. *Nutr Res* 29(9): 676-683.

147. Fitzpatrick TB (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124(6): 869-871.
148. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry Population Pharmacokinetics. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) February 1999 Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM072137.pdf>. (Last accessed: 23.03.2018).
149. Foong RE, Bosco A, Jones AC, et al (2015). The effects of in utero vitamin D deficiency on airway smooth muscle mass and lung function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53(5): 664–675.
150. Forrest KY, Stuhldreher WL (2011). Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutr Res* 31(1): 48–54.
151. Gaksch M, Jorde R, Grimnes G, et al (2017). Vitamin D and mortality: individual participant data meta-analysis of standardized 25-hydroxyvitamin D in 26916 individuals from a European consortium. *PLoS One* 12(2): e0170791.
152. Ganji V, Milone C, Cody MM, McCarty F, Wang YT (2010). Serum vitamin D concentrations are related to depression in young adult US population: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int Arch Med* 11; 3: 29.
153. Ganzeboom KS, Colman N, Reitsma JB, Shen WK, Wieling W (2003). Prevalence and triggers of syncope in medical students. *Am J Cardiol* 91(8): 1006–1008.
154. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D (2002). New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 13(3): 100–105.

155. Garg S, Sabri D, Kanji J, et al (2013). Evaluation of vitamin D medicines and dietary supplements and the physicochemical analysis of selected formulations. *J Nutr Health Aging* 17(2): 158-161.
156. Garip Y, Eser F, Bodur H, Baskan B, Sivas F, Yilmaz O (2015). Health related quality of life in Turkish polio survivors: impact of post-polio on the health related quality of life in terms of functional status, severity of pain, fatigue, and social, and emotional functioning. *Rev Bras Reumatol pii: S0482-5004(15)00022-4*.
157. Garland C, Gorham E, Garland F (2009). Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 19(7): 468–483.
158. Garland C, Gorham E, Mohr S, et al (2007). Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5): 708–711.
159. Garland CF, Kim JJ, Mohr SB, et al (2014). Meta-analysis of all-cause mortality according to serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Public Health* 104(8): e43–50.
160. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC (1993). Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 8(9): 1137-1148.
161. Gennari C (2001). Calcium and vitamin D nutrition and bone disease of the elderly. *Public Health Nutr* 4(2B): 547-559.
162. Gerova DI, Galunska BT, Ivanova II, et al (2014). Prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in Bulgarian patients with chronic hepatitis C viral infection. *Scand J Clin Lab Invest* 74(8): 665-672.
163. Gianfrancesco MA, Stridh P, Rhead B, et al (2017). Evidence for a causal relationship between low vitamin D, high BMI, and pediatric-onset MS. *Neurology* 88(17): 1623–1629.
164. Gillespie WJ, Avenell A, Henry DA, O’Connell DL, Robertson J (2001). Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and post-menopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* (3): CD000227.

165. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo Jr CA (2009). Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 169(4): 384–390.
166. Giovannucci E (2008). Vitamin D status and cancer incidence and mortality. *Adv Exp Med Biol* 624: 31–42.
167. Gloth FM, Alam W, Hollis B (1999). Vitamin D vs broad spectrum phototherapy in the treatment of seasonal affective disorder. *J Nutr Health Aging* 3(1): 5-7.
168. Glowacki J, Hurwitz S, Thornhill TS, Kelly M, LeBoff MS (2003). Osteoporosis and vitamin-D deficiency among postmenopausal women with osteoarthritis undergoing total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 85(12): 2371-2377.
169. Gold DT (1996). The clinical impact of vertebral fractures: Quality of life in women with osteoporosis. *Bone* 18(3): S185–S189.
170. Goldstein D (2009). The epidemic of vitamin D deficiency. *J Pediatr Nurs* 24(4): 345–346.
171. Gonzalez-Molero I, Morcillo S, Valdes S, et al (2011). Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr* 65(3): 321-328.
172. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, et al (2006). Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta-analysis. *Am J Prev Med* 32(3): 210–216.
173. Goula T, Kouskoukis A, Drosos G, et al (2015). Vitamin D status in patients with knee or hip osteoarthritis in a Mediterranean country. *J Orthop Traumatol* 6(1): 35-39.
174. Graham DT (1961). Prediction of fainting in blood donors. *Circulation* 23: 901–906.
175. Guarantor A.M. Wallace, S. Gibson, A. de la Hunty, C. Lamberg-Allardt, M. Ashwell (2010). Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory:

- current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 75(7): 477–488.
176. Guglielmi G, Muscarella S, Bazzocchi A (2011). Integrated imaging approach to osteoporosis: state-of-the-art review and update. *Radiographics* 31(5): 1343-1364.
177. Gupta A, Bush A, Hawrylowicz C, Saglani S (2012). Vitamin D and asthma in children. *Paediatr. Respir Rev* 13(4): 236–243.
178. Han K, Pillai VC, Venkataramanan R (2013). Population Pharmacokinetics of Cyclosporine in Transplant Recipients. *The AAPS Journal* 15(4): 901-912.
179. Haq A, Svobodova J, Imran S, Stanford C, Razzaque MS (2016). Vitamin D deficiency: a single centre analysis of patients from 136 countries. *J Steroid Biochem Mol Biol* 164: 209-213.
180. Harris CA, D'Eon JL (2008). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory – Second Edition (BDI-II) in individuals with chronic pain. *Pain* 137(3): 609–622.
181. Harvey N, Dennison E, Cooper C. The epidemiology of osteoporotic fractures (2013). John Wiley & Sons, Inc 348–536.
182. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A (2003). Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin. D. *J Am Coll Nutr* 22(2): 142-146.
183. Hendrickx G, Boudin E, Van Hul W (2015). A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 11(8): 462-474.
184. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, et al. (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 8(1-2): 136.

185. Hilger J, Friedel A, Herr R, et al (2014). A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 111(1): 23-45.
186. Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C (2008). Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 62(9): 1079-1089.
187. Hoang MT, Defina LF, Willis BL, Leonard DS, Weiner MF, Brown ES (2011). Association between low serum 25-hydroxyvitamin D and depression in a large sample of healthy adults: the Cooper Center longitudinal study. *Mayo Clin Proc* 86(11): 1050–1055.
188. Holick MF (1995). Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 61(3 Suppl): 638S-645S.
189. Holick MF (2003). Vitamin D deficiency: what a pain it is. *Mayo Clinic proceedings* 78(12): 1457-1459.
190. Holick MF (2006). The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. *Curr Osteoporos Rep* 4(3): 96-102.
191. Holick MF (2007). Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drug Aging* 24(12): 1017–1029.
192. Holick MF (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3): 266-281.
193. Holick MF (2013). Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults. *N Engl J Med* 369(21): 2047-2108.
194. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7): 1911-1930.
195. Holick MF, Siris ES, Binkley N, et al (2005). Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90(6): 3215–3224.

196. Hollander D, Tarnawski H (1984). Influence of aging on vitamin D absorption and unstirred water layer dimensions in the rat. *J Lab Clin Med* 103(3): 462-469.
197. Holmgaard DB, Mygind LH, Titlestad IL, et al (2013). Serum vitamin D in patients with chronic obstructive lung disease does not correlate with mortality – results from a 10-year prospective cohort study. *PLoS One* 8(1): e53670.
198. Hoogendijk WJ, Lips P, Dik MG, Deeg DJ, Beekman AT, Penninx BW (2008). Depression is associated with decreased 25-hydroxyvitamin D and increased parathyroid hormone levels in older adults. *Arch Gen Psychiatr* 65(5): 508-512.
199. Horst-Sikorska W, Ignaszak-Szczepaniak M (2011). The role of anorexia nervosa in secondary osteoporosis development with the risk for low energy fractures Mehler and Brown *Journal of Eating Disorders* 62(1): 45-47.
200. Hossein-nezhad A, Holick MF (2013). Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 88(7): 720-755.
201. Houillier P (2014). Mechanisms and regulation of renal magnesium transport. *Annu Rev Physiol* 76: 411-430.
202. Hovsepian S, Amini M, Aminorroaya A, Amini P, Iraj B (2011). Prevalence of Vitamin D Deficiency among Adult Population of Isfahan City, Iran. *J Health Popul Nutr* 29(2): 149–155.
203. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358(9292): 1500–1503.
204. Hyppönen E, Power C (2007). Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 85(3): 860-868.
205. Imerci A, Canbek U, Haghari S, Sürer L, Kocak M (2015). Idiopathic juvenile osteoporosis: A case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep* 9: 127-129.

206. International Society for Clinical Densitometry (ISCD) Skeletal Health (2015). Available at: <http://www.iscd.org/official-positions/2015-iscd-official-positions-adult/> (Last accessed 05.02.2018.).
207. International Society for Clinical Densitometry. Adult Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry – Indications for Bone Mineral Density (BMD) Testing (2015). Available at: <http://www.iscd.org/official-positions/2015-iscd-official-positions-adult> (Last accessed 05.02.2018.)
208. IOM (Institute of Medicine) (2010). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Available at: <http://www.iom.edu/~media/Files/Report%20Files/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-VitamiD/Vitamin%20D%20and%20Calcium%202010%20Report%20Brief.pdf> (Last accessed: 02.04. 2018.).
209. Iqbal M (2000). Osteoporosis: Epidemiology, diagnosis, and treatment South Med J 93(1): 2-18.
210. Irani M, Merhi Z (2014). Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. Fertil Steril 102(2): 460-468.
211. Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, et al (1992). Hypervitaminosis D associated with drinking milk. N Engl J Med 326(18): 1173-1177.
212. Jain RK, Vokes T (2017). Dual-energy X-ray Absorptiometry. J Clin Densitom 20(3): 291-303.
213. Jankovic SM (2011). Farmakologija i toksikologija. 3 izdanje. Kragujevac: Medicinski fakultet u Kragujvcu.
214. Jankovic SM (2016). Prirucnik iz farmakologije I toksikologije. Peto dopunjeno izdanje. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka u Kragujevcu.
215. Jelic Dj, Stefanovic D, Petronijevic M, Jelic M (2008). Zasto je dvostruka apsorciometrija X zraka zlatni standard u dijagnostici osteoporoze. Vojnosanit Pregl 65(12): 919–922.

216. Joe S, Woolley ME, Brown GK, Ghahramanlou-Holloway M, Beck AT (2008). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory-II in low income AfricanAmerican suicide attempters. *J Pers Assess* 90(5): 521–523.
217. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D *J Lipid* 55(1): 13-31.
218. Jorde R, Waterloo K, Saleh F, Haug E, Svartberg J (2006). Neuropsychological function in relation to serum parathyroid hormone and serum 25- hydroxyvitamin D levels. The Tromso study. *J Neurol* 253(4): 464-470.
219. Jukic AM, Upson K, Harmon QE, Baird DD (2016). Increasing serum 25-hydroxyvitamin D is associated with reduced odds of long menstrual cycles in a cross-sectional study of African American women. *Fertil Steril* 106(1): 172-179.
220. Jukic AMZ, Wilcox AJ, McConnaughey DR, Weinberg CR, Steiner AZ (2018). 25-Hydroxyvitamin D and Long Menstrual Cycles in a Prospective Cohort Study. *Epidemiology* 29(3): 388-396.
221. Kalra S, Aggarwal S (2015). Vitamin D deficiency: Diagnosis and patient centred management. *J Pak Med Assoc* 65(5): 569-573.
222. Kamen DL, Tangpricha V (2010). Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)* 88(5): 441-550.
223. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E (2008). FRAX (TM) and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporosis Int* 19(4): 385-397.
224. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY (2013). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 24(1): 23-57.
225. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R (1993). A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent)

- diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 36(10): 883– 892.
226. Kavarić S, Vuksanović M, Božović D, Jovanović M, Jeremić V, Radojčić Z, Pečić S, Popović V (2013). Body weight and waist circumference as predictors of vitamin D deficiency in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Vojnosanit Pregl* 70(2): 163-169.
227. Kawaguchi R, Zhong M, Kassai M, et al (2015). Vitamin A transport mechanism of the multitransmembrane cell-surface receptor STRA6. *Membranes* 5(3): 425–453.
228. Keevil B (2012). Does the presence of 3-epi-25OHD₃ affect the routine measurement of vitamin D using liquid chromatography tandem mass spectrometry? *Clin Chem Lab Med* 50(1): 181–183.
229. Kemmler W, Häberle L, von Stengel S (2013). Effects of exercise on fracture reduction in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 24(7): 1937-1950.
230. Kennedy DA, Cooley K, Skidmore B, Fritz H, Campbell T, Seely D (2013). Vitamin d: pharmacokinetics and safety when used in conjunction with the pharmaceutical drugs used in cancer patients: a systematic review. *Cancers* 5(1): 255-280.
231. Kesby JP, Eyles DW, Burne TH, McGrath JJ (2011). The effects of vitamin D on brain development and adult brain function. *Mol Cell Endocrinol* 347(1-2): 121-127.
232. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62(6): 593–602.
233. Khanal R, Nemere I (2007). Membrane receptors for vitamin D metabolites. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 17(1): 31–47.

234. Khashayar P, Aghaei Meybodi HR, Rezai Hemami M, Keshtkar A, Dimai HP, Larijani B (2016). Vitamin D status and its relationship with bone mineral density in a healthy Iranian population. *Rev Bras Ortop* 51(4): 454-458.
235. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R (2008). Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 45(4): 339-414.
236. Kimball S, Vieth R (2008). Self-prescribed high-dose vitamin D3: effects on biochemical parameters in two men. *Ann Clin Biochem* 45(1): 106-110.
237. Kleinknecht RA, Thorndike RM, Walls MM (1996). Factorial dimensions and correlates of blood, injury, injection and related medical fears: Cross validation of the medical fear survey. *Behav Res Ther* 34(4): 323–331.
238. Klibanski A, Adams-Campbell L, Bassford T, et al (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285(6): 785-795.
239. Kocyigit H, Gulseren S, Erol A, Hizli N, Memis A (2003). The reliability and validity of the Turkish version of Quality of Life Questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO). *Clin Rheumatol* 22(1): 18–23.
240. Kojima M, Furukawa TA, Takahashi H, Kawai M, Nagay T, Tokudome S (2002). Cross-cultural validation of the Beck Depression Inventory-II in Japan. *Psychiatry Res* 110(3): 291–299.
241. Kostoglou-Athanassiou I, Athanassiou P, Lyraki A, Raftakis I, Antoniadis C (2012). Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Ther Adv Endocrinol Metab* 3(6): 181-187.
242. Kotta S, Gadhvi D, Jakeways N, et al (2015). “Test me and treat me”-attitudes to vitamin D deficiency and supplementation: a qualitative study. *BMJ Open* 14: 5(7).
243. Koutkia P, Chen TC, Holick MF (2001). Vitamin D intoxication associated with an over-the-counter supplement. *N Engl J Med* 345(1): 66-67.

244. Kovesdy CP, Quarles LD (2013). Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transplant* 28(9): 2228-2236.
245. Kramer JH, Mak IT, Phillips TM, Weglicki WB (2003). Dietary magnesium intake influences circulating pro-inflammatory neuropeptide levels and loss of myocardial tolerance to postischemic stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(6): 665-673.
246. Kuchuk NO, van Schoor NM, Pluijm SM, Chines A, Lips P (2009). Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: Global perspective. *J Bone Miner Res* 24(4): 693–701.
247. Kumar G, Steer RA, Teitelman KB & Villacis L (2002). Effectiveness of Beck Depression Inventory-II subscales in screening for major depressive disorders in adolescent psychiatric inpatients. *Assessment* 9: 164–170.
248. Kunisaki KM, Niewoehner DE, Singh RJ, Connett JE (2011). Vitamin D status and longitudinal lung function decline in the Lung Health Study. *Eur. Respir. J* 37(2): 238–243.
249. Kwasky AN, Groh CJ (2012). Vitamin D and depression: is there a relationship in young women? *J Am Psychiatr Nurses Assoc* 18(4): 236-243.
250. Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg F, Hexeberg S, Moan J (2009). The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res* 29(9): 3713-3720.
251. Lai BM, Tsang SW, Lam CL, Kung AW (2010). Validation of the quality of life questionnaire of the European foundation for osteoporosis (QUALEFFO-31) in Chinese. *Clin Rheumatol* 29(9): 965–972.
252. Lai PSM, Chua SS, Chan SP, Low WY (2008). Validation of the English version of the quality of life questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO) in Malaysia. *Int J Rheum Dis* 11(4): 421-429.

253. Lakić D, Tadić I, Vujašinović-Stupar N, Tasić Lj (2009). Zdravlje žena u Srbiji – promocija zdravlja, prevencija bolesti i terapija. Osteoporoza i farmakoeкономski aspekti. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerzitet u Beogradu.
254. Laktasić-Zerjavić N, Korsić M, Crncević-Orlić Z, Anić B (2011). Vitamin D: vitamin from the past and hormone of the future. *Lijec Vjesn* 133(5-6): 194-204.
255. Laktasić-Zerjavić N, Rukavina K, Babić-Naglić D, Curković B, Anić B, Soldo-Juresa D (2013). Relationship between vitamin D status and bone mineral density in Croatian postmenopausal women. *Reumatizam* 60(1): 8-13.
256. Lam MH, Chau SW, Wing YK (2009). High prevalence of hypokalemia in acute psychiatric inpatients. *Gen Hosp Psychiatry* 31(3): 262-265.
257. Langdahl BL (2017). Osteoporosis in premenopausal women. *Curr Opin Rheumatol* 29(4): 410-415.
258. Lansdowne AT, Provost SC (1998). Vitamin D3 enhances mood in healthy subjects during winter. *Psychopharmacology (Berl)* 135(4): 319-323.
259. Lasaitė L and Krasauskienė A (2009). Psychological state, quality of life, and body composition in postmenopausal women with osteoporosis in Lithuania. *Arch Osteoporos* 4(1-2): 85-90.
260. Le Pen C, Maurel F, Breart G, et al (2000). The long-term effectiveness of preventive strategies for osteoporosis in postmenopausal women: a modeling approach. *Osteoporos Int* 11(6): 524–532.
261. LeBlanc ES, Perrin N, Johnson JD, Jr Ballatore A, Hillier T (2013). Over-the-counter and compounded vitamin D: is potency what we expect? *JAMA Intern Med* 173(7): 585-586.
262. Legrand E (2003). Bone densitometry. In: Treves PR, editor. *Osteoarthritis and Osteoporosis. What is the relationship?* Conrbevoie: Expanscience laboratories 113–126.

263. Leidig-Bruckner G, Raue F, Frank-Raue K (2012). Secondary osteoporosis – relevant clinical characteristics in diagnosis and therapy. *Dtsch Med Wochenschr* 137(7): 326-332.
264. Lerchbaum E (2014). Vitamin D and menopause--a narrative review. *Maturitas* 79(1): 3-7.
265. Lerchbaum E, Rabe T (2014). Vitamin D and female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 26(3): 145-150.
266. Lesic A, Jarebinski M, Pekmezovic T, Bumbasirevic M, Spasovski D, Atkinson HDE (2007). Epidemiology of hip fractures in Belgrade, Serbia Montenegro, 1990-2000. *Arch Orthop Trauma Surg* 127(3): 179-183.
267. Leslie WD, Lix LM, Finlayson GS, et al (2013). Direct healthcare costs for 5 years postfracture in Canada: a long-term population-based assessment. *Osteoporos Int* 24: 1697–1705.
268. Leth-Møller KB, Hansen AH, Torstensson M, et al (2016). Antidepressants and the risk of hyponatremia: a Danish register-based population study. *BMJ Open* 6(5): e011200.
269. Leventis P, Patel S (2008). Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47(11): 1617–1621.
270. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, et al (2008). International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone* 43(6): 1115-1121.
271. Lewis S, Lucas RM, Halliday J, et al (2010). Vitamin D deficiency and pregnancy: from preconception to birth. *Mol Nutr Food Res* 54(8): 1092–102.
272. Li G, Mbuagbaw L, Samaan Z, et al (2014). Efficacy of vitamin D supplementation in depression in adults: A systematic review. *J Clin Endocrinol Metab* 99(3): 757–767.

273. Li SS, Gao LH, Zhang XY, et al (2016). Genetically Low Vitamin D Levels, Bone Mineral Density, and Bone Metabolism Markers: a Mendelian Randomisation Study 14(6): 33202.
274. Lindsay R, Silverman SL, Cooper C, et al (2001). Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *Jama* 285(3): 320–323
275. Lips P (2007). Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements. *J Bone Miner Res* 22(11): 1668-1671.
276. Lips P, Cooper C, Agnusdei D, et al (1997). Quality of life as outcome in the treatment of osteoporosis: The development of a questionnaire for quality of life by the European foundation for osteoporosis. *Osteoporosis Int* 7(1): 36-38.
277. Lips P, Cooper C, Agnusdei D, Caulin F, Egger P, Johnell O, et al (1999). Quality of life in patients with vertebral fractures: Validation of the quality of life questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO). *Osteoporosis Int* 10(2): 150-160.
278. Littorin B, Blom P, Scholin A, et al (2006). Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 49(12): 2847–2852.
279. Liu H, Yao K, Zhang W, Zhou J, Wu T, He C (2012). Coffee consumption and risk of fractures: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 8(5): 776-783.
280. Liu W, Chen Y, Golan MA, et al (2013). Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *J Clin Invest* 123(9): 3983-3996.
281. Looker AC, Gunter EW (1998). Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 339(5): 344-345.
282. Lunt M, O'Neill TW, Felsenberg D, et al (2003). Characteristics of a prevalent vertebral deformity predict subsequent vertebral fracture: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Bone* 33(4): 505-513.

283. Maddaloni E, Lessan N, Al Tikriti A, Buzzetti R, Pozzilli P, Barakat MT (2015). Latent autoimmune diabetes in adults in the United Arab emirates: clinical features and factors related to insulin-requirement. *PLoS One* 10: e0131837.
284. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Shafaei AR, Karimi F, Madani FS, Larijani B(2007). Vitamin D status in mothers and their newborns in Iran. *BMC Pregnancy Childbirth* (12)7: 1.
285. Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT (2003). Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol* 134(1-2): 128-132.
286. Mailhot G (2012). Vitamin D bioavailability in cystic fibrosis: a cause for concern? *Nutr Rev* 70(5): 280-293.
287. Makariou S, Liberopoulos E, Elisaf M, Challa A (2011). Novel roles of vitamin D in disease: what is new in 2011? *Eur J Inter Med* 22: 355-362.
288. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF (1998). Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 351(9105): 805-806.
289. Mannesse CK, van Puijenbroek EP, Jansen PA, van Marum RJ, Souverein PC, Egberts TC (2010). Hyponatraemia as an adverse drug reaction of antipsychotic drugs: a case-control study in Vigibase. *Drug Saf* 33(7): 569-578.
290. Manousaki D, Dudding T, Haworth S, et al (2017). Low-frequency synonymous coding variation in CYP2R1 has large effects on vitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 101(2): 227–238.
291. Faienza MF, Ventura A, Marzano F, Cavallo L (2013). Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. *Clin Dev Immunol*. 2013: 575936.
292. Marshall D, Johnell O, Wedel H (1996). Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 312(7041): 1254-1259.

293. Martineau AR, Cates CJ, Urashima M, et al (2016). Vitamin D for the management of asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 9: CD011511.
294. Matovic S, Milovanovic JR, Dajic K, Stojkovic A, Jankovic SM (2018). Population pharmacokinetics of 25-hydroxy vitamin D in children with asthma. *Int J Clin Pharmacol Ther* 56(4): 169-176.
295. Matthis C, Weber U, O'Neill TW, Raspe H (1998). Health impact associated with vertebral deformities: Results from the European vertebral osteoporosis study (EVOS). *Osteoporosis Int* 8(4): 364-372.
296. McGrath J, Saari K, Hakko H, Jokelainen J, Jones P, Jarvelin MR, et al (2004). Vitamin D supplementation during the first year of life and risk of schizophrenia: a Finnish birth cohort study. *Schizophr Res* 67(2-3): 237-245.
297. Meckel K, Li YC, Lim J, et al (2016). Serum 25-hydroxyvitamin D concentration is inversely associated with mucosal inflammation in patients with ulcerative colitis. *Am J Clin Nutr* 104(1): 113-120.
298. Mehta KM, Simonsick EM, Penninx BWJH, et al (2003). Prevalence and correlates of anxiety symptoms in well functioning older adults: findings from the health aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc* 51(4): 499–504.
299. Meier M (2007). Chromsystems diagnostics by HPLC & LC-MS/MS. Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Munich 1-18.
300. Meiyanti (2010). Epidemiology of osteoporosis in postmenopausal women aged 47 to 60 years. *Universa medicina* 3: 169-176.
301. Meng-Xia Ji and Qi Yu (2015). Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis Transl Med* 1(1): 9-13.
302. Merlino L, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG (2004). Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis. Results from the Iowa Women's Health Study. *Arthr Rheumat* 50(1): 72–77.

303. Messina C, Bandirali M, Sconfienza LM, et al (2015). Prevalence and type of errors in dual-energy x-ray absorptiometry. *Eur Radiol* 25(5): 1504-1511.
304. Messina C, Sconfienza L, Bandirali M, Guglielmi G, Ulivieri F (2016). Adult Dual-Energy X-ray Absorptiometry in Clinical Practice: How I Report it. *Semin Musculoskelet Radiol* 20(3): 246-253.
305. Miller PD (2016). Management of severe osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 17(4): 473-488.
306. Milovanovic DR, Janjic V, Zornic N, Djukic Dejanovic S, Jankovic SM (2010). Risperidone-associated hypocalcemia. *Am J Psychiatry* 167(12): 1533-1534.
307. Milovanovic JR (2009). Antiepileptici i populaciona farmakokinetika. Beograd: Zaduzbina Andrejevic.
308. Milovanovic JR (2009). Terapijski monitoring lekova. *Rac terapija* 1: 11-14.
309. Milovanović JR, Janković SM (2005). Populaciona farmakokinetika. *Vojnosanit Pregl* 62(11): 847–850.
310. Milovanovic JR, Jankovic SM (2009). Population pharmacokinetics of lamotrigine in patients with epilepsy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47(12): 752-60.
311. Milovanovic JR, Jankovic SM (2011). Factors influencing carbamazepine pharmacokinetics in children and adults: population pharmacokinetic analysis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 49(7): 428-436.
312. Milovanovic JR, Jankovic SM (2013). Population pharmacokinetic of antiepileptic drugs in different populations. *CEJM* 8 (4): 383-391.
313. Milovanovic O (2017). Vitamin D deficiency and its importance – a global problem of today, realistic or not? *Serb J Exp Clin Res* 18(1): 3-12.
314. Milovanovic O, Milovanovic JR, Djukic A, et al (2015). Population pharmacokinetics of 25-hydroxyvitamin D in healthy young adults. *Int J Clin Pharmacol Ther* 53(1): 1-8.

315. Milovanovic OZ, Milovanovic JR, Djukic A, et al (2015). Variation in vitamin D plasma levels according to study load of biomedical students. *Acta Pol Pharm* 72(1): 213-215.
316. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, et al (2009). Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 20(11): 1807-1820.
317. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M (2009). Seasonal variation of diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med* 26(7): 673–678.
318. Monteleone P, Mascagni G, Giannini A, Genazzani AR, Simoncini T (2018). Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications. *Nat Rev Endocrinol* 14(4): 199-215.
319. Morgan SL, Prater GL (2017). Quality in dual-energy X-ray absorptiometry scans. *Bone* 104: 13-28.
320. Moukayed M, Grant WB (2017). The roles of UVB and vitamin D in reducing risk of cancer incidence and mortality: a review of the epidemiology, clinical trials, and mechanisms. *Rev Endocr Metab Disord* 18(2): 167–182.
321. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296(23): 2832-2838.
322. Murphy L, Riley D, Rodgers J, Plank S, Lehman S, Duryea B (2005). Effects of tai chi on balance, mobility, and strength among older persons participating in an osteoporosis prevention and education program. *Explore (NY)* 1(3): 192–3.
323. Nair-Shalliker V, Clements M, Fenech M, Armstrong BK (2013). Personal sun exposure and serum 25-hydroxy vitamin D concentrations. *Photochem Photobiol* 89(1): 208-214.
324. Nanda K, Bastian LA, Hasselblad V, Simel DL (1999). Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a metaanalysis. *Obstet Gynecol* 93: 880–888.

325. National Institute for Clinical Excellence. Bisphosphonates (alendronate, etidronate, risedronate), selective oestrogen receptor modulators (raloxifene) and parathyroid hormone (teriparatide) for the secondary prevention of osteoporotic fragility fractures in postmenopausal women. (2005). Available at: <http://www.nice.org.uk/TA087guidance> (Last assessed: 22.05.2018.).
326. National Osteoporosis Foundation (2013) Health Professional's Guide to Rehabilitation of the Patient with Osteoporosis. Available at: nof.org/files/nof/public/content/file/.../523.pdf (Last assessed: 01.03. 2018.).
327. National Osteoporosis Foundation. Physicians Guide to prevention and treatment of osteoporosis; 2003. Available at: [http://www.nof.org/physguide/inside cover.htm](http://www.nof.org/physguide/inside%20cover.htm) (Last assessed: 11.03. 2018.).
328. National Osteoporosis Guiding Group (2010). Guideline for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and men from the age of 50 years in the UK. Available at: www.sheffield.ac.uk/NOGG (Last assessed: 15.03. 2018.).
329. National osteoporosis society (2014). Scans and tests and osteoporosis. Available at: <https://nos.org.uk/media/98047/61591-nos-scans-tests-llet.pdf>. (Last assessed: 01.05.2018.),
330. Nellis JC, Tufano RP, Gourin CG (2016). Association between magnesium disorders and hypocalcemia following thyroidectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 155(3): 402-410.
331. Neumeister A, Konstantinidis A, Praschak-Rieder N, et al (2001). Monoaminergic function in the pathogenesis of seasonal affective disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 4(4): 409e20.
332. Nguyen TV, Center JR, Pocock NA, Eisman JA (2004). Limited utility of clinical indices for the prediction of symptomatic fracture risk in postmenopausal women. *Osteoporosis Int* 15(1): 49-55.

333. Nikolic VN, Jankovic SM, Deljanin-Ilic M, et al (2018). Population Pharmacokinetic Analysis of Bisoprolol in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 43(1): 35-44.
334. Nikolic VN, Jankovic SM, Deljanin-Ilic M, et al. Population Pharmacokinetics of Bisoprolol in Hemodialysis Patients with Hypertension (2016). *Pharmacology* 97 (3-4): 134-137.
335. Nnoaham KE, Clarke A (2008). Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 37(1): 113–119.
336. Novovic Z, Mihic Lj, Tomovic S, Jovanovic V, Biro M (2011). Psihometrijske karakteristike Bekove skale depresivnosti na uzorku studenata u Srbiji. *Psihologija* 44(3): 225-243.
337. Olatunji BO, Ebesutani C, Sawchuk CN, McKay D, Lohr JM, Kleinknecht RA (2012). Development and initial validation of the medical fear survey-short version. *Assessment* 19(3): 318-336.
338. Oleksik A, Lips P, Dawson A, et al (2000). Healthrelated quality of life in postmenopausal women with low BMD with or without prevalent vertebral fractures. *J Bone Miner Res* 15(7): 1384-1392.
339. Oleksik AM, Ewing S, Shen W, van Schoor NM, Lips P (2005). Impact of incident vertebral fractures on health related quality of life (HRQOL) in postmenopausal women with prevalent vertebral fractures. *Osteoporosis Int* 16(8): 861-870.
340. O'Neill TW, Cockerill W, Matthis C, et al (2004). Back pain, disability, and radiographic vertebral fracture in European women: a prospective study. *Osteoporosis Int* 15(9): 760-765.
341. Orsini LS, Rousculp MD, Long SR, Wang S (2005). Health care utilization and expenditures in the United States: a study of osteoporosis-related fractures. *Osteoporos Int* 16(4): 359-371.

342. Ozer S, Ulusahin A, Ulusoy S, et al (2004). Is vitamin D hypothesis for schizophrenia valid? Independent segregation of psychosis in a family with vitamin-D-dependent rickets type IIA. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(2): 255-266.
343. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, et al (2015). Seasonal variation in month of diagnosis in children with type 1 diabetes registered in 23 European centers during 1989–2008: little short-term influence of sunshine hours or average temperature. *Pediatr Diabetes* 16(8): 573–580.
344. Perez ER, Clark P, Wachter NH, Cardiel MH, Garcia MDD (2008). Cultural adaptation and validation of the quality of life questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO) in a Mexican population. *Clin Rheumatol* 27(2): 151–161.
345. Pettifor JM, Moodley GP, Hough FS, et al (1996). The effect of season and latitude on in vitro vitamin D formation by sunlight in South Africa. *South Afr Med J* 86(10): 1270-1272.
346. Pfeffer PE, Hawrylowicz CM (2012). Vitamin D and lung disease. *Thorax* 67(11): 1018–1020.
347. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC (2013). Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 6(2): 81-116.
348. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR (2009). Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 6(10): 621-630.
349. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, et al (2013). Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. *Autoimmun Rev* 12(10): 976–989.

350. Plum LA, DeLuca HF (2010). Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 9(12): 941–955.
351. Pozzilli P, Manfrini S, Crino A, et al (2005). Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 37(11): 680–683.
352. Purdue-Smithe AC, Whitcomb BW, Szegda KL, et al (2017). Vitamin D and calcium intake and risk of early menopause. *Am J Clin Nutr* 105(6): 1493-1501.
353. Quamme GA, de Rouffignac C (2000). Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front Biosci* 5: D694-711.
354. Quraishi SA, Camargo CA Jr, Manson JE (2016). Low vitamin D status in Europe: moving from evidence to sound public health policies. *Am J Clin Nutr* 103(4): 957-958.
355. Radlovic N, Mladenovic M, Simic D, Radlovic P (2012). Vitamin D in the light of current knowledge. *Srp Arh Celok Lek* 140(1-2): 110-114.
356. Rapuri B, Gallagher C, Kinyamu K, Ryschon K (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr* 74(5): 694–700.
357. Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z (2007). Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)2D3 stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5): 368-371.
358. Rashidi B, Haghollahi F, Shariat M, Zayerii F (2009). The effects of calcium-vitamin D and metformin on polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48(2): 142-147.
359. Razzaque MS (2008). FGF23-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: is Klotho an essential player? *Am J Physiol Renal Physiol* 296(3): 470-476.

360. Razzaque MS (2011). Phosphate toxicity: new insights into an old problem. *Clin Sci (Lond)* 120(3): 91-97.
361. Razzaque MS (2014). Bone-kidney axis in systemic phosphate turnover. *Arch Biochem Biophys* 561: 154-158.
362. Republicka strucna komisija za izradu i implementaciju vodica u klinickoj praksi (2004). Osteoporoza, Nacionalni vodici za lekare u primarnoj zdravstvenoj zastiti. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
363. Reusch JE, Begum N, Sussman KE, Draznin B (1991). Regulation of GLUT-4 phosphorylation by intracellular calcium in adipocytes. *Endocrinology* 129(6): 3269–3273.
364. Rhead B, Bäärnhielm M, Gianfrancesco M, et al (2016). Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurol Genet* 2(5): e97.
365. Rizzoli R, Cooper C, Reginster JY, et al (2012). Antidepressant medications and osteoporosis. *Bone* 51(3): 606-613.
366. Rooney MR, Harnack L, Michos ED, Ogilvie RP, Sempos CT, Lutsey PL (2017). Trends in Use of High-Dose Vitamin D Supplements Exceeding 1000 or 4000 International Units Daily. *JAMA* 317(23): 2448-2450.
367. Ross A, Manson J, Abrams S, et al (2011). The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *J Clin Endocrinol Metab* 96(1): 53-58.
368. Rostom S, Allali F, Bahiri R, Abouqal R, Hajjaj-Hassouni N (2011). Psychometric properties evaluation of the quality of life Questionnaire of the European foundation for Osteoporosis in Arabic population. *Rheumatol Int* 32(7): 2037-2049.
369. Sambrook P, Cooper C (2006). Osteoporosis. *Lancet* 367(9527): 2010-2018.

370. Sánchez-Riera L, Wilson N, Kamalaraj N, et al (2010). Osteoporosis and fragility fractures. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(6): 793-810.
371. Sanders KM, Stuart AL, Williamson EJ, et al (2010). Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial. *JAMA* 303(23): 1815-1822.
372. Santoro N (2016). Perimenopause: From Research to Practice. *J Womens Health (Larchmt)* 25(4): 332-339.
373. Saraff V, Shaw N (2016). Sunshine and vitamin D. *Arch Dis Child* 101(2): 190-192.
374. Satia MC, Mukim AG, Tibrewala KD, Bhavsar MS (2015). A randomized two way cross over study for comparison of absorption of vitamin D3 buccal spray and soft gelatin capsule formulation in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Nutr J* 14: 114.
375. Scarabin PY, Oger E, Plu-Bureau G (2003). EStrogen and THromboEmbolism Risk Study Group. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet* 362(9382): 428-32.
376. Seeman E, Compston J, Adachi J, et al (2007). Non-compliance: the Achilles' heel of anti-fracture efficacy. *Osteoporosis Int* 18(6): 711-719.
377. Segal DL, Coolidge F, Cahill BS, O'Riley AA (2008). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory-II (BDI-II) among community-dwelling older adults. *Behavi Modif* 32(1): 3-20.
378. Sempos CT, Durazo-Arvizu RA, Binkley N, Jones NJ, Merkel JM, Carter GD (2016). Developing vitamin D dietary guidelines and the lack of 25-hydroxyvitamin D assay standardization: the ever-present past. *J Steroid Biochem Mol Biol* 164: 115-119.
379. Seo JW, Park TJ (2008). Magnesium metabolism. *Electrolyte Blood Press* 6(2): 86-95.

380. Shaffer JA, Edmondson D, Wasson LT, et al (2014). Vitamin D supplementation for depressive symptoms: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Psychosom Med* 76(3): 190-196.
381. Shen L, Ji HF (2015). Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J* 14: 76.
382. Shimoyamada A, Tomiyama S, Shimizu M, Yamamoto K, Kunii S, Yamada S (1997). In vivo metabolism of 24R,25-dihydroxyvitamin D₃: structure of its major bile metabolite. *Biochim Biophys Acta* 1346(2): 147-157.
383. Shin DY, Kim KJ, Kim D, Hwang S, Lee EJ (2014). Low serum vitamin D is associated with anti-thyroid peroxidase antibody in autoimmune thyroiditis. *Yonsei Med. J* 55(2): 476-481.
384. Singh R (2008). Are clinical laboratories prepared for accurate testing of 25-hydroxyvitamin D? *Clin Chem* 54(1): 221– 331.
385. Siris ES, Brenneman SK, Barrett-Connor E, et al (2006). The effect of age and bone mineral density on the absolute, excess, and relative risk of fracture in postmenopausal women aged 50–99: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA). *Osteoporos Int* 17(4): 565–574.
386. Siris ES, Brenneman SK, Miller PD, et al (2004). Predictive value of low BMD for 1-year fracture outcomes is similar for postmenopausal women ages 50–64 and 65 and older: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA). *J Bone Miner Res* 19(8): 1215–1220.
387. Sloan DM, Marx BP, Bradley MM, Strauss CC, Lang PJ, Cuthbert BC (2002). Examining the High-End Specificity of the Beck Depression Inventory Using an Anxiety Sample. *J Affect Disord* 26: 719–772.
388. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, et al (2010). Safety and T cell modulating effects of high dose vitamin D₃ supplementation in multiple sclerosis. *PLoS One* 5(12): e15235.

389. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G, Group ES (2007). Worldwide childhood type 1 diabetes incidence – what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes* 8 (suppl 6): 6–14.
390. Song C, Wang H (2011). Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(3): 760–768.
391. Song GG, Bae SC, Lee YH (2012). Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 31(12): 1733-1739.
392. Song M, Wu K, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci EL (2014). Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of colorectal cancer after adjusting for inflammatory markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(10): 2175-2180.
393. Song Y, Wang L, Pittas AG, et al (2013). Blood 25-hydroxy vitamin D levels and incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 36(5): 1422–1428.
394. Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, et al (2010). Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev* 9(11): 709–715.
395. Spedding S (2014). Vitamin D and depression: A systematic review and metaanalysis comparing studies with and without biological flaws. *Nutrients* 6(4): 1501–1518.
396. Spiro A, Buttriss JL (2014) Vitamin D. An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull* 39(4): 322-350.
397. Stamp TC, Haddad JG, Twigg CA (1977). Comparison of oral 25-hydroxycholecalciferol, vitamin D, and ultraviolet light as determinants of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Lancet* 1(8026): 1341-1343.

398. Steer RA, Kumar G, Ranieri WF & Beck AT (1998). Use of the Beck Depression Inventory-II with adolescent depressed outpatients. *J Psychopathol Behav Assess* 20: 127–137.
399. Steer RA, Ball R, Ranieri WF, Beck AT (1997). Further Evidence for the construct validity of the Beck Depression Inventory-II with Psychiatric Outpatients. *Psychol Rep* 80(2): 443–446.
400. Stefanovic D, Zecevic D, Petronijevic P (2008). *Vitamin D i analozi*. Beograd: Actavis Trading Ltd.
401. Stege H, Schwarz T (2017). Vitamin D and UV protection. *Hautarzt* 68(5): 364-367.
402. Stevenson M, Jones ML, De Nigris E, Brewer N, Davis S, Oakley J (2005). A systematic review and economic evaluation of alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene 117 and teriparatide for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Health Technol Assess* 9(22): 1-160.
403. Storch EA, Roberti JW & Roth DA (2004). Factor structure, convergent validity, and reliability of the Beck Depression Inventory Second Edition in a sample of college students. *Depress Anxiety* 19(3): 187–189.
404. Stumpf WE, Privette TH (1989). Light, vitamin D and psychiatry. Role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 (soltriol) in etiology and therapy of seasonal affective disorder and other mental processes. *Psychopharmacology* 97(3): 285-294.
405. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157(10): 1552–1562.
406. Sun YQ, Langhammer A, Skorpen F, Chen Y, Mai XM (2017). Serum 25-hydroxyvitamin D level, chronic diseases and all-cause mortality in a population-based prospective cohort: the HUNT Study. *Norway BMJ Open* 7(6): e017256.
407. Sundström P, Salzer J (2015). Vitamin D and multiple sclerosis—from epidemiology to prevention. *Acta Neurol Scand Suppl* 132(199): 56-61.

408. Sutherland A, Izurieta H, Ball R (2008). Syncope after vaccination—United States, January 2005–July 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57(17): 457–460.
409. Svejme O, Ahlborg HG, Nilsson JÅ, Karlsson MK (2012). Early menopause and risk of osteoporosis, fracture and mortality: a 34-year prospective observational study in 390 women. *BJOG* 119(7): 810-816.
410. Symmons DP (2002). Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16(5): 707–722.
411. Tadic I, Vujasinovic Stupar N, Tasic Lj, et al (2012). Validation of the osteoporosis quality of life questionnaire QUALEFFO-41 for the Serbian population. *Health Qual Life Out* 10: 74.
412. Tajeu GS, Delzell E, Smith W, et al (2014). Death, debility, and destitution following hip fracture. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69(3): 346–353.
413. Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JP (2014). Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ* 348: g2035.
414. Thompson GR, Lewis B, Booth CC (1966). Absorption of vitamin D₃-³H in control subjects and patients with intestinal malabsorption. *J Clin Invest* 45(1): 94-102.
415. Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos A, Sarrel P, Bilezikian JP (1999). Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids* 64(6): 430-435.
416. Tosevski DL, Gajic SD, Milovancevic MP (2012). State of psychiatry in Serbia—problems, advances and perspectives. *Int Rev Psychiatry* 24(4): 341-346.
417. Tosi LL, Gliklich R, Kannan K, Koval KJ (2008). The American Orthopaedic Association’s “Own the Bone” initiative to prevent secondary fractures. *J Bone Joint Surg Am* 90(1): 163-173.

418. Tosteson AN, Hammond CS (2002). Quality-of-life assessment in osteoporosis - Health-status and preference-based measures. *Pharmacoeconomics* 20(5): 289–303.
419. Tosteson AN, Melton LJ, Dawson-Hughes B, et al (2008). Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. *Osteoporos Int* 19(4): 437-447.
420. Touyz RM (2004). Magnesium in clinical medicine. *Front Biosci* 9: 1278-1293.
421. Tsiaras WG, Weinstock MA (2011). Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 91(2): 115-124.
422. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page. Available at: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. (Last accessed 25.04.2018.)
423. Ugurlu U, Nayki U, Nayki C, Ulug P, Kulhan M, Yildirim Y (2016). Assessment of smoking for low bone mineral density in postmenopausal Turkish women. *Wien Klin Wochenschr* 128(3-4): 114-119.
424. Uitterlinden A, Fang Y, Van Meurs J, Van Leeuwen J, Pols H (2004). Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90(1-5): 187-193.
425. Umhau JC, George DT, Heaney RP, et al (2013). Low vitamin D status and suicide: a case-control study of active duty military service members. *PLoS One* 8(1): e51543
426. Vainionpää A, Korpelainen R, Leppäluoto J, Jämsä T (2005). Effects of high-impact exercise on bone mineral density: a randomized controlled trial in premenopausal women. *Osteoporos Int* 16(2): 191-197.
427. Valipour G, Saneei P, Esmailzadeh A (2014). Serum vitamin D levels in relation to schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Clin Endocrinol Metab* 99: 3863-3872.

428. Van der V, Brouwers J, Geusens P, Lems W, van den Bergh J (2014). Calcium and vitamin D supplementation: state of the art for daily practice. *Food Nutr Res* 7:58.
429. van Loo HM, de Jonge P, Romeijn JW, Kessler RC, Schoevers RA (2012). Datadriven subtypes of major depressive disorder: A systematic review. *BMC Med* 10: 156.
430. Van Orten-Luiten AC, Janse A, Dhonukshe-Rutten RA, Witkamp RF (2014). The association between drugs frequently used by the elderly and vitamin D blood levels: a review of observational and experimental studies. *Drugs Aging* 31(2): 111-123.
431. van Schoor NM, Lips P (2011). Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(4): 671–680.
432. Van Schoor NM, Yu H, Bobula J, Lips P (2009). Cross-geographic region differences in quality of life in women with and without vertebral fracture. *Osteoporosis Int* 20(10): 1759-1766.
433. Vanherwegen AS, Gysemans C, Mathieu C (2017). Regulation of immune function by vitamin D and its use in diseases of immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 46(4): 1061–1094.
434. Vanheule S, Desmet M, Groenvynck H, Rosseel Y, Fontaine J (2008). The factor structure of the Beck Depression Inventory-II. *Assessment* 15(2): 177–187.
435. vanSchoor NM, Knol DL, Deeg DJ, Peters FP, Heijboer AC, Lips P (2014). Longitudinal changes and seasonal variations in serum 25-hydroxyvitamin D levels in different age groups: results of the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Osteoporos Int* 25(5): 1483–1491.
436. Veldurthy V, Wei R, Oz L, Dhawan P, Jeon YH, Christakos S (2016). Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res* 18(4): 16041.
437. Velickovic-Radovanovic RM, Jankovic SM, Milovanovic JR, et al (2015). Variability of mycophenolic acid elimination in the renal transplant recipients - population pharmacokinetic approach. *Ren Fail* 37(4): 652-658.

438. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C (2010). Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int* 78(2): 140–145.
439. Vieth R (1999). Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 69(5): 842-856.
440. Vieth R (2005). The Pharmacology of Vitamin D, Including Fortification Strategies Feldman D, Pike JW and Gloreieux FH. In *Vitamin D*. Second Edition. Elsevier Academic Press 995- 1018.
441. Vieth R, Kimball S, Hu A, Walfish PG (2004). Randomized comparison of the effects of the vitamin D3 adequate intake versus 100 mcg (4000 IU) per day on biochemical responses and the wellbeing of patients. *Nutr J* 19; 3: 8.
442. Vink D, Aartsen MJ, Comijs HC, et al (2009). Onset of anxiety and depression in the aging population: comparison of risk factors in a 9-year prospective study. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 17: 642–652.
443. Vitamin D [editorial] (2008). *Alternative Medicine Review* 13(2): 153-164 Available at: <http://www.ibcleende.com/Vitamin%20D.PDF> (Last accessed: 24.04. 2018)
444. Vlahovic Z, Radojkovic D (2010). Healthcare in Serbia in transition period. *EPMA J* 1(4): 601-606.
445. Vujasinović-Stupar N, Pilipović N, Branković S (2004). Cyclic intravenous pamidronate in treatment of osteoporosis. *Med Pregl* 57(11–12): 545–50.
446. Vujasinović-Stupar N, Pilipović N, Branković S, Stanišić M (2005). Bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Balneoclimatologia* 29(3): 185–94.
447. Vujasinović-Stupar N, Vukojević P, Pilipović N (2000). Bisphosphonates in treatment of osteoporosis. *Acta Rheum Belgrad* 30(1): 20–29.
448. Vukosavljević J, Simić G, Vukosavljević I (2014). Osteoporoza u primarnoj zdravstvenoj zaštiti- tiha epidemija. *PONS Med J* 11(2): 72-77.

449. Vuković D, Bjegovic V, Vukovic G (2008). Prevalence of Chronic Diseases According to Socioeconomic Status Measured by Wealth Index: Health Survey in Serbia. *Croat Med J* 49(6): 832-841.
450. Wacker M, Holick MF (2013). Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 5(1): 51-108.
451. Wacker M, Holick MF (2013). Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* 5(1): 111-148.
452. Wallace AM, Gibson S, Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M (2010). Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 75(7): 477-488.
453. Wallace RB, Wactawski-Wende J, O'Sullivan MJ, et al (2011). Urinary tract stone occurrence in the Women's Health Initiative (WHI) randomized clinical trial of calcium and vitamin D supplements. *Am J Clin Nutr* 94(1): 270-277.
454. Wasserman H, Gordon CM (2017). Bone Mineralization and Fracture Risk Assessment in the Pediatric Population. *J Clin Densitom* 20(3): 389-396.
455. Watts NB, Bilezikian JP, Camacho PM, et al (2010). American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis: executive summary of recommendations. *Endocr Pract* 16(6): 1016-1019.
456. Weglicki WB, Mak Iu T, Chmielinska JJ, Tejero-Taldo MI, Komarov AM, Kramer JH (2010). The role of magnesium deficiency in cardiovascular and intestinal inflammation. *Magnes Res* 23(4): 199-206.
457. Weil A, Abrahamsen B, Kassem M (2005). Prevention and treatment of osteoporosis in women. *Curr Obstt Gynaecol* 15: 251-258.

458. Wells G, Tugwell P, Shea B, Guyatt G, Peterson J, Zytarnk N (2002). Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis.V. Meta-analysis of the efficacy of hormone replacment therapy in trating and preventig osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev* 23(4): 529–39.
459. Welsh J (2017). Function of the vitamin D endocrine system in mammary gland and breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 453: 88-95.
460. Whisman MA, Perez JE & Ramel W (2000). Factor structure of the Beck Depression Inventory Second Edition (BDI-II) in a student sample. *J Clin Psychol* 56(4): 545–551.
461. WHO Scientific Group Technical Report. Assessment of osteoporosis at the primary health care level.(2007).Availabl at: http://www.shef.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO_Technical_Report.pdf (Last assessed: 03.04.2018.).
462. Wilkins CH, Sheline YI, Roe CM, Birge SJ, Morris JC (2006). Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults. *Am J Geriatr Psychiatr* 14(12): 1032-1040.
463. Wimalawansa SJ (2012). Vitamin D in the new millennium. *Curr Osteoporos Rep* 10(1) :4–15.
464. World Health Organisation (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical ReportT series 843, 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser 843: 1-129 .
465. World Health Organisation. Cardiovascular disease (CVDs). Fact sheet N°317. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. (Last accessed: 27.08. 2018).

466. World Health Organization (2007). WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level: Summary Meeting Report.
467. Wu PC (2010). Measurement Invariance and Latent Mean Differences of the Beck Depression Inventory-II Across Gender Groups. *J Psychoeduc Assess* 28(6): 551–563.
468. Wu W, Beilhartz G, Roy Y, et al (2010). Nuclear translocation of the 1,25D3-MARRS (membrane associated rapid response to steroids) receptor protein and NFkappaB in differentiating NB4 leukemia cells. *Exp Cell Res* 316(7): 1101–1108.
469. Yang P, Zhang XZ, Zhang K, Tang Z (2015). Associations between frequency of coffee consumption and osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *Int J Clin Exp Med* 8(9): 15958-15966.
470. Yuen E, Romney M, Toner RW et al (2010). Prevalence, knowledge and care patterns for gastroesophageal reflux disease in United States minority populations. *Aliment Pharmacol Ther* 32(5): 645-654.
471. Zeghoud F, Vervel C, Guillozo H, et al (1997). Subclinical vitamin D deficiency in neonates: definition and response to vitamin D supplements. *Am J Clin Nutr* 65(3): 771.
472. Zhang R, Naughton DP (2010). Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr J* 9:65.
473. Zhao G, Ford ES, Li C, Balluz LS (2010). No associations between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone and depression among US adults. *Br J Nutr* 104(11): 1696-1702.
474. Zhao G, Ford ES, Tsai J, Li C, Croft JB (2012). Factors Associated with Vitamin D Deficiency and Inadequacy among Women of Childbearing Age in the United States. *ISRN Obstet Gynecol*: 691486.
475. Zhou P, Hu J, Xi P, Zhang N, Yang B, Zheng J, Wang X (2017). Survey on the levels of 25-hydroxy vitamin D and bone metabolic markers and evaluation of their

correlations with osteoporosis in perimenopausal woman in Xi'an region. PLoS One 12(7): e0180366.

476. Zizic TM (2004). Pharmacologic prevention of osteoporotic fractures. Am Fam Physician 70(7): 1293–1300.

БИОГРАФИЈА

Јелена Ђоковић, дипломирани инжењер фармације и козметике, рођена је 17.05.1985. у Крагујевцу. Основну и средњу медицинску школу завршила у Крагујевцу 2004. године. Фармацеутски факултет Универзитета у Нишу уписала 2004. године и завршила 2010. године са просечном оценом 8,26 и стекла звање дипломирани инжењер фармације и козметике. Докторске академске студије уписала 2011. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, смер Фармакологија и токсикологија и положила све испите предвиђене планом и програмом. Усмени докторски испит положила са оценом осам 12.09.2013. године. Од 01. септембра 2016. до 2017. године радила је на Фармацеутском факултету Универзитета у Нишу као наставник вештина на смеру савремене технологије лекова. Течно говори, чита и пише енглески језик и такође познаје рад на рачунару.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Djokovic J**, Tomic Lucic A, Milovanovic O, Bazic D, Veselinovic M, Djukic A, Matovic S, Zivkovic Zaric R, Velickovic Radovanovic R, Jankovic S, Milovanovic J. Population pharmacokinetics of 25-hydroxy vitamin D in non-elderly postmenopausal women. *Acta Poloniae Pharmaceutica* DOI: 10.32383/appdr.76.00247.2018.03
2. **Djokovic J**, Milovanovic B, Milovanovic JR, Milovanovic O, Stojic I, Mrvic S, Kostic M, Stefanovic S, Jankovic SM · Translation of the Medical Fear Survey to Serbian: psychometric properties. *HIPOKRATIA* 2016, 20(1): 44-49
3. Boskovic M, **Djokovic J**, Grubor I, Guzvic V, Jakovljevic B, Jurisevic M, Ljubisic D, Mijajlovic M, Milicevic I, Milovanovic M, Nikolic L, Nikolic M, Peric S, Petrovic A, Petrovic J, Radonjic K, Simonovic L, Simovic M, Stojanovic S, Stojic I, Tomovic J, Vranic S, Vucicevic K, Zdravkovic A, Jankovic S. PhD students' awareness of research misconduct. *J Empir Res Hum Res Ethics*. 2013; 8(2): 163-4. M21
4. Milovanović B, Tomović D, Janković S, Grubor I, Nikolić Lj, Nikolić M, Mijajlović M, Mrvić S, Divjak A, Milojević A, **Djoković J**, Prokić A, Bukonjić A, Sekulić M, Matić V, Vukmirović Dj, Rakonjac B, Dimitrijević T, Nikolić N, Jovanović D, Milovanović J, Ratković M, Barudžić N, Mladenović N, Milutinović M, Antanasković A, Nikolić M. Factors Influencing the Fear of Needles among Students of Medicine and Pharmacy. *Acta Facultatis Medicinae Naissensis* 2017;34(2):147-158

8 ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације: Монографска публикација

ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација

ВР

Аутор: Јелена Ђоковић

АУ

Ментор/коментор: др сци. мед. Јасмина Миловановић, ванредни професор

МН

Наслов рада:

НР

Повезаност серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и густине костију код жена старијих од 35 година

ЈП

Језик извода: српски/енглески

ЈИ

Земља публикавања: Република Србија

ЗП

Уже географско подручје: Централна Србија

УГП

Година: 2019.

ГО

Издавач: Ауторски репринт

ИЗ

Место и адреса: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

МС

Физичи опис рада:

ФО 199 страна, 26 табела, 13 графика

Научна област: Медицина

УДК :

Научна дисциплина: Екпериментална и клиничка фармакологија

ДИ

Предметна одредница/ кључне речи

ПО популациона фармакокинетика, серумска концентрација, 25-хидрокси витамин D, густина костију, популациона фармакокинетика, анксиозност, депресија, квалитет живота, NONMEM

Чува се: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
ЧУ

Важна напомена:
МН

Извод:
ИД

Увод: Хиповитаминоза витамина D је данас широко заступљена у свету, у свим старосним групама са већом преваленцом код жена, посебно код жена са остеопенијом и примарном остеопорозом. Циљ ове студије јесте развијање популационог фармакокинетичког (ПФК) модела клиренса 25-хидрокси витамина D, идентификација и квантификација фактора који га одређују код жена старијих од 35 година, као и испитивање корелације серумских 25-хидрокси витамина D са вредностима минералне густине костију, годинама старости, квалитетом живота, степеном депресивности и присуством страха код испитаница.

Испитаници и Методе истраживања: Студија је обухватила 224 жене старије од 35 година, које су долазиле на остеодензитометријски преглед у Клинички центар Крагујевац. Испитавана популација подељена је у три подгрупе: жене у пременопаузи (од 35. године до менопаузе), жене у пери и/или постменопаузи (од менопаузе до 65. године живота) и старије жене (од 65. до 75. године живота). У ПФК анализи коришћен је софтверски програм НОНМЕМ (Non linear mixed effect model) и АДВАН 1 субрутина. Бројни демографски, клинички, биохемијски, хормонски и медикаментозни подаци су испитивани као фактори варијабилности клиренса 25-хидрокси витамина D у све три субпопулације жена. Процена депресије, стаха и квалитета живота је вршена употребом валидираних и културолошки адаптираних упитника.

Резултати: Добијене се средње, популационе вредности клиренса 25-хидрокси витамина D, идентифицирани су и квантификовани фактори који га одређују, као и вредности интер- и интраиндивидуалне варијабилности у испитиваним субпопулацијама. За валидацију добијених ПФК модела коришћена је екстерна валидација. Показано је постојање корелације између серумских концентрација 25-хидрокси витамина D са квалитетом живота код жена са редовним менструалним циклусом; минералном густином костију и вредностима T скорa добијених DXA методом и квалитетом живота код жена у постменопаузи.

Закључак: Добијене фармакокинетиче једначине могу се користити у доношењу препорука за кориговање и индивидуализацију дозе овог витамина у виду суплементације код жена у Србији, у три њихова значајна животна периода.

Кључне речи: Серумска концентрација, 25-хидрокси витамин D, минерална густина костију, популациона фармакокинетика, NONMEM

Датум прихватања теме од стране ННВ: 26.04.2017.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

1. Проф. Александра Томић -Лучић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник,
2. Доц. др Оливера Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан
3. Проф. др Радмила Величковић Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармакокинетика, члан

8.1. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type: Monographic publication

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: Ph. D. Thesis

CC

Author: Jelena Djokovic

AU

Menthor/co-mentor Professor Jasmina Milovanovic M.D. Ph.D.

MN

Title: Correlation of serum concentration of 25-hydroxy vitamin D and bone density in female population older than 35 years of age

TI

Language of text: Serbian/Cyrillic

LT

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Central Serbia

LP

Publication year: 2019.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia
PP

Physical description
PD 199 pages, 26 tables, 13 graphics

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Experimental and clinical pharmacology
SD

Subject/key words:
SKW Population pharmacokinetics, serum concentration, 25-hydroxy vitamin D, bone density, anxiety, depression, life quality, NONMEM

UDC

Holding data: Library of Faculty of medical sciences Kragujevac, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note:
N

Abstract:**AB**

Introduction: Hypovitaminosis of vitamin D is widely spread over the world, throughout every age group, but, dominantly present in female population with osteopenia and primary osteoporosis. The aim of this study was to develop a population pharmacokinetics (PFK) model of 25-hydroxy vitamin D clearance, identification and quantification of factors defining it in female's population older than 35 years, as well as to research the correlations between serum concentration of 25-hydroxy vitamin D and values of bone density, age, life quality, depression level and presence of fear among the study subjects.

Patients and Methods: The study population consisted of 224 women older than 35 years, which were taking osteodensitometry tests in Clinical center in Kragujevac. Test population was divided into 3 subgroups: women in premenopause (from 35 years to menopause) and women in peri- and/or in postmenopause (between menopause and 65 years of age) and elderly women (from 65 to 75 years of age). For PFK analysis a NONMEM (Non linear mixed effect model) softwear was used as well as ADVAN 1 subroutine. Numerous demographic, clinical, biochemical, hormonal and medicamental data were investigated as factors of clearance variability of 25-hydroxy vitamin D for all three female subpopulations.

Results: Middle values for population clearance of 25-hydroxy vitamin D were acquired, its defining factors were identified and quantified, as well as inter- and intraindividual variables for study population. For validation of acquired PFK models external validation was applied. Correlation between serum concentration of 25-hydroxy vitamin D and life quality for females with regular period, mineral bone density and values for T score from DXA method and life quality for females in postmenopause, was confirmed.

Conclusion: Defined pharmacokinetic equations can be used for making recommendation, corrections and individualization of vitamin D doses, through supplementation, for women in Serbia, during their three most important life periods.

Key words: Serum concentration of 25-hydroxy vitamin D, bone density, population pharmacokinetics, NONMEM.

Accepted by the Scientific Board on: 26.04.2017.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

- 1. Associate professor Aleksandra Tomic-Lucic, M.D. Ph.D. Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, chairman.**
- 2. Assistant professor Olivera Milovanovic, M.D. Ph.D. Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, member;**
- 3. Associate professor Radmila Velickovic Radovanovic, M.D. Ph.D. Faculty of medical sciences, University of Nis, member**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

која је одбрањена на _____
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____, _____ године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Ђ. Ђоковић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Повезаност серумске концентрације 25-хидрокси витамина D и густине
костију код жена старијих од 35 година

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, _____ године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

POPULATION PHARMACOKINETICS OF 25-HYDROXY VITAMIN D

IN NON-ELDERLY POSTMENOPAUSAL WOMEN

JELENA DJOKOVIC¹, ALEKSANDRA TOMIC LUCIC^{2,3}, OLIVERA Z. MILOVANOVIC⁴,
DANIJELA BAZIC³, MIRJANA VESELINOVIC^{2,3}, ALEKSANDAR DJUKIC^{2,3}, SANDRA
MATOVIC¹, RADICA ZIVKOVIC ZARIC¹, RADMILA VELICKOVIC RADOVANOVIC⁵,
SLOBODAN M. JANKOVIC¹ and JASMINA R. MILOVANOVIC¹

¹ University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology
and Toxicology

² University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal
Medicine

³ Clinical Center of Kragujevac, Serbia, Internal Clinic

⁴ University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Clinical
Pharmacy

⁵ Pharmacy Department, Medical Faculty, University of Nis

Correspondence: Aleksandra

Tomic Lucic Department of

Internal Medicine Faculty of

Medical Sciences University of

Kragujevac Svetozara

Markovica 69

34000 Kragujevac

Serbia

Tel/Fax: +38134306800

Email: sanlusa@ptt.rs

ABSTRACT

Introduction/aim: Vitamin D is one of the keys to bone health, and the serum levels of this vitamin are a major concern for postmenopausal women. The aims of this study were to develop a population pharmacokinetic (PPK) model for the clearance of 25-hydroxy vitamin D in non-elderly postmenopausal women and to identify the factors which have a significant influence on its clearance.

Methods: The study population consisted of postmenopausal women who had been referred for evaluation of bone mineral density (BMD) by DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) scanner. The population pharmacokinetics modelling was conducted using the ADVAN 1 subroutine from a non-linear mixed effects (NONMEM) program, and thirty-two covariates were assessed.

Results: A total of 75 serum concentrations were obtained from the same number of postmenopausal women and used for PPK analysis. The mean values of the participants' age was 57.92 ± 3.93 years and their body weight was 69.76 ± 11.49 kg. A wide range of 25-hydroxy vitamin D concentrations was observed (from 3.41 to 61.92ng/mL) with a mean value of 26.19 ± 10.95 ng/mL. A total of 32 covariates were examined and preliminary results suggested the influence of six covariates on 25-hydroxy vitamin D clearance. In the final PPK model however, only one covariate was shown to have a significant impact on the clearance value – the mean daily dietary intake dose of vitamin D (DD).

Conclusions: These findings offer a preliminary basis on which to determine the level of vitamin D supplementation required by individual postmenopausal women. It could prove particularly important in achieving optimal serum levels of vitamin D in this vulnerable population.

Keywords: Women, Postmenopausal women, 25-hydroxy vitamin D, Population pharmacokinetics, NONMEM

INTRODUCTION

Vitamin D is one of the key factors in bone health and the blood level of this vitamin is of major importance for the bone health of postmenopausal women (1). This lipophilic vitamin has multiple effects in the human body but its role in calcium and phosphorus homeostasis is essential for the preservation of bone health. The available data indicates that supplementation of vitamin D in adequate doses may prevent osteoporosis in both peri and postmenopausal women (2, 3). In addition to dietary intake, the impact of several other factors on vitamin D status has been examined over the past two decades, these include: region, age, gender, skin type, sunscreen cream used, exposure to sun, eating habits, and season of the year, among others. Many previous studies have identified sun exposure and inadequate intake of vitamin as the most important factors influencing development of hypovitaminosis D (4).

Vitamin D status in the human body is estimated according to the level of 25-hydroxy vitamin D in serum. The agreed values of 25-hydroxy vitamin D indicating hypovitaminosis D are less than 30 ng/mL, while values ranging from 20 to 30 ng/mL denote vitamin D insufficiency and values less than 20 ng/mL indicate vitamin D deficiency (5). The proven association between decrease of BMD and vitamin D deficiency in postmenopausal women is the main reason for the recommendation of vitamin D screening tests for this population and for the use of vitamin D supplementation. Since the reduction of bone mineral density is much slower in premenopause and the early perimenopause period compared to late perimenopause and postmenopause, timely screening for vitamin D deficiency and adequate vitamin D supplementation are essential steps after the first appearance of menopausal symptoms and signs (6, 7).

Vitamin D supplementation in postmenopausal women should be undertaken according to current recommendations, but there is no evidence that recommended doses are individualised according to the needs of each individual patient.

The aim of this study was to develop a population pharmacokinetic model for the clearance of 25-hydroxy vitamin D in postmenopausal women and to identify factors which have a significant influence on its clearance.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Seventy-five postmenopausal women who visited the Center for Bone Densitometry at the Internal Clinic, Clinical Center Kragujevac, took part in the study over three months in 2017 (from January to March). The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Clinical Center Kragujevac (N₀ 01/15485, approved on 28.11.2016.).

The participants had been referred for evaluation of bone mineral density (BMD) by their general practitioners, and the examinations were performed using a DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) scanner, according to the established standard. The study inclusion criteria were: women at post-menopause up to 65 years old without a previous diagnosis of any acute or chronic disease (except osteoporosis or osteopenia), who had not started taking vitamin supplements or trace elements or who used only vitamin D and calcium supplementation prescribed by their rheumatologists, without changes to their usual diet for at least 6 months and who were not following any specific dietary regime. We excluded women who were still menstruating and those with secondary osteoporosis linked to medical conditions, hormonal causes and other links to secondary osteoporosis including medication with corticosteroids, anticonvulsants and other drug classes. Women using an active form of vitamin D (1,25-dihydroxycholecalciferol) as supplementation were also excluded from the study.

The participants were given a detailed explanation of the study protocol, and were included in the study after having signed an informed consent form. All the participants were asked to record accurately the amount and variety of food and drink that they consumed and the amount of time they spent outdoors daily, over the course of one month. Based on these records,

we first calculated the total daily intake of vitamin D from food and drink for each day, using the USDA National Nutrient Database for Standard Reference, release 24 (8). We then calculated the average daily intake of vitamin D for one month for each patient. Next, we calculated the mean daily vitamin D supplementation intake, based on the type and number of preparations for each individual patient (prescribed by their rheumatologists and extracted from the medical records). The vitamin D content of the pharmaceutical supplements taken by our participants was clearly specified by the manufacturer on the product label. By adding the average daily intake from food to that of the supplements, we arrived at the factor used in the PPK analysis (expressed as the daily dietary intake of vitamin D, Table 1). In addition, all the participants reported their daily sun exposure over the course of one month. Based on these records we calculated the average daily sun exposure for each of them. Since the study was conducted in winter, all the women were wearing clothing which covered their arms and legs. Because sun exposure is a crucial factor for the achievement of adequate vitamin D levels, we analysed these factors in two ways: mean daily sun exposure (expressed in hours) and category variable (less or more than two hours daily). A blood sample was taken from all the participants after the one-month period had been completed. The samples were taken in the morning ,at 8.00 a.m., before the participants had eaten, and were subjected to the following analysis: biochemical (serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D, calcium, phosphate, magnesium, bilirubin, protein, albumin, glucose, urea, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine); the hormone tests were for triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), thyroid stimulating hormone (TSH), thyroid peroxidase antibody (TPOAb) and parathyroid hormone (PTH). Serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D were routinely determined using the electro-chemiluminescence method on Cobas[®]e 601 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim,

Germany), according to the manufacturer's instructions. Coefficients of variation (CV) for the intra-assay and inter-assay were 4.1% and 4.8%, respectively.

According to the DEXA results based on the T score, the women were classified into one of three groups: those with normal BMD; those diagnosed with osteopenia (T-score between -1.5 and -2.5 SD); and those with osteoporosis (T score below -2.5 SD). The following data was extracted from the patients' medical records: age, body weight and height of patients, prescribed supplementation with calcium and vitamin D (daily dose, dosage regimens and types of vitamin D supplements and calcium) and drug classes for the treatment of osteoporosis. The women's life habits (consumption of coffee, alcohol, smoking status), their hereditary predisposition (i.e. absence/presence of a family history of osteoporosis). Skin type and co-medication were noted on the same day using an unstructured questionnaire filled out by the researchers.

Population pharmacokinetic analysis

The population pharmacokinetics (PPK) modelling was conducted using the ADVAN 1 subroutine from the non-linear mixed effects (NONMEM) program version 7.3.0 (Icon Development Solution, USA). To form a structural base model, we selected a one-compartment model without absorption based on our previous reports with regard to the clearance of 25-hydroxy vitamin D. The inter-individual variability of the examined pharmacokinetic parameters was compared between the additive and exponential error models. Residual variability of serum concentration was tested using an additive, exponential, constant coefficient of variation (CCV) and combined (additive and CCV) error models. To assess the influence of a potential covariate on the clearance of 25-hydroxy vitamin D we performed a sequential univariate analysis which included one-by-one addition of variables in the base model. In this process we examined the

influence of 32 variables (Table 1). The results of the covariate analysis were interpreted through differences in the minimum of objective function (MOF) between the base and individual covariate model, and better congruency on diagnostic plots: population predicted or individual predicted concentrations versus measured concentrations of 25-hydroxy vitamin D. A significant influence of each covariate on CL/F was assumed using the difference in MOF value (Δ MOF >3.84 for $p < 0.05$, $df=1$) in the forward stepwise inclusion process. The results were confirmed by the backward stepwise elimination method with a higher statistical threshold for previously marked covariates (Δ MOF >6.6 for $p < 0.01$, $df=1$). The final model included all covariates that were statistically significant by both the aforementioned methods.

During the development of the final model we evaluated the model fitting data through visual inspection of the diagnostic plots previously mentioned. To evaluate the stability and predictive performances of the derived model, bootstrapping analysis was performed as internal validation. This analysis is a resampling technique which includes several hundred or thousand data replicates with replacement from the original data set using the individual patients as the sampling unit. Each of the bootstrap samples was fitted to the final model with estimated values of clearance and variability using NONMEM software. The mean value of estimated PK parameters (CL/F and Vd/F), the standard deviation and 95% confidence interval for each parameter were calculated and compared with their values of the final derived model.

RESULTS

The characteristics of the study population are summarized in the Table 1. A total of 75 serum concentrations were obtained from the participants and used in the PPK analysis. The mean value of the participant's age was 57.92 ± 3.93 years and body weight had the value of 69.76 ± 11.49 kg. A wide range of 25-hydroxy vitamin D concentrations was observed in our population (from 3.41 to 61.92 ng/mL) with a mean value of 26.19 ± 10.95 ng/mL. Forty-four women (60%) from the study population had osteopenia (n=35, 48%) or osteoporosis (n=9, 12%) according to the DEXA results (T score). Moreover, 55 women (73.33%) had no history of hereditary predisposition in the family. A one-compartment model with ADVAN1 subroutine described the concentrations of 25-hydroxy vitamin D well, and an exponential error model for inter-individual variability and an additive model for residual variability gave a better model fit. In the base model, the mean population value of the clearance of 25-hydroxy vitamin D was 0.0722 L/h with a reported value of 695.112 units for the minimum of objective function.

The effects of the following covariates were estimated in the analysis: patient's age and body weight, the mean daily dietary intake of vitamin D, the mean daily sun exposure (the time spent outside, expressed in two ways: as a continuous variable (average number of hours per day) or a category variable (categorized to less than or more than 2 hours daily with values 0 or 1), serum calcium, phosphate, magnesium, bilirubin, total protein, albumin, glucose, urea, AST and ALT, creatinine clearance, TSH, PTH, T3, T4 and TPO antibody, the presence of osteopenia/osteoporosis (T score), hereditary predisposition, skin type, usage of coffee, alcohol or cigarettes and concomitant therapy with bisphosphonates, calcium, statins or benzodiazepines. The results of covariate analysis after the forward inclusion step suggested the significant influence of six covariates: the mean daily dietary intake of vitamin D (from foods and

supplementations), both variables linked to the mean daily sun exposure (as a continuous and category variable), TPO antibody, coffee usage and co-medication with benzodiazepines. Backward elimination showed that the clearance of 25-hydroxy vitamin D was significantly affected by the mean daily dietary intake of vitamin D. The equation of the final PPK model was as follows:

$$CL (L/h) = 0.0886 + 0.00097 \times DD$$

In the final model, the MOF value decreased by 191.477 units; decreases were also observed in both variability, inter-individual and residual variability of 24.01% and 15.26%, respectively. Moreover, improvement of the final model fit was expressed through the diagnostic plot of individual predicted values versus measured serum concentrations of 25-hydroxy of vitamin D in the target population (Figure 1). To evaluate the predictive performance of the derived model, bootstrap analysis was performed, the results of which are shown in Table 2. It can be seen that the bootstrapping yielded similar results to those obtained in initial development of the model, which indicates that the final model is accurate and stable.

DISCUSSION

The population pharmacokinetic model of 25-hydroxy vitamin D in women at postmenopause examined the influence of 32 covariates on the population clearance value. Preliminary results pointed to six covariates that may influence 25-hydroxy vitamin D clearance (the mean daily dietary intake of vitamin D, mean daily sun exposure expressed as a continuous and category variable, level of TPOAb, coffee consumption and use of benzodiazepines), but in the final PPK model only one covariate had a significant impact on the clearance. To our knowledge this is the first report on the population pharmacokinetics of vitamin D in postmenopausal women.

The intake of vitamin D from food is essential for reaching an adequate physiological level of 25-hydroxy vitamin D in the human body. Since food is a poor source of vitamin D, taking into account that only a limited number of foods have a significant amount of this vitamin, intake of food fortified with this vitamin or supplementation is a sensible choice. In Serbia only a few food products are fortified with vitamin D, such as milk, butter, some breakfast cereals, orange juice and certain pasta products. The mean daily dietary intake of vitamin D in our patients was $24.01 \pm 15.3 \mu\text{g}$ with a wide range between $1.06 \mu\text{g}$ and $70.06 \mu\text{g}$. Such a high value of the mean daily dietary intake of vitamin D is a consequence of supplementation, as significantly lower values of vitamin D daily dietary intake were observed in our two previous studies conducted on the Serbian population: $2.57 \pm 2.53 \mu\text{g}$ and $1.55 \pm 0.87 \mu\text{g}$, respectively (9,10). A similar situation was reported for other European countries: a high prevalence of vitamin D deficiency and very low vitamin D intake from food (11). However, there are differences in the vitamin D supplementation rate, as northern countries are characterized by the highest rate of vitamin D supplementation, almost 61.7%, while the data from Italy, France and Germany show

lower ranges (from 6.7 to 27%). On the other hand, 80% of our participants took supplementation because they had a diagnosis of osteopenia or osteoporosis in 60% of cases. The influence of mean daily dietary intake of vitamin D on 25-hydroxy vitamin D clearance could be understood from MOF reduction in the final PPK model of 191.477 units, and is in accordance with the previous PPK analysis from Serbia (9,10).

In the past few decades, it has been stressed in a large number of scientific reports that exposure to sun is essential for achieving a sufficient level of 25-hydroxy vitamin D and the manifestation of its beneficial effects in the human body. In spite of this growing body of evidence we still do not know precisely what duration of sun exposure is adequate for optimal vitamin D synthesis in the skin. Two factors have a notable impact on the effectiveness of exposure to the sun; the geographical position of the population and the season of the year when the person is exposed to the sun. Serbia lies at geographical latitudes above 35° which stops natural skin production of vitamin D during a large part of the year, from as early as October, until April, implying the need for vitamin D supplementation. The time frame for our study was the period from January to March, which explains why four-fifths of the study population used vitamin D supplements. The results of a cross-sectional study in Turkish woman clearly indicated the influence of a low level of life-long sun exposure on earlier onset of menopause (12). Other benefits of sun exposure were shown in a cohort study with postmenopausal woman where the results suggested a positive correlation between serum concentration of 25-hydroxy vitamin D and period of sun exposure (13). Our observations are in accordance with previous studies where mean daily sun exposure time was 2.69 ± 1.34 h while 56% of the study population spent less than 2h daily exposed to the sun, however neither covariate had a significant impact on 25-hydroxy vitamin D clearance in the final PPK model.

Whether coffee, alcohol and nicotine are factors which may influence serum concentration of 25-hydroxy vitamin D is still a matter of controversy. In our study 49.3% of participants were smokers, 13.3% consumed more than 3 alcoholic drinks weekly and 29.3% more than 3 cups of coffee daily. However, our final PPK model did not recognize any of these three covariates as important elements in 25-hydroxy vitamin D clearance, an observation which is in accordance with the results of previous PPK analysis in a healthy, young population (10). The effects of caffeine consumption in amounts larger than 300mg/day on the serum level of 25-hydroxy vitamin D has been studied in a large number of epidemiological and experimental trials and the results provide a much clearer picture of this correlation. Yang et al. analyzed the influence of coffee consumption on osteoporosis in postmenopausal women and they concluded that osteoporosis prevalence was higher in women who did not consume coffee (14). The results of a meta-analysis in which the authors wanted to determine the influence of coffee consumption on risk of fracture showed that coffee intake increased the risk of fracture in 4.9% of women with each additional cup of coffee per day, through the influence of coffee on mineral homeostasis, which can be reflected in decreased levels of 25-hydroxy vitamin D (15). An experimental study explained the influence of caffeine on 25-hydroxy vitamin D through changes in the expression of vitamin D receptors (VDR) (16). Rupury et al. showed that caffeine dose-dependently decreased VDR expression by 50-70% (17). Other studies demonstrated that smoking can decrease the serum level of 25-hydroxy vitamin D by 9% (18).

Thyroid gland function markers were also included in our study and the results showed that they had no significant impact on the pharmacokinetic model of 25-hydroxy vitamin D. The presence of vitamin D receptors in many tissues and organs explains the multiple effects of this vitamin in the human body including immunomodulatory effects. Some studies have revealed a

strong correlation between low levels of 25-hydroxy vitamin D and autoimmune thyroid disease, because antithyroid antibodies are more common in persons with vitamin D deficiency or insufficiency (19). An additional observation from this study was that this factor was more influential in females (20), suggesting a need for supplementation. Chaudhary et al. conducted a study where they examined the influence of vitamin D supplementation on thyroid autoimmunity and results from this open-labelled randomized control study strongly indicated that vitamin D decreases the level of TPOAb (21). Our results show that parameters linked to thyroid gland function do not affect the pharmacokinetics of 25-hydroxy vitamin D.

The metabolism of vitamin D can be affected by certain drugs, and this has been a topic in vitamin D research over the past few years. For this reason we included some concomitant therapy in our PPK analysis such as the use of bisphosphonates, calcium, statins and benzodiazepines. Our study failed to detect any significant impact from these drugs on clearance of 25-hydroxy vitamin D. Of our patients, 26.7% used benzodiazepines, 12 were taking bromazepam and 8 lorazepam. Orten-Luiten and colleagues made a review of observational and experimental studies where they summarized the influence of several drugs on vitamin D status; this report reached different conclusions on the influence of benzodiazepines on 25-hydroxy vitamin D serum levels (22). The decreased level of vitamin D induced by drugs can be very harmful for postmenopausal women when bone health status is endangered by changes in hormonal status. One of the potential explanations of how benzodiazepines change serum levels of vitamin D is the pharmacokinetic interactions involving liver metabolism. This however, was not confirmed in our study, and it has previously been shown that while bromazepam is metabolized by CYP1A2 and CYP2D6 isoforms and lorazepam by UGT2B15 isoform, vitamin D is predominantly metabolized by CYP27A1, CYP27B1 and CYP24A1.

Although our research has led us to some specific conclusions, there were some limitations that should be highlighted. The study was conducted in the winter, when vitamin D supplementation is certainly needed. Further research should be conducted during a different season of the year to establish precisely what influence the weather has on vitamin D status, and also to make possible generalization of this conclusion to the Balkan region, as a whole. Another important limitation for this study was the self-reported approach for daily vitamin D intake and sun exposure time, but this was unavoidable due to the type of participants taking part in the study.

CONCLUSION

According to the presented results, we may conclude that the mean daily dietary intake dose of vitamin D is the only factor with an important influence on the clearance of 25-hydroxy vitamin D in non-elderly postmenopausal women. These findings could help when individualizing vitamin D intake in the form of supplements in order to achieve the required blood levels in postmenopausal women.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Grants No JP 04-17 and No 175007 given by Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and Serbian Ministry of Education, respectively.

CONFLICT OF INTEREST

All authors have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Milovanovic O.: *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 18, 3 (2017).
2. Purdue-Smithe A.C., Whitcomb B.W., Szegda K.L., Boutot M.E., Manson J.E., Hankinson S.E., Rosner B.A., Troy L.M., Michels K.B., Bertone-Johnson E.R.: *Am. J. Clin. Nutr.* 105, 1493 (2017).
3. Chon S.J., Koh Y.K., Heo J.Y., Lee J., Kim M.K., Yun B.H., Lee B.S., Seo S.K.: *Obstet. Gynecol. Sci.* 60, 53 (2017).
4. Nair-Shalliker V., Clements M., Fenech M., Armstrong B.K.: *Photochem. Photobiol.* 89, 208 (2013).
5. Makariou S., Liberoupolos E., Elisaf M., Challa A.: *Eur. J. Inter. Med.* 22, 355 (2011).
6. Monteleone P., Mascagni G., Giannini A., Genazzani A.R., Simoncini T.: *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 199 (2018).
7. Zhou P., Hu J., Xi P., Zhang N., Yang B., Zheng J., Wang X.: *PLoS One.* 12, e0180366. (2017).
8. <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc.ndl>. (accessed on 15. 03. 2018.)
9. Matovic S., Milovanovic J.R., Dajic K., Stojkovic A., Jankovic S.M.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 56, 169 (2018).
10. Milovanovic O., Milovanovic J.R., Djukic A., Matovic M., Lucic A.T., Glumbic N., Radovanovic A., Jankovic S.M.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 53, 1 (2015).
11. Spiro A., Buttriss J.L.: *Nutr. Bull.* 39, 322 (2014).
12. Aydin D., Erbas B., Karakus N., Aydin O., Ozkan S.: *Maturitas.* 52, 235 (2005).
13. Cheng T.Y., Millen A., Wactawski-Wende J., Beresford S.A., LaCroix A.Z., Zheng Y., Goodman G.E., Thornquist M.D., Neuhaus ML.: *J. Nutr.* 144, 681 (2014).

14. Yang P., Zhang X.Z., Zhang K., Tang Z.: *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 15958 (2015).
15. Liu H., Yao K., Zhang W., Zhou J., Wu T., He C.: *Arch. Med. Sci.* 8, 776 (2012).
16. Rapuri B., Gallagher C., Kinyamu K., Ryschon K.: *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 694 (2001).
17. Rapuri P.B., Gallagher J.C., Nawaz Z.: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 103, 368 (2007).
18. Brot C., Jorgensen N.R., Sorensen O.H.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 53, 920 (1999).
19. Shin D.Y., Kim K.J., Kim D., Hwang S., Lee E.J.: *Yonsei. Med. J.* 55, 476 (2014).
20. Canaris G.J., Manowitz N.R., Mayor G., Ridgway E.C.: *Arch. Intern. Med.* 160, 526 (2000).
21. Chaudhary S., Dutta D., Kumar M., Saha S., Mondal S.A., Kumar A., Mukhopadhyay S.: *Indian. J. Endocrinol. Metab.* 20, 391 (2016).
22. Van Orten-Luiten A.C., Janse A., Dhonukshe-Rutten R.A., Witkamp R.F.: *Drugs. Aging.* 31, 111 (2014).

Translation of the Medical Fear Survey to Serbian: psychometric properties

Djokovic J¹, Milovanovic B¹, Milovanovic JR¹, Milovanovic O², Stojic I³, Mrvic S⁴, Kostic M¹, Stefanovic S², Jankovic SM¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology

²Department of Clinical Pharmacy

³Department of Pharmaceutical Biotechnology

Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Cardiovascular Diseases of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

Abstract

Background: Medical Fear Survey (MFS) is an instrument designed for measuring fear of medical and related treatments.

Objective: Aim of the present study was MFS translation into Serbian, measurement of its psychometric properties and MFS validation using other Blood-injury-injections and related stimuli instruments that have been translated from English into Serbian.

Method: After obtaining permission from the author of the original MFS, double forward translation from English to Serbian and backward translation to English were conducted in ten steps, according to International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research (ISPOR) guidelines. Reliability, factorial analysis and concurrent validation of Serbian version of MFS were conducted on a sample of 485 medical or pharmacy students at University of Kragujevac, Serbia.

Results: Serbian version of MFS showed high internal consistency with a Cronbach's alpha 0.968 and good temporal stability after testing-and-retesting (Spearman's correlation coefficient 0.838, and intraclass correlation coefficient 0.877). Factorial analysis confirmed the same five factors demonstrated in the original English version: fear of mutilated bodies (10 items), fear of blood (11 items), fear of injections and blood draws (9 items), fear of sharp objects (10 items), and fear of medical examinations and physical symptoms (10 items). The total score of MFS correlated significantly with the total scores of Injection Phobia Scale-Anxiety (Spearman's correlation coefficient 0.391, $p < 0.001$), Blood/Injection Fear Scale (Spearman's correlation coefficient 0.502, $p < 0.001$) and Medical Avoidance Survey (Spearman's correlation coefficient 0.396, $p < 0.001$).

Conclusions: Serbian version of the 50-item MFS showed similar psychometric properties as the original English version of this scale, with the same factorial structure. It could be used for measurement of fear of medical and related treatments in Serbian socio-cultural milieu, preferably self-administered. Hippokratia 2016, 20(1): 44-49

Keywords: Medical Fear Survey, translation, transcultural validation, Serbian

Corresponding Author: Ass.Prof. Jasmina R. Milovanovic, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica, 34000 Kragujevac, Serbia, tel: +38134306800/ext 111, fax: +38134306800, e-mail: Jasminamilo@yahoo.com

Introduction

Medical Fear Survey (MFS) is an instrument designed for measuring fear of medical and related treatments. It was developed in English language and validated in the USA in 1997 by Kleinknecht et al^{1,2}. The final form of the instrument contains five, ten-item subscales: fear of mutilated bodies, fear of blood, fear of sharp objects, fear of medical examinations, and physical symptoms and fear of injections and blood draws. It was used successfully to diagnose Blood-injury-injections and related stimuli (BIIRS) phobia and to predict which patients with BIIRS phobia will faint after exposure to these stimuli^{3,4}. Since

BIIRS phobia is highly prevalent (3-4% in general population)^{5,6}, and the patients suffering from this disorder may avoid diagnostic procedures, hospitalization and/or vital medication (with grave consequences) or faint when treated in a health facility⁷⁻⁹. MFS is an important practical instrument to detect the disorder and administer certain preventive measures when treating such patients.

Up to date, none of the instruments measuring fear of medical and related treatments or BIIRS have been translated into Serbian and tested for its psychometric properties. This leaves physicians in Serbia without a reliable

Table 1: Extracted five factors obtained by orthogonal rotation and the varimax method. Eigen values for each factor and amount of variance of MFS score explained by each factor.

Factor	Eigen value	Amount of variance explained (%)
Fear of mutilated bodies	8.399	16.799
Fear of blood	6.822	13.644
Fear of injections and blood draws	6.642	13.285
Fear of sharp objects	5.381	10.761
Fear of medical examinations and physical symptoms	5.055	10.110

Table 2: Inter-correlations between the five obtained factors. The names of the factors according to the clustered questions correspond completely to the names of five factors in the original scale.

Factor	Fear of mutilated bodies	Fear of blood	Fear of injections and blood draws	Fear of sharp objects	Fear of medical examinations and physical symptoms
Fear of mutilated bodies	1.000	0.532*	0.623*	0.417*	0.704*
Fear of blood	0.532*	1.000	0.599*	0.573*	0.486*
Fear of injections and blood draws	0.623*	0.599	1.000	0.595	0.712*
Fear of sharp objects	0.417*	0.573*	0.595*	1.000	0.548*
Fear of medical examinations and physical symptoms	0.704*	0.486*	0.712*	0.548*	1.000

*: $p < 0.001$.

tool to measure fear of medical and related treatments and diagnose BIIRS, precluding estimation of risks of treatment avoidance and fainting after treatment. Aim of the present study was MFS translation into Serbian, measurement of its psychometric properties and MFS validation using other BIIRS instruments that have been translated from English into Serbian.

Methodology

The instrument

Medical Fear Survey is a 50-item questionnaire, with each answer rated on a 5-point Likert scale, ranging from 0 to 4, reflecting minimum to maximum symptoms severity, respectively. There are no items with reversed scoring within the scale, and the total score is calculated by simple summation of scores on individual items, ranging from 0 to 200.

MFS translation

MFS translation was made according to the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research (ISPOR) guidelines^{10,11}. Permission for translation of MFS (version with 5, 10-item subscales) from English into Serbian was granted by the author of the original scale Professor Emeritus Ronald A. Kleinknecht. The original scale was first translated into Serbian by two independent translators, who were not members of the study team. One of the translators was Mrs. Dusica Lazic, lecturer of English language at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, and the other Mrs. Maja Stojanovic, court interpreter. The final Serbian version derived from the combination of the two independent translations at the meeting of the study investigators and the translators. The Serbian version was then translated back into English by Dr. Zan Friscic, native English speaker, a citizen of Aus-

tralia, who had not read the original English version of MFS. Back-translation in English was then compared with the original English version by the study investigators, and the final Serbian version of MFS was agreed at a new meeting of the investigators. The final MFS translation was then tested on ten pharmacy students (at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia) for clarity and comprehension. A few minor changes were made after this preliminary administration, and the final Serbian version of MFS was ready for reliability testing.

Sample

Final Serbian version of MFS was tested for reliability on medical and pharmacy students at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, on two occasions, on the 14th of March and the 14th of May 2014. The same sample was surveyed on both occasions, in order to check for temporal stability of the Serbian version of MFS. The sample consisted of 485 students (386 females, 99 males; 376 pharmacy students, 109 medical students). The distribution of the sample according to the year of the study was as following: 2nd year: 86, 3rd year: 173, 4th year: 176 and 5th year: 50. MFS was administered to all students present at premises of the Faculty of Medical Sciences on the first survey day (from the total of 1,145 students there were 526 present), and 485 students (92%) agreed to fill in the questionnaire. The same 485 students were then surveyed again on the second date (14th May 2014). On both occasions, the same students completed another three scales for MFS validation: Injection Phobia Scale-Anxiety (IPSA)¹², Blood/Injection Fear Scale (BIFS)¹³ and Medical Avoidance Survey (MAS)³. On the first occasion the study participants were interviewed by the investigators who then filled the questionnaires, and on the second occasion the study participants completed the questionnaires

Table 3: The distribution characteristics of the five obtained factors (ie of the MFS's subscales): mean score with standard deviation (SD), Kurtosis, Skewness and Cronbach's alpha coefficient.

Subscale	Mean score (SD)	Kurtosis	Skewness	Cronbach's alpha
Fear of mutilated bodies	11.04 (9.87)	- 0.129	0.901	0.938
Fear of blood	2.84 (5.91)	11.321	3.129	0.926
Fear of injections and blood draws	5.05 (6.30)	3.681	1.894	0.909
Fear of sharp objects	4.38 (6.34)	6.592	2.320	0.927
Fear of medical examinations and physical symptoms	5.97 (5.67)	1.783	1.316	0.892

by themselves. The study was approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (No of decision 01/4796, 12-3-2014). All procedures performed in the study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and the national research committee and with the 1964 Helsinki declaration. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Reliability testing

Reliability of the Serbian version of MFS was tested by three methods. Firstly, internal consistency was determined through calculation of Cronbach's alpha for the questionnaire as a whole. Secondly, the questionnaire was divided by the split-half method into two parts with the same number of questions (25 each), and Cronbach's alpha for each of the parts was calculated. The Spearman-Brown coefficient for the questionnaire as a whole was calculated by the Spearman-Brown "prediction" formula using the alphas for both parts, the number of questions in each part and average correlation between questions in both parts of the original questionnaire¹¹. Thirdly, the correlation between results of the Serbian version of MFS obtained from the two study periods on the same sample was calculated (Spearman's correlation coefficient and intraclass correlation coefficient) in order to test the translation for temporal stability (test-retest method).

Factorial analysis

Confirmatory factorial analysis of the Serbian version of MFS was made by the principal components method⁷. Firstly, we have used the Kaiser-Meyer-Olkin test of sampling adequacy and the Bartlett's test of sphericity to examine the suitability of the questionnaire. The factors were extracted without rotation using following criteria: the Eigenvalues ≥ 1 and Scree-plot (the extracted factors were above the "elbow" of the graph). Secondly, referent axes were rotated orthogonally, by the varimax method, and another extraction of the factors was made, using the same criteria as for the unrotated solution. Extracted factors were then compared with the factors of the original MFS, and named accordingly.

Validity

Content validity of Serbian version of MFS was tested by the three-member panel of psychiatrists from Clinic for psychiatry, Clinical Center Kragujevac. In order to make

construct validation of the Serbian version of MFS, its total score was compared and correlated with total scores of the same study participants on IPSA, BIFS and MAS. The scores were correlated by the Spearman's method since they did not follow a normal distribution. One-trait-bi-method matrix was constructed based on the results of repeated administration of the MFS, IPSA, BIFS and MAS.

Results

Reliability

At the first test, the Serbian version of MFS showed high levels of internal consistency, with a Cronbach's alpha of 0.949. After dividing MFS scale into two parts using the split-half method, Cronbach's alphas were 0.892 and 0.916; the value of Spearman-Brown coefficient for the MFS as a whole calculated from the split-half method by the Spearman-Brown "prediction" formula was 0.941. After re-testing, Cronbach's alpha was 0.968. The correlation between total scores of the study participants on the first and repeated testing was highly significant: Spearman's correlation coefficient was 0.838, $p < 0.001$, intraclass correlation coefficient for absolute agreement was 0.877 (95% confidence interval 0.555-0.946), and the mean scores (\pm standard deviation) on the first and repeated testing were 40.70 ± 26.13 and 28.91 ± 27.95 , respectively (Wilcoxon's signed rank test: $z = -13.19$, $p < 0.001$).

Factorial analysis

Kaiser-Meyer-Olkin test confirmed sampling adequacy with its value of 0.949, and the Bartlett's test of sphericity was highly significant ($\chi^2 = 18,227.519$; $df = 1225$; $p < 0.001$). After orthogonal rotation, there were five factors with similar loadings (Table 1 and Table 2), three of them consisted of 10 items, one of 9 items and one of 11 items. The names of the factors according to the clustered questions correspond completely to the names of five factors (i.e. subscales) in the original scale: fear of mutilated bodies (10 items), fear of blood (11 items), fear of injections and blood draws (9 items), fear of sharp objects (10 items) and fear of medical examinations and physical symptoms (10 items). There were only two differences between the factors of the original and the translated version. In the Serbian version, the item "seeing a preserved brain in a jar" belonged to the subscale "fear of blood" (instead of "fear of mutilated bodies" in the original scale), while the item "observing someone getting their finger stitched" belonged to the subscale "fear of mu-

Table 4: The one-trait-bi-method matrix with Spearman's correlation coefficients.

	MFS-T2	IPSA-T2	BIFS-T2	MAS-T2	MFS-T1	IPSA-T1	BIFS-T1	MAS-T1
MFS-T2	1							
IPSA-T2	0.391*	1						
BIFS-T2	0.502*	0.332*	1					
MAS-T2	0.396*	0.794*	0.339*	1				
MFS-T1	0.838*	0.320*	0.445*	0.326*	1			
IPSA-T1	0.357*	0.786*	0.281*	0.668*	0.343*	1		
BIFS-T1	0.673*	0.382*	0.583*	0.397*	0.622*	0.401*	1	
MAS-T1	0.310*	0.660*	0.267*	0.718*	0.294*	0.718*	0.357*	1

*: significant correlation, $p < 0.001$. MFS-T2: Medical Fear Survey, filled in by the study participants themselves; IPSA-T2: Injection Phobia Scale-Anxiety, filled in by the study participants themselves; BIFS-T2: Blood/Injection Fear Scale, filled in by the study participants themselves; MAS-T2: Medical Avoidance Survey, filled in by the study participants themselves; MFS-T1: Medical Fear Survey, filled in by the study investigators; IPSA-T1: Injection Phobia Scale-Anxiety, filled in by the study investigators; BIFS-T1: Blood/Injection Fear Scale, filled in by the study investigators; MAS-T1: Medical Avoidance Survey, filled in by the study investigators.

tilated bodies" (instead of "fear of injections and blood draws" in the original scale). The distribution characteristics of the MFS's subscales are shown in Table 3.

Validity

Content validity of the Serbian version of MFS was analyzed and confirmed by a three-member panel of psychiatrists at the Clinic for Psychiatry, Clinical Center Kragujevac. As of the construct validity, the total score of MFS correlated significantly with the total scores of IPSA (Spearman's correlation coefficient 0.391, $p < 0.001$), BIFS (Spearman's correlation coefficient 0.502, $p < 0.001$) and MAS (Spearman's correlation coefficient 0.396, $p < 0.001$). The one-trait-bi-method matrix is shown in Table 4.

Characteristics of the students and total score

Total score of the MFS was higher among female in comparison to male students on both tests (43.26 ± 30.15 vs. 30.15 ± 23.64 , $t = -4.463$, $p < 0.001$ at the 1st test, and 31.55 ± 28.39 vs. 19.32 ± 4.08 , $t = -4.120$, $p < 0.001$ at the 2nd). Older students also scored higher on both tests (Spearman's rho was 0.111, $p = 0.021$, and 0.125, $p = 0.010$, respectively). Pharmacy students showed higher MFS score than medical students on both tests (45.41 ± 26.65 vs. 22.88 ± 13.43 , $t = 7.762$, $p < 0.001$ at the 1st test, and 33.45 ± 29.12 vs. 12.38 ± 13.90 , $t = 6.691$, $p < 0.001$ at the 2nd).

Discussion

The Serbian version of the MFS showed high internal consistency (which is even higher when examinees fill in the questionnaire by themselves), but temporal stability cannot be taken for granted (the method of MFS administration was different between the two assessments, which led to difference in mean scores, leaving the issue of test-retest stability unresolved). Factorial analysis confirmed the same five domains (subscales) which were defined by developers of the original English scale^{1,3}. The five subscales of the Serbian version showed almost the same alpha values as the subscales of the English version, as well as similar mean scores, although the distributions of the Serbian version were somewhat more positively

skewed^{1,3}. All items belonged clearly to only one factor except the item 4 ("Addressing a nurse for help"), whose loads were equally distributed between 4th and 5th factors. However, the logic of these factors allowed the item 4 to be regarded as belonging to factor 4. Unusually high inter-correlation between factor 5 (fear of medical examinations and physical symptoms) and 1 (fear of mutilated bodies) and 3 (fear of injections and blood draws), respectively, was observed, as shown in Table 2. This could be explained with conceptual similarity since in clinical practice medical examination is associated with injections, blood draws and seeing other injured patients in a waiting room. Although the score of the Serbian version of MFS correlated satisfactorily with scores of both IPSA and MAS, the highest correlation was observed with the BIFS, a recently developed instrument for measurement of BIIRS phobia^{14,15}. The IPSA instrument showed excellent psychometric properties. Thus it could be used for the detection of BIIRS phobia¹⁶, while MAS was proven a useful addition to the original MFS instrument³. Positive and significant correlations between MFS, IPSA, BIFS and MAS scores, regardless of the method of filling in the questionnaires (see the matrix in Table 2)¹⁷, suggest that the Serbian version of MFS is a reliable instrument for measuring fear of medical and related treatments.

It was also shown that scores of self-administered MFS were significantly lower than MFS scores obtained by investigators. Taking into account that the study population consisted of relative young university students that have less experience with healthcare services than older people, together with the fact that scores obtained by self-administered questionnaires resembled scores obtained by university students that self-completed the original English version, it is suggested that MFS should be self-administered in studies of the Serbian socio-cultural milieu. Although the type of administration (self-administered vs. physician-assisted) does not usually influence questionnaires' psychometric properties^{18,19}, it might profoundly influence the results under certain circumstances as was shown in this study, obscuring the findings regarding the longitudinal stability of the instrument or posing a risk for underestimation of symptoms severity²⁰.

Adherence to injection treatment is low and rarely overrides 75% in patients with chronic therapy²¹. BIIRS phobia has a prevalence of around 3.5 %, and is an important factor associated with decreased adherence to injection therapy²²; if present and not diagnosed by the physician, BIIRS phobia may preclude treatment success, with serious consequences. The MFS scale was successfully used for diagnosing BIIRS phobia, while the recently developed short (25-item) version showed excellent psychometric properties⁴. However, up to now, there was no diagnostic instrument for BIIRS phobia available in Serbian, something that could have possibly enhanced injection treatment adherence. Translation of MFS to Serbian would hopefully improve this unfavorable situation.

The main limitation of our study was the lack of clinical evaluation of the study participants by a psychiatrist regarding the existence of fear of medical and related treatments or BIIRS phobia. Thus, criterion validity, sensitivity and specificity of MFS could not be assessed in this study. The reason for this issue was that the students who participated in the study were not willing to spend additional time for the study purposes, and limited their participation to completing questionnaires on two different time points. Second, although convergent validity was assessed by means of investigation for correlations with relevant validated scales, divergent validity (e.g. comparison with a scale measuring other phobias – not medically oriented) was not. Another limitation of our study was that the method of MFS administration was different between the two assessments (physician-administered vs. self-administered), representing an important confounding factor. Thus, test-retest reliability was not tested appropriately in this study, since the external factors were altered. On the other hand, the observed difference in mean scores with two methods of MFS administration reveals that there is a risk for potentially significant underestimation of symptoms severity when the questionnaire is self-administered.

Another limitation of our study is the unresolved issue of generalizability, i.e. applicability of the instrument in other samples. This sample was relatively young (medical students), and males were underrepresented (20.4 %). Although such a sample recruitment might be a relatively common practice - also applied in the original validation study - it raises some concern regarding the generalizability of the findings and the applicability of the instrument in other samples. Future studies in samples from different populations should verify the psychometric properties of the instrument in certain settings. Finally, the responsiveness of the instrument (sensitivity to change) also remains to be confirmed in future clinical studies.

In conclusion, the Serbian version of the 50-item MFS showed similar psychometric properties as the original English version, with the same factorial structure. It could be used for measurement of fear of medical and related treatments in Serbian socio-cultural milieu, preferably self-administered. Its diagnostic value for BIIRS phobia detection remains to be elucidated by future studies of patients with clinical diagnosis of BIIRS phobia.

Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor Ronald A. Kleinknecht, Department of Psychology, Western Washington University, Bellingham, USA, for his unconditional permission to translate the MFS to Serbian and use the translation for research and teaching purposes. This study was partially supported by grant No 175007 from Ministry of Education, Republic of Serbia, and by grant No 404 from Ministry of Science, Montenegro.

References

1. Kleinknecht RA, Kleinknecht EE, Thorndike RM. The role of disgust and fear in blood and injection-related fainting symptoms: a structural equation model. *Behav Res Ther.* 1997; 35: 1075-1087.
2. Borda Mas M, Lopez Jimenez AM, San Gregorio APM. Blood-injection Phobia Inventory (BIPI): Development, reliability and validity. *Anales de Psicología.* 2010; 26: 58-71.
3. Kleinknecht RA, Thorndike RM, Walls MM. Factorial dimensions and correlates of blood, injury, injection and related medical fears: cross validation of the medical fear survey. *Behav Res Ther.* 1996; 34: 323-331.
4. Olatunji BO, Ebesutani C, Sawchuk CN, McKay D, Lohr JM, Kleinknecht RA. Development and initial validation of the medical fear survey-short version. *Assessment.* 2012; 19: 318-336.
5. Wani AL, Ara A, Bhat SA. Blood injury and injection phobia: the neglected one. *Behav Neurol.* 2014; 2014: 471340.
6. Pitkin M, Malouff JM. Self-arranged for overcoming blood-injection-injury Phobia: a case study. *Health Psychol Behav Med.* 2014; 2: 665-669.
7. Ferenidou F, Chalimourdas T, Antonakis V, Vaidakis N, Papadimitriou G. Combined Case of Blood-Injury-Injection Phobia and Social Phobia: Behavior Therapy Management and Effectiveness through Tilt Test. *Case Rep Psychiatry.* 2012; 2012: 368039.
8. Ayala ES, Meuret AE, Ritz T. Treatments for blood-injury-injection phobia: a critical review of current evidence. *J Psychiatry Res.* 2009; 43: 1235-1242.
9. Ducasse D, Capdevielle D, Attal J, Larue A, Macgregor A, Britner M, et al. [Blood-injection-injury phobia: Physiochophysiological and therapeutical specificities]. *Encephale.* 2013; 39: 326-31.
10. Wild D, Grove A, Martin M, Eremenco S, McElroy S, Verjee-Lorenz A, et al; ISPOR Task Force for Translation and Cultural Adaptation. Principles of Good Practice for the Translation and Cultural Adaptation Process for Patient-Reported Outcomes (PRO) Measures: report of the ISPOR Task Force for Translation and Cultural Adaptation. *Value Health.* 2005; 8: 94-104.
11. Streiner DL, Norman GR. Base concepts. Streiner DL, Norman GR (eds). *Health measurement scales - a practical guide to their development and use.* 4th edition, Oxford University Press, Oxford, 2008, 5-15.
12. Vika M, Skaret E, Raadal M, Ost LG, Kvale G. Fear of blood, injury, and injections, and its relationship to dental anxiety and probability of avoiding dental treatment among 18-year-olds in Norway. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18: 163-169.
13. Kose S, Mandiracioglu A. Fear of blood/injection in healthy and unhealthy adults admitted to a teaching hospital. *Int J ClinPract.* 2007; 61: 453-457.
14. Carleton RN, Thibodeau MA, Teale MJ, Welch PG, Abrams MP, Robinson T, et al. The center for epidemiologic studies depression scale: a review with a theoretical and empirical examination

- of item content and factor structure. *PLoS One*. 2013; 8: e58067.
15. Ritz T, Meuret AE, Ayala ES. The psychophysiology of blood-injection-injury phobia: looking beyond the diphasic response paradigm. *Int J Psychophysiol*. 2010; 78: 50-67.
 16. Olatunji BO, Sawchuk CN, Moretz MW, David B, Armstrong T, Ciesielski BG. Factor structure and psychometric properties of the injection phobia scale-anxiety. *Psychol Assess*. 2010; 2: 167-179.
 17. Meyer JF, Frost RO, Brown TA, Steketee G, Tolin DF. A Multi-trait-Multimethod Matrix Investigation of Hoarding. *J Obsessive Compuls Relat Disord*. 2013; 2: 273-280.
 18. Agustí A, Soler-Cataluña JJ, Molina J, Morejon E, Garcia-Losa M, Roset M, et al. Does the COPD assessment test (CAT(TM)) questionnaire produce similar results when self- or interviewer administered? *Qual Life Res*. 2015; 24: 2345-2354.
 19. Puhan MA, Behnke M, Frey M, Grueter T, Brandli O, Lichtenschopf A, et al. Self-administration and interviewer-administration of the German Chronic Respiratory Questionnaire: instrument development and assessment of validity and reliability in two randomised studies. *Health Qual Life Outcomes*. 2004; 2: 1.
 20. Jindal T, Sinha RK, Mukherjee S, Mandal SN, Karmakar D. Mis-interpretation of the international prostate symptom score questionnaire by Indian patients. *Indian J Urol*. 2014; 30: 252-255.
 21. Kalincik T, Spelman T, Trojano M, Duquette P, Izquierdo G, Grammond P, et al; MSBase Study Group. Persistence on therapy and propensity matched outcome comparison of two subcutaneous interferon beta 1a dosages for multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013; 8: e63480.
 22. McMurtry CM, Noel M, Taddio A, Antony MM, Asmundson GJ, Ridell RP, et al. Interventions for Individuals With High Levels of Needle Fear: Systematic Review of Randomized Controlled Trials and Quasi-Randomized Controlled Trials. *Clin J Pain*. 2015; 31: S109-S123.

LETTER TO THE EDITOR

PHD STUDENTS' AWARENESS OF RESEARCH MISCONDUCT

Recent articles in *Journal of Empirical Research on Human Research Ethics* about researcher perceptions of research misconduct inspired me to think about effective ways to improve the teaching of ethics to our PhD students. I recognized that lecturing about research misconduct would be less effective than a class discussion in which students raised issues of research misconduct. The student discussion could then be followed by my presentation of material related to the issues students raised. I have found a method of teaching about research ethics that seems to work well and wanted to share it with *JERHRE's* readership.

To get the discussion started, I devised an informal discussion group of 24 students from the second year of our PhD program, Clinical and Experimental Pharmacology, at our Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. There were 8 male and 16 female students; the average age was 29 years. Two discussion group meetings were held. In preparation for the first meeting, I made a list of the 15 most deleterious forms of research misconduct stated in the Singapore Statement on Research Integrity (2010) and the European Code of Conduct for Research Integrity (2011), and kept it out of sight of the students until the second meeting. Interestingly, all of the 15 forms of misconduct are ones I had encountered at least once during my university career.

During the first discussion group meeting, I encouraged the students to freely express their knowledge and opinions about research misconduct and to name, as precisely as possible, all of the kinds of research misconduct they knew about or could imagine. After each student mentioned a form of research misconduct, I helped the student to define it more precisely until their description closely resembled one of the 15 forms of misconduct mentioned in the Singapore Statement on Research Integrity or the European Code of Conduct for Research Integrity. At the second meeting, the students were presented with the full list of the 15 research misconduct forms, and necessary explanations were given.

During the first meeting, the students identified nine of 15 kinds of research misconduct. Seven of the nine kinds were recognized by all. Students identified as unethical behavior the following: *plagiarism,*

falsification, fabrication of results, research subject disrespect, biased methodology and research results representation, research sabotage, concealment of conflict of interest, unfair author designation, and author's incompetent public appearance. When compared with the list of 15 major research misconduct forms from the international research misconduct guidelines, the students failed to recognize as research misconduct the following: *using unreliable research methodology and avoiding predetermined research procedures, lack of transparency in research, failing to report on a concrete research misconduct incident, deliberate destruction of research records, inappropriate paper review or rejection to undertake the review, and failure to acknowledge potential bad consequences of research on society.*

Interestingly, all of the students agreed that they had been completely unaware that those six kinds of research behavior were considered research misconduct, although they had already experienced some of them, and could understand why they did indeed constitute misconduct.

In summary, more than one third of the kinds of research misconduct identified in the Singapore Statement or European Code of Conduct were not recognized as misconduct by our PhD students, although all of them had formal education on ethics in research in the preceding year. The discussion group members endorsed my proposal to improve students' understanding of research ethics by: (a) further development of the PhD course "Ethics in Research," (b) development of guidelines regarding ethical behavior of researchers, and (c) more intensive engagement of tutors in providing key information about research misconduct to PhD students.

The only two previously published studies on awareness of PhD students about research misconduct forms were conducted in Norway (189 students filled out a questionnaire) and Turkey (143 students filled out a questionnaire) (Arda, 2011; Hofmann, Myhr, & Holm, 2013). In both of those studies PhD students were unable to identify the same forms of research misconduct that our students failed to identify, except for willingness to report misconduct to competent authority, which was recognized by the students from Norway.

It is apparent that our PhD students need more specific education about the various kinds, extent, and meaning of research misconduct. The same conclusion was drawn from a recent survey of knowledge and attitudes toward ethical principles of science conducted among 361 PhD students from Serbia (Vuckovic-Dekic et al., 2011). The major emphasis on blatant misconduct (fabrication, falsification, and plagiarism) has tended to obscure some more subtle but equally harmful errors or omissions in researchers' assessment of potentially harmful research behavior. As our discussion group suggested, the best way to increase knowledge about research misconduct is to invest heavily in creating a culture of high research ethics standards within their academic program.

The students who participated in this informal study also devised it with me and participated in authoring this letter.

MILOS BOSKOVIC, JELENA DJOKOVIC, IVA GRUBOR,
VLADIMIR GUZVIC, BOZIDAR JAKOVLJEVIC,
MILENA JURISEVIC, DANIJELA LJUBISIC,
MARINA MIJAJLOVIC, IVANA MILICEVIC,
MILICA MILOVANOVIC, LJILJANA NIKOLIC, MILOS
NIKOLIC, SASA PERIC, ANA PETROVIC,
JELENA PETROVIC, KATARINA RADONJIC,
LJUBICA SIMONOVIC, MARKO SIMOVIC,
STEFAN STOJANOVIC, ISIDORA STOJIC,
JOVICA TOMOVIC, SANDRA VRANIC,
KSENIJA VUCICEVIC, ANDJELA ZDRAVKOVIC,
AND SLOBODAN JANKOVIC*

*Address correspondence to: Slobodan Jankovic,
Faculty of Medical Sciences, University of
Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Svetozara
Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia.
E-MAIL: slobodan.jankovic@medf.kg.ac.rs

References

- ARDA, B. (2011). Publication ethics from the perspective of PhD students of health sciences: A limited experience. *Science and Engineering Ethics, 18*(2), 213–222.
- European Science Foundation. (2011). *The European code of conduct for research integrity*. Available online at http://www.nsf.gov/od/oise/Code_Conduct_ResearchIntegrity.pdf.
- HOFMANN, B., MYHR, A., & HOLM, S. (2013). Scientific dishonesty: A nationwide survey of doctoral students in Norway. *BMC Medical Ethics, 14*(1), 3.
- Singapore Statement on Research Integrity. (2010). Paper presented at the 2nd World Conference on Research Integrity, July 21–24, 2010, Singapore. Available online at <http://www.singaporestatement.org/statement.html>.
- VUCKOVIC-DEKIC, L., GAVRILOVIC, D., KEZIC, I., BOGDANOVIC, G., & BRKIC, S. (2011). Science ethics education, part I: Perception and attitude toward scientific fraud among medical researchers. *Journal of BUON, 16*(4), 771–777.

Copyright of Journal of Empirical Research on Human Research Ethics is the property of University of California Press and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.



Original article

Factors Influencing the Fear of Needles among Students of Medicine and Pharmacy

Boban Milovanović, Dušan Tomović, Slobodan M. Janković, Iva Grubor, Ljiljana Nikolić, Miloš Nikolić, Marina Mijajlović, Strahinja Mrvić, Ana Divjak, Andjela Milojević, Jelena Djoković, Andjelka Prokić, Andriana Bukonjić, Marija Sekulić, Vesna Matić, Djordje Vukmirović, Bojan Rakonjac, Tanja Dimitrijević, Nataša Nikolić, Dragutin Jovanović, Jelena Milovanović, Marija Ratković, Nevena Barudžić, Nenad Mladenović, Milan Milutinović, Ana Antanasković, Milena Nikolić

University of Kragujevac, Faculty of Medical science, Kragujevac, Serbia

SUMMARY

Fear of needles can significantly limit professional and social functioning of a person, and is highly prevalent in general population (4%).

The aim of our study was to reveal risk factors that are associated with fear of needles among healthy university students of medicine and pharmacy.

The study was of a cross-sectional type. In total, 301 students of medicine or pharmacy (82% female and 18% male) attending from 1st to 5th year of study were surveyed at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The students were surveyed using a questionnaires (scales) for assessing the fear of needlessness, a visual analog scale for self-assessment intensity of the fear of needlessness, and a general questionnaire with questions about socio-demographic characteristics of the participants. Using a score on the scales as out-come variables, multiple regressions were employed to reveal factors that may influence the fear of needles.

Average values of Blood/Injection Fear Scale, Injection Phobia Scale-Anxiety and Medical Avoidance Survey scores were 7.89 ± 9.48 , 4.46 ± 5.18 and 89.95 ± 12.73 , respectively. The following factors affected significantly the score of the scales: course of study, chronic disease in the family, fear of a dentist, smell of the room phobia, sound phobia, score on the Beck's anxiety scale and fear of a situation when medical staff give an injection. The presence of chronic disease in the family was a protective factor, while the other six factors were contributing to the fear of needles.

Fear of needles is more prevalent among the students of pharmacy than among the students of medicine. It is less frequent among students with chronic disease in their family, while fear of dentist, smell of the room phobia, sound phobia, general anxiety and fear from the situation when medical staff give an injection are all factors that predispose students of medicine or pharmacy to develop fear of needles.

Key words: fear of needles, risk factors, university students, medicine, pharmacy

Corresponding author:

Slobodan M. Janković

E-mail: slobodan.jankovic@medf.kg.ac.rs

INTRODUCTION

Injections have very important role in the medical care (1, 2). It has been estimated that about 12 billion injections and 100 million vaccines are administered annually to children worldwide. This undoubtedly indicates the great importance of recognizing fear of needles, because it can be an obstacle in providing adequate medical care (1). This problem is especially present in specific populations such as diabetics and pregnant women. Among diabetics with a fear of needles, the risk of macrovascular complications is increased, while pregnant women with this fear show a tendency of avoiding regular controls which may include taking samples by using needles (1, 3).

Fear of needles, blood and injuries is viewed as unique entity and represents an anxiety disorder. About 4% of the population in the United States suffers from this specific phobia. According to DSM-IV-TR Classification of Diseases, perception of receiving injection or venous puncture as terrifying stimulus is considered excessive and incomprehensible. A person is intensively anxious and stressed after encountering a phobic object (e.g. blood) or situation (e.g. going to a doctor) (4, 5). Unreasonable and disproportional fear of needles is called belonephobia (6). This type of phobia is often accompanied with vasovagal syncope triggered by the "threatening" stimulus (2).

The phobia of needles, blood and injuries can significantly limit professional and social functioning of a person. This disorder can have serious health consequences such as avoidance of necessary medical care (including medical examinations, life-saving surgical procedures, management of chronic diseases), complications in carrying out parental duties (e.g. problems in perinatal care) and restrictions in choosing potential occupations (e.g. exclusion of health-related professions) (1, 2). This phobia is more frequent among the descendants of a phobic person, which points to the genetic basis of this disorder (7).

The patients with this kind of problem often have fainting spells, and manifestations of the fear of needles can be provoked by traumatic event which occurred in the previous five years. The prevalence of fear of needles, blood and injuries is lower among the elderly, while it is higher among females and those with lower educational status (1, 3).

Fear of needles usually has its origin in childhood. Among the university students, this phobia is not expected to be encountered if it had not been mani-

festated until then. The exception is made by students who had painful experience during administration of injections or had been exposed to a traumatic event (8). In the studies of Domoto PK et al. and Rao et al., it was found that fear of going to the dentist is primarily conditioned by fear of needles and drills in dentist's practice, and it is encountered in 6-51% of university students (9, 10). The results of the study by Yelland M et al. show that the fear of needles was present in 30.8% of persons between 18 and 29 years of age (1). Individuals who have this fear should receive special attention of treating physicians.

The aim of our study was to reveal risk factors that are associated with the fear of needles among healthy university students of medicine and pharmacy

MATERIAL AND METHODS

The study design

The study was of a cross-sectional type. It was conducted as a one-day survey of a sample of students of medicine and pharmacy from the first to the fifth year of study. The sample consisted of all students who were attending the classes on the survey day. The study was approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

The study population

Potential participants of our study were among 1.400 students of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. In total, 301 students were present at the Faculty's premises on the survey day, and they comprised the study sample. The students were surveyed using the questionnaires (scales) for assessing the fear of needles, by the visual analog scale for the self-assessment of intensity of the fear of needles and by general questionnaire with questions about socio-demographic characteristics of the participants.

The study variables

The study outcomes (dependent variables) were scores on the following scales: Blood/Injection Fear Scale (11), Injection Phobia Scale-Anxiety (12) and Medical Avoidance Survey (13).

Blood/Injection Fear Scale (B/IF) (11) consists of two parts. The first part contains questions about 19

different situations and estimates the extent of avoidance of these situations. The second part of the scale assesses the fear of needles and/or blood and contains 20 questions.

Injection Phobia Scale-Anxiety (IPSanx)(12) is the scale with 18 questions which assess the anxiety during the application of injections or vein punctures.

Medical Avoidance Survey (IPSavo)(13) is a scale with 21 questions where respondents assess their fear related to the avoidance of certain procedures. In this scale, six questions are related to the fear of injections, blood and injuries with the following serial numbers in the original scale: 1, 5, 7, 8, 14 and 15.

Potentially independent and confounding variables followed in the study were: sex, age, years of study, type of study program (medicine or pharmacy), average grade on studies, experiencing fear in childhood by themselves or by family member(s), environment where a student live (urban/rural), financial status, physical activity, current alcohol use, experience with diseases, mental health, score on the Beck's depression scale (14), score on the Beck's anxiety scale (15), early alcohol abuse, alcohol dependence, nicotine addiction, presence of some form of mood or somatic disorders, and exposure to a traumatic event in the past.

Statistical analysis

The data were primarily processed by descriptive statistics. Continuous variables were presented by means \pm SD, while the categorical variables were presented by percentages. Normality of the data distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov test. If normality was confirmed, a Student's T-test was used to compare the study groups. Otherwise, nonparametric Mann Whitney U test was used. If variables were categorical, we used the χ^2 test to determine differences between the study groups. A multiple regression model was used to identify factors that were related to the fear of injection. The following parameters of analysis were monitored: 95% confidence interval for B coefficients, R square and value of F test. The results were considered significant if probability of null hypothesis was less than 0.05. All calculations were performed by statistical software SPSS for Windows 18.00.

RESULTS

In total, 301 students were included in the study. Average values of IPSanx, IPSavo and B/IF scale scores were 7.89 ± 9.48 , 4.46 ± 5.18 and 89.95 ± 12.73 , respecti-

vely. Personal characteristics of the participants and average IPSanx, IPSavo and B/IF scores according to these characteristics are shown in the Table 1, including average score on the Beck's anxiety scale and average score on the Beck's depression scale.

The multiple linear regression analysis using all 24 variables listed in the Table 1 as independent variables in relation to the score of each of these three scales (IPSanx, IPSavo and B/IF) as dependent variables (the "backward" method was employed), resulted with three regression models. All three models are shown in Tables 2, 3 and 4.

From the initial 24 variables, 8 independent variables (course of the study, chronic disease in the family, needle phobia in childhood, fear of the dentist, smell of the room phobia, sound phobia, score on the Beck's anxiety scale (14) and when medical staff gives the injection fear) entered the final multiple regression model with IPSanx score as dependent variables. The excluded variables were: physical activity, score on the Beck's depression scale (15), number of received injections during life, received intramuscular injection, chronic disease, smoking, age of the medical staff who gives the injection, year of study, received intravenous injection, received subcutaneous injection, the last received injection, surgery, sex, average grade, age and needle phobia in the family. R square was 0.470, the adjusted R square was 0.452 and the value of F test was 27.030 ($p=0.000$).

Final multiple regression model with IPSavo score as a dependent variable, from the initial 24, included 11 independent variables: course of study, average grade, smoking, chronic disease in the family, needle phobia in childhood, needle phobia in the family, fear of the dentist, smell of the room phobia, sound phobia, score on the Beck's anxiety scale (14) and when medical staff gives the injection fear. The excluded variables were: physical activity, score on the Beck's depression scale (15), number of received injections during life, received intramuscular injection, chronic disease, age of the medical staff who gives the injection, year of the study, received intravenous injection, received subcutaneous injection, the last received injection, surgery, sex, average grade and age. However, according to t-test and 95% confidence interval for B coefficients, B coefficients for 4 of those 11 independent variables were not statistically significant: average grade, smoking, needle phobia in childhood and needle phobia in the family, so we excluded them as factors that are related to the fear of injection. R square was 0.502, and the adjusted square was 0.479. Value of F test was 22.160 ($p=0.000$).

Table 1. Average IPSanx, IPSavo and B/IF scores according to the study group characteristics.

VARIABLE	NUMBER(%) or MEAN ± SD	INJECTION PHOBIA ANXIETY scale score (mean ± SD)	P value	INJECTION PHOBIA AVOIDANCE scale score (mean ± SD)	P value	BLOOD/INJECTION FEAR scale score (mean ± SD)	P value
Sex							
Male	54 (17.9%)	5.56 ± 6.35	0.057	3.35 ± 4.10	0.140	93.96 ± 9.09	0,004*
Female	247 (82.1%)	8.40 ± 9.97		4.70 ± 5.37		89.07 ± 13.24	
Age	21.58 ± 1.79	/	0.705	/	0.909	/	0.277
Year of study	2.71 ± 1.24	/	0.613	/	0.501	/	0.528
Course of study							
Pharmacy	252 (83.7%)	8.83 ± 10.02	0.000*	5.00 ± 5.41	0.000*	88.74 ± 13.45	0.000*
Medicine	49 (16.3%)	3.06 ± 2.89		1.63 ± 2.22		96.16 ± 4.14	
Average grade	8.50 ± 0.80	/	0.005*	/	0.001*	/	0.019*
Smoking							
yes	41 (13.7%)	6.05 ± 6.29	0.699	3.24 ± 3.47	0.288	91.95 ± 9.88	0.788
no	259 (86.3%)	8.13 ± 9.85		4.60 ± 5.35		89.7 ± 13.09	
Physical activity							
rarely than once per week	92 (30.6%)	7.61 ± 9.90	0.017*	4.38 ± 5.23	0.003*	90.8 ± 12.4	0.096
once per week	86 (28.6%)	9.28 ± 8.95		5.34 ± 4.91		87.55 ± 14.33	
2 or 3 times per week	96 (31.9%)	7.98 ± 10.29		4.38 ± 5.61		90.8 ± 12.05	
daily	27 (9%)	4.11 ± 4.09		2.19 ± 3.54		93.19 ± 9.74	
Surgery							
yes	102 (34%)	6.85 ± 8.58	0.140	3.86 ± 4.84	0.163	90.74 ± 11.51	0.762
no	198 (66%)	8.42 ± 9.91		4.76 ± 5.35		89.53 ± 13.35	
Chronic disease							
yes	8 (2.7%)	5.63 ± 6.82	0.475	2.50 ± 3.46	0.233	94.75 ± 3.85	0.630
no	293 (97.3%)	7.95 ± 9.54		4.51 ± 5.22		89.82 ± 12.86	
Chronic disease in the family							
yes	136 (45.3%)	6.29 ± 8.03	0.038*	3.48 ± 4.26	0.010*	92.43 ± 9.80	0.015*
no	164 (54.7%)	9.16 ± 10.38		5.25 ± 5.74		87.95 ± 14.45	
Needle phobia in childhood							
yes	166 (55.1%)	10.77 ± 11.29	0.000*	5.94 ± 5.86	0.000*	86.36 ± 14.60	0.000*
no	135 (44.9%)	4.36 ± 4.66		2.63 ± 3.44		94.36 ± 8.03	
Needle phobia in the family							
yes	99 (33.2%)	9.55 ± 10.43	0.012*	5.41 ± 5.70	0.032*	87.79 ± 14.53	0.096
no	195 (65.4%)	6.69 ± 8.59		3.81 ± 4.72		91.39 ± 11.15	
I do not know	4 (1.3%)	14.75 ± 14.36		6.75 ± 6.41		81.75 ± 24.84	
Fear of the dentist							
almost never present	127 (42.2%)	4.63 ± 7.07	0,000*	2.60 ± 3.87	0.000*	93.76 ± 8.87	0.000*
quite rarely present	70 (23.3%)	8.17 ± 8.62		4.03 ± 4.74		90.96 ± 12.47	

rarely present							
often present	39 (13%)	10,46 ± 8,99		6.38 ± 5.32		87.64 ± 12.06	
almost always	44 (14.6%)	9.25 ± 8.76		6.05 ± 4.95		86.30 ± 13.69	
present	21 (7%)	19.00 ± 15.58		10.19 ± 7.39		75.52 ± 19.09	
<u>Last received injection</u>							
never	10 (3.4%)	4.50 ± 4.79		2.90 ± 3.18		92.80 ± 8.99	
a couple of months to one year before	86 (29.5%)	7.24 ± 9.03		4.21 ± 5.21		91.21 ± 11.17	
before 2 to 10 years	106 (36.3%)	8.66 ± 11.23	0.401	4.72 ± 5.41	0.665	88.24 ± 14.95	0.411
before 10 years and more	72 (24.7%)	7.06 ± 7.48		3.83 ± 4.47		91.53 ± 11.47	
I do not remember	18 (6.2%)	10.35 ± 9.76		5.94 ± 6.68		88.33 ± 12.55	
<u>Number of received injections during life</u>							
never	9 (3.2%)	4.22 ± 4.99		2.89 ± 3.37		92.89 ± 9.53	
less than 10 times	145 (50.9%)	7.66 ± 9.91	0.511	4.01 ± 4.93	0.433	90.59 ± 12.52	0.878
a couple of tenth times	64 (22.5%)	8.86 ± 10.15		5.31 ± 5.93		87.58 ± 16.49	
more than 100 times	34 (11.9%)	5.71 ± 5.16		3.29 ± 3.58		92.06 ± 8.6	
I do not know	33 (11.6%)	8.03 ± 8.27		4.85 ± 5.47		91.27 ± 10.47	
<u>Received intramuscular injection</u>							
yes	257 (85.4%)	7.56 ± 9.43	0.047*	4.22 ± 5.13	0.029*	89.98 ± 13.08	0.315
no	44 (14.6%)	9.80 ± 9.65		5.84 ± 5.31		89.77 ± 10.57	
<u>Received intravenous injection</u>							
yes	68 (22.6%)	6.18 ± 6.70	0.226	3.62 ± 4.19	0.238	91.63 ± 10.76	0.221
no	233 (77.4%)	8.39 ± 10.11		4.70 ± 5.42		89.46 ± 13.23	
<u>Received subcutaneous injection</u>							
yes	74 (24.6%)	8.09 ± 8.67	0.235	4.45 ± 4.68	0.470	91.12 ± 11.33	0.531
no	227 (75.4%)	7.82 ± 9.75		4.46 ± 5.35		89.57 ± 13.15	
<u>Smell of the room phobia</u>							
yes	78 (25.9%)	13.94 ± 12.90	0.000*	7.72 ± 6.22	0.000*	82.33 ± 15.93	0.000*
no	223 (74.1%)	5.76 v 6.79		3.31 ± 4.22		92.65 ± 10.13	
<u>Sound phobia</u>							
yes	40 (13.3%)	18.40 ± 13.25	0.000*	10.40 ± 6.82	0.000*	75.60 ± 17.24	0.000*
no	261 (86.7%)	6.27 ± 7.59		3.54 ± 4.21		92.15 ± 10.28	
Score on the Beck's anxiety scale	10.41 ± 9.36	/	0.000*	/	0.000*	/	0.000*
Score on the Beck's depression scale	5.65 ± 5.59	/	0.000*	/	0.000*	/	0.000*

Age of the medical staff who gives the injection fear							
yes	49 (16.3%)	13.51 ± 12.05	0.000*	7.78 ± 6.22	0.000*	82.12 ± 14.41	0.000*
no	252 (86.7%)	6.79 ± 8.49		3.81 ± 4.71		91.47 ± 11.81	
When medical staff gives the injection fear							
yes	152 (50.5%)	11.82 ± 11.23	0.000*	6.80 ± 5.81	0.000*	83.79 ± 14.68	0.000*
no	149 (49.5%)	3.85 ± 4.56		2.07 ± 2.93		96.23 ± 5.46	

Eight dependent variables (course of study, chronic disease in the family, needle phobia in the family, fear of the dentist, smell of the room phobia, sound phobia, score on the Beck's anxiety scale (14) and when medical staff gives the injection fear) entered the final regression model with B/I F scale score as dependent variables. The excluded variables were: physical activity, score on the Beck's depression scale (15), number of

received injections during life time, received intramuscular injection, chronic disease, smoking, age of the medical staff that give the injection, year of the study, received intravenous injection, received subcutaneous injection, the last received injection, surgery, sex, average grade, age and needle phobia in childhood). The R square was 0.468, and the adjusted R square was 0.450. Value of F test was 26.888 (p = 0.000).

Table 2. The multiple linear regression model with IPSanx scale score as a dependent variable

VARIABLE	COEFFICIENT (b)	STANDARDIZED COEFFICIENT (β)	P value (for b)	95% CONFIDENCE INTERVAL (for b)
Constant	-2.782	1.380	0.045	-5.501 – (-0.064)
Course of study	3.124	1.177	0.008	0.805 – 5.442
Chronic disease in the family	-1.944	0.899	0.032	-3.714 – (-0.174)
Needle phobia in childhood	2.210	0.957	0.022	0.325 – 4.095
Fear of the dentist	1.454	0.354	0.000	0.756 – 2.152
Smell of the room phobia	3.036	1.129	0.008	0.812 – 5.260
Sound phobia	5.952	1.457	0.000	3.083 – 8.822
Beck's anxiety scale	0.219	0.048	0.000	0.124 – 0.314
When medical staff gives the injection fear	4.154	0.968	0.000	2.248 – 6.059

When we compare all independent variables which entered these three final regression models, we can see that the same seven independent variables were included in each of all these three different regression

models. In the other words, by using three different scales which detect fear of injection, we revealed 7 factors that were always related to the fear of injection, and those are: course of study, chronic disease in the

family, fear of the dentist, smell of the room phobia, sound phobia, score on the Beck's anxiety scale (anxiety detected by this scale) (14) and fear of the situation when medical staff give an injection. Only one of the seven factors was protective (chronic

disease in the family), i.e. it was negatively correlated with the fear of injections in all three models. The other 6 factors were positively correlated with the fear of injections, so we can say that these factors are the contributing ones

Table 3. The multiple linear regression model with IPSAvo scale score as a dependent variable

VARIABLE	COEFFICIENT (b)	STANDARDIZED COEFFICIENT (β)	P value (for b)	95% CONFIDENCE INTERVAL (for b)
Constant	3.793	2.814	0.179	-1.749 – 9.336
Course of study	1.487	0.631	0.019	0.244 – 2.730
Average grade	-0.581	0.305	0.058	-1.181 – 0.020
Smoking	-1.224	0.667	0.068	-2.539 – 0.090
Chronic disease in the family	-1.273	0.473	0.008	-2.204 - (-0.341)
Needle phobia in childhood	0.963	0.518	0.064	-0.057 – 1.983
Fear of the dentist	0.751	0.189	0.000	0.380 – 1.123
Smell of the room phobia	1.383	0.594	0.021	0.214 – 2.552
Sound phobia	2.717	0.787	0.001	1.167 – 4.267
Beck's anxiety scale	0.113	0.026	0.000	0.062 – 0.163
When medical staff give the injection fear	2.674	0.508	0.000	1.673 – 3.675

DISCUSSION

Our study showed that the course of study was one of the risk factors which contributed to the fear of injections: students of pharmacy had significantly higher level of fear of injection than students of medicine. Although variations in fear of injections among student of medicine and pharmacy were not studied in other populations, this finding is somewhat in accordance with the study which showed that medical students have less fear of dentist than students of dentistry (10). Taking into account that needle is one of the most important fear-provoking stimulus related to the fear of dentist (9), we suppose that medical students had lower level of fear of injection because during their studies they were exposed to many situations

that involve injection procedures, unlike pharmacy students.

Several authors reported previously that individuals with chronic disease(s) have less fear of some medical procedures, including the ones that involve injections (16, 17). We came to similar conclusion in our study, since students with at least one member of the family with chronic disease had lower levels of fear of injections. The explanation of this phenomenon might be that people with chronic disease have to adapt to more stressful situations than healthy people and to withstand many painful medical procedures; they do that by using coping as their main strategy (16).

Although many earlier studies found that females are more likely to have needle phobia (1-3, 5,

13, 18, 19), we did not encounter such differences between males and females in our study. The explanation may lie in the fact that participants in our study were students of medicine or pharmacy, so the level and type of education probably were key factors responsible for the absence of difference in needle phobia level among respondents, in regard to their sex. This explanation is supported by findings of some studies

that the level of education was inversely correlated with the level of needle phobia (3, 11, 18).

One study reported that dental anxiety was not related to needle phobia, but that research included population of children from 7 to 11 years old (20). On the contrary, the results of our study showed that students of medicine or pharmacy who have dental anxiety are also very likely to suffer from needle phobia.

Table 4. The multiple linear regression model with B/I F scale score as a dependent variable

VARIABLE	COEFFICIENT (b)	STANDARDIZED COEFFICIENT (β)	P value (for b)	95% CONFIDENCE INTERVAL (for b)
Constant	103.641	1.891	0.000	99.916 – 107.366
Course of study	-3.448	1.644	0.037	-6.687 – (-0.210)
Chronic disease in the family	3.164	1.255	0.012	0.692 – 5.635
Needle phobia in the family	-2.515	1.235	0.043	-4.947 – (-0.083)
Fear of the dentist	-1.702	0.497	0.001	-2.681 – (-0.723)
Smell of the room phobia	-4.223	1.558	0.007	-7.292 – (-1.155)
Sound phobia	-6.873	2.073	0.001	-10.956 – (-2.790)
Beck's anxiety scale	-0.266	0.0067	0.000	-0.398 – (-0.133)
When medical staff give the injection fear	-9.067	1.321	0.000	-11.669 – (-6.464)

Considering that one in four adults reports clinically significant fear of dental injections (21, 22) and that the needle and the drill were the most prominent fear-provoking stimuli (9,10), a connection between dental anxiety and needle phobia may be explained by fear of dental injections. In order to decrease recruiting patients with needle phobia, dental office and a room where the injections are given should not be set close to each other, and common waiting room for these two offices should be avoided. Blood-injection-injury phobia is one of the five subtypes of specific phobia (5,23-25). Some of the studies investigated relations between specific phobia and generalized anxiety disorder and showed that in many cases a specific phobia was associated with generalized anxiety (5, 18, 26). In accordance with these results, our study also showed that blood-injection-injury phobia was

significantly correlated with generalized anxiety, which was measured by the Beck's anxiety scale (14). Taking into consideration these findings some authors suggested certain types of psychological treatments of patients with needle phobia to achieve a decrease in the anxiety level, and therefore to extenuate needle phobia in these patients (6, 12, 22, 27, 28). Some other authors even recommended oral premedication with benzodiazepines, or some other anti-anxiety agents to avoid the development of needle phobia in stressful situations, involving blood, injections of injuries (7, 27).

It was pointed out previously that specific smell of the room was closely related to the needle phobia (19, 29), and our study came to the same conclusion. Specific smell of the room as a provoking factor of needle phobia can be explained by the ability of scents to arouse potent emotional reactions (28). Our study

confirmed some additional findings from this study that watching and hearing sounds when medical staff prepare syringes can cause needle phobia (19). In order to reduce the incidence of the fear of injections, some architectural and organizational changes should be made in health facilities, separating preparation and administration of injections spatially and/or temporally (19). If this is not possible, nurses should attempt to conceal the preparation of the syringe from the patients and to avoid the sounds which could provoke fear of needles. Besides, the substances with specific smell should be stored in room which is separated and well isolated from waiting room and the room where the injections are administered.

In conclusion, fear of needles is more prevalent among the students of pharmacy than among the students of medicine. It is less frequent among students with chronic disease in their family, due to protective effect of experience with difficult medical situations. On the other hand, fear of dentist, smell of the room phobia, sound phobia, general anxiety (14) and fear of the situation when medical staff give an injection are all the factors that predispose students of medicine or pharmacy to develop fear of needles. Much should be done on removing these factors or attenuating their influence in order to prevent the development of fear of needles, which have serious adverse consequences on health of the affected students and on their future professional success.

** The study was designed and conducted as part of the teaching process in the field of research methodology within the PhD study course "Clinical and Experimental Pharmacology", Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, which explains a large number of authors. Teaching professor Slobodan M. Janković*

References

1. Yelland M, Heathcote K, Ng SK. Fear of needles: Nature and prevalence in general practice. *Australian Family Physician*. 2009;38(3):172-6.
2. Armstrong T, Hemminger A, Olatunji BO. Attentional bias in injection phobia: Overt components, time course, and relation to behavior. *Behaviour Research and Therapy*. 2013;51(6):266-273.
<https://doi.org/10.1016/j.brat.2013.02.008>
3. Bienvenu OJ, Eaton WW. The epidemiology of blood-injection-injury phobia. *Psychol Med*. 1998; 28(5):1129-36.
<https://doi.org/10.1017/S0033291798007144>
4. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition Text Revision (DSM-IV TR)*. American Psychiatric Press, Washington, DC (2000)
5. Stinson FS, Dawson DA, Chou SP, et al. The epidemiology of DSM-IV specific phobia in the USA: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychological Medicine*. 2007; 37:1047–1059.
<https://doi.org/10.1017/S0033291707000086>
6. Yim L. Belonephobia-a fear of needles. *Aust Fam Physician*. 2006;35(8):623-4.
7. Sokolowski CJ, Giovannitti JA Jr, Boynes SG. Needle phobia: etiology, adverse consequences, and patient management. *Dent Clin North Am*. 2010;54(4):731-44.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.06.012>
8. Kleinknecht RA. Acquisition of blood, injury, and needle fears and phobias. *Behav Res Ther*. 1994; 32(8):817-23.
[https://doi.org/10.1016/0005-7967\(94\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0005-7967(94)90161-9)
9. Domoto PK, Weinstein P, Melnick S, et al. Results of a dental fear survey in Japan: implications for dental public health in Asia. *Community Dent Oral Epidemiol* 1988;16:199–201
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1988.tb01753.x>
10. Rao A, Sequeira PS, Peter S. Characteristics of dental fear amongst dental and medical students. *Indian J Dent Res* 1997;8:111–4.
11. Kose S, Mandiracioglu A. Fear of blood/injection in healthy and unhealthy adults admitted to a teaching hospital. *Int J Clin Pract*. 2007;61(3):453-7.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01150.x>
12. Öst LG, Hellström K, Kåver A. One versus five sessions of exposure in the treatment of injection phobia. *Behavior Therapy*. 1992;23(2):263-281.
[https://doi.org/10.1016/S0005-7894\(05\)80385-5](https://doi.org/10.1016/S0005-7894(05)80385-5)
13. Kleinknecht RA, Thorndike RM, Walls MM. Factorial dimensions and correlates of blood, injury, injection and related medical fears: cross validation of the medical fear survey. *Behav Res Ther*. 1996; 34(4):323-31.
[https://doi.org/10.1016/0005-7967\(95\)00072-0](https://doi.org/10.1016/0005-7967(95)00072-0)
14. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, et al. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961; 4: 561-571.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1961.01710120031004>
15. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 1988; 56: 893–897.
<https://doi.org/10.1037/0022-006X.56.6.893>
16. Olson AL, Johansen SG, Powers LE, et al. Cognitive coping strategies of children with chronic illness. *J DevBehavPediatr* 1993; 14(4): 217-23.
<https://doi.org/10.1097/00004703-199308010-0000>
17. Slobodan M. Janković, Dragana Aleksić, Zulfer Bahtijari, et al. Risk factors for severe dental anxiety among medical students. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(1): 16–21
<https://doi.org/10.2298/VSP1401016J>
18. Park S, Sohn JH, Hong JP, et al. Prevalence, correlates, and comorbidities of four DSM-IV specific phobia subtypes: results from the Korean

- Epidemiological Catchment Area study. *Psychiatry Res.* 2013; 209(3):596-603
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.12.025>
19. Nir Y, Paz A, Sabo E, Potasman I. Fear of injections in young adult: prevalence and associations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2003;68(3):341-344.
20. Majstorovic M, Veerkamp JS. Relationship between needle phobia and dental anxiety. *J Dent Child (Chic).* 2004;71(3):201-5.
21. Deacon B, Abramowitz J. Fear of needles and vaso-vagal reactions among phlebotomy patients. *J Anxiety Disord.* 2006;20(7):946-60.
<https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2006.01.004>
22. Heaton LJ, Leroux BG, Ruff PA, Coldwell SE. Computerized dental injection fear treatment: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2013;92(7 Suppl):37S-42S
<https://doi.org/10.1177/0022034513484330>
23. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, et al. The Interrelationship of Agoraphobia, Social Phobia, Situational Phobia, and Simple Phobia. *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(4):273-281.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820040025003>
24. Neale MC, Walters EE, Eaves LJ, et al. Genetics of blood-injury fears and phobias: a population-based twin study. *Am J Med Genet.* 1994;54(4):326-34. PubMed PMID: 7726205.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320540411>
25. American Psychiatric Association, 1997. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. American Psychiatric Association, Washington, DC.
26. Marks I. Blood-injury phobia: a review. *Am J Psychiatry* 1988;145 (1):1207-1213.; Van Houtem CM, Laine ML, Boomsma DI, Ligthart L, van Wijk AJ, De Jongh A. A review and meta-analysis of the heritability of specific phobia subtypes and corresponding fears. *J Anxiety Disord.* 2013;27(4):379-88.
<https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2013.04.007>
27. Hamilton JG. Needle phobia: a neglected diagnosis. *J Fam Pract.* 1995 Aug;41(2):169-75.
28. Abramowitz EG, Lichtenberg P. Hypnotherapeutic olfactory conditioning (HOC): case studies of needle phobia, panic disorder, and combat-induced PTSD. *Int J ClinExpHypn.* 2009;57(2):184-97.
<https://doi.org/10.1080/00207140802665450>
29. Searing K, Baukus M, Stark MA, et al. Needle phobia during pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2006;35(5):592-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1552-6909.2006.00076.x>

Faktori koji utiču na strah od igle kod studenata medicine i farmacije

Boban Milovanović, Dušan Tomović, Slobodan M. Janković, Iva Grubor, Ljiljana Nikolić, Miloš Nikolić, Marina Mijajlović, Strahinja Mrvić, Ana Divjak, Andjela Milojević, Jelena Đoković, Andjelka Prokić, Andriana Bukonjić, Marija Sekulić, Vesna Matić, Đorđe Vukmirović, Bojan Rakonjac, Tanja Dimitrijević, Nataša Nikolić, Dragutin Jovanović, Jelena Milovanović, Marija Ratković, Nevena Barudžić, Nenad Mladenović, Milan Milutinović, Ana Antanasković, Milena Nikolić

Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Kragujevac, Srbija

SAŽETAK

Cilj našeg istraživanja bio je da se otkriju faktori rizika koji su povezani sa strahom od igle među studentima medicine i farmacije.

Ukupno je bio anketiran 301 student medicine ili farmacije (82% žena i 18% muškaraca) koji pohađaju Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu od prve do pete godine studija. Studenti su anketirani putem upitnika za procenu straha od igle, putem vizuelno-analogne skale za samoprocenu intenziteta straha od igle i opštim upitnikom sa pitanjima o socio-demografskim karakteristikama učesnika.

Prosečne vrednosti skale straha od krvi i injekcije, i skale fobije i anksioznosti od injekcije i skorova izbegavanja medicinskih ispitivanja su $7,89 \pm 9,48$; $4,46 \pm 5,18$ i $89,95 \pm 12,73$ respektivno. Sledeći faktori značajno utiču na rezultate skala: smer studija, hronična bolest u porodici, strah od zubara, fobija od mirisa u prostoriji, fobija od zvuka, rezultat na Bekovoj skali anksioznosti i strah od situacije kada medicinsko osoblje daje injekciju.

Strah od igle je češća među studentima farmacije nego među studentima medicine. Faktori koji predisponiraju da studenti medicine ili farmacije razviju strah od igle su strah od zubara, fobija od mirisa u prostoriji, fobija od zvuka, opšta anksioznost i strah od situacije kada medicinsko osoblje daje injekciju.

Ključne reči: strah od igle, faktori rizika, medicina, farmacija, studenti