

# POVEZANOST SERUMSKE RAZINE 25-HIDROKSI VITAMINA D I KARCINOMA BUBREGA U SJEVERNOM PRIOBALJU HRVATSKE

---

**Mičetić, Domagoj**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:838315>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-08**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Domagoj Mičetić**

**POVEZANOST SERUMSKE RAZINE 25-HIDROKSI VITAMINA D I KARCINOMA**

**BUBREGA U SJEVERNOM PRIOBALJU HRVATSKE**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Domagoj Mičetić**

**POVEZANOST SERUMSKE RAZINE 25-HIDROKSI VITAMINA D I KARCINOMA**

**BUBREGA U SJEVERNOM PRIOBALJU HRVATSKE**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2020.**

Mentor rada: Doc. dr. sc. Tanja Čelić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad sadrži 37 stranica, 3 slike, 4 tablice, 36 literaturnih navoda.

## Zahvala

Ovim putem, prije svega bih se zahvalio mentorici doc.dr.sc Tanji Čelić za neizmjernu pomoć koju mi je pružila pri pisanju diplomskog rada, što je uvijek imala strpljenja i vremena odgovoriti na sva moja pitanja te je svojom stručnošću i komentarima učinila rad daleko kvalitetnijim.

Zahvalu dugujem i svojoj obitelji za bezrezervnu potporu i razumijevanje tokom svih ovih godina.

Za kraj, zahvalio bio se svim kolegicama i kolegama s kojima sam proveo fakultetske dane, s kojima sam proživio mnogo nezaboravnih trenutaka kojih ću se uvijek s radošću prisjetiti.

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Vitamin D- unos, metabolizam i učinci.....	1
1.2. Regulacija sinteze 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	2
1.3. Imunomodulacijska aktivnost.....	4
1.3.1. Vitamin D i urođena imunost.....	4
1.3.2. Vitamin D i stečena imunost.....	4
1.4. Antitumorska aktivnost vitamina D.....	5
1.4.1. Protuupalni učinak.....	5
1.4.2. Proapoptotski učinak.....	6
1.4.3. Antiproliferativni učinak.....	6
1.4.4. Stimulacija diferencijacije stanica.....	6
1.4.5. Inhibicija angiogeneze.....	7
1.5. Karcinom bubrega.....	7
1.5.1. Epidemilogija, etiologija i histopatologija.....	7
1.5.2. Klinička slika.....	8
1.5.3. Dijagnoza.....	9
1.5.4. Procjena proširenosti bolesti.....	10
1.5.5. Terapijski pristup karcinomu bubrežnih stanica.....	10
1.5.5.1. Pristup bolesniku s lokalnom bolešću.....	11
1.5.5.2. Pristup bolesniku s uznapredovalom bolešću.....	11
1.5.6. Prognostički čimbenici u bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica.....	12
1.6. Povezanost serumskih razina 25-hidroksivitamina D i karcinoma bubrega.....	13

2. HIPOTEZA I SVRHA RADA.....	14
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	15
3.1. Tip istraživanja i ispitanici.....	15
3.2. Uzorci krvi i laboratorijska mjerenja.....	16
3.3. Statistička analiza.....	17
4. REZULTATI.....	19
4.1. Karakteristike ispitanika.....	19
4.2. Analiza povezanosti karcinom bubrega i serumske koncentracije 25(OH)D.....	23
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. SAŽETAK.....	30
8. SUMMARY.....	31
9. LITERATURA.....	32
10. ŽIVOTOPIS.....	37

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>- engl. *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>*- 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub>

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-MARRS- engl. *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> membrane-associated rapid-response steroid*- s membranom združeni steroid 1,25-dihidroksi vitamina D<sub>3</sub> brzog odgovora

25(OH)D- engl. *25-hydroxyvitamin D*- 25-hidroksi vitamin D

CT- engl. *computed tomography*- kompjutorizirana tomografija

FGF-23- engl. *fibroblast growth factor 23*- fibroblastni čimbenik rasta 23

FINDRISK-engl. *Finnish Diabetes Risk Score*-finska ocjena rizika za razvoj diabetesa

FRS- engl. *fracture risk score*- ocjena rizika od loma

IL- engl. *interleukin*- interleukin

IMDC- engl. *International mRCC Database Consortium*- Međunarodni konzorcij baze podataka za metastatski karcinom bubrega

LPS- engl. *lipopolysaccharid*- lipopolisaharid

memVDR- engl. *membrane vitamin D receptor*- membranski receptor vitamina D

PKC- engl. *protein kinase C*- protein kinaza C

PTH- engl. *parathyroid hormone*- paratireoidni hormon

RANK- engl. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*- receptor aktivatora nuklearnog čimbenika

RANKL- engl. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*- ligand receptora aktivatora nuklearnog čimbenika kapa B



RXR- engl. *retinoid X receptor*- retinoid X receptor

TNF- $\alpha$ - engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* - tumorski faktor nekroze  $\alpha$

TNM- engl. *tumor, node, metastasis*- tumor, limfni čvor, metastaza

UV-B- engl. *ultra violet B*- ultraljubičasto zračenje B

VDR- engl. *vitamin D receptor*- receptor vitamina D

VEGF- engl. *vascular endothelial growth factor*- vaskularni endotelni čimbenik rasta

## 1. UVOD

### 1.1. Vitamin D- unos, metabolizam i učinci

Vitamin D je liposolubilna tvar koja se zbog načina djelovanja i činjenice kako se nalazi u vrlo malo namirnica naziva i hormonom. Namirnice koje predstavljaju izvor vitamina D su jetra masnih riba (tuna, losos i skuša), dok je u ostaloj hrani njegova koncentracija zanemarivo mala. Slijedom navedenoga, neke zemlje dodaju vitamin D hrani procesom koji se naziva fortifikacija s ciljem prevencije poremećaja metabolizma kalcija u djece i odraslih. Mlijeko i mliječni proizvodi su najčešće fortificirane namirnice(1,2). Vitamin D može se u organizam unijeti i dodacima prehrani, ali smatra se kako je svega 20% vitamina D u tijelu egzogenog porijekla. Preostalih 80% čini endogeni vitamin D(3). Deficijencija vitamina D definira se kao nalaz serumske vrijednosti 25(OH)D niže od 50nmol/L (20ng/mL)(4).

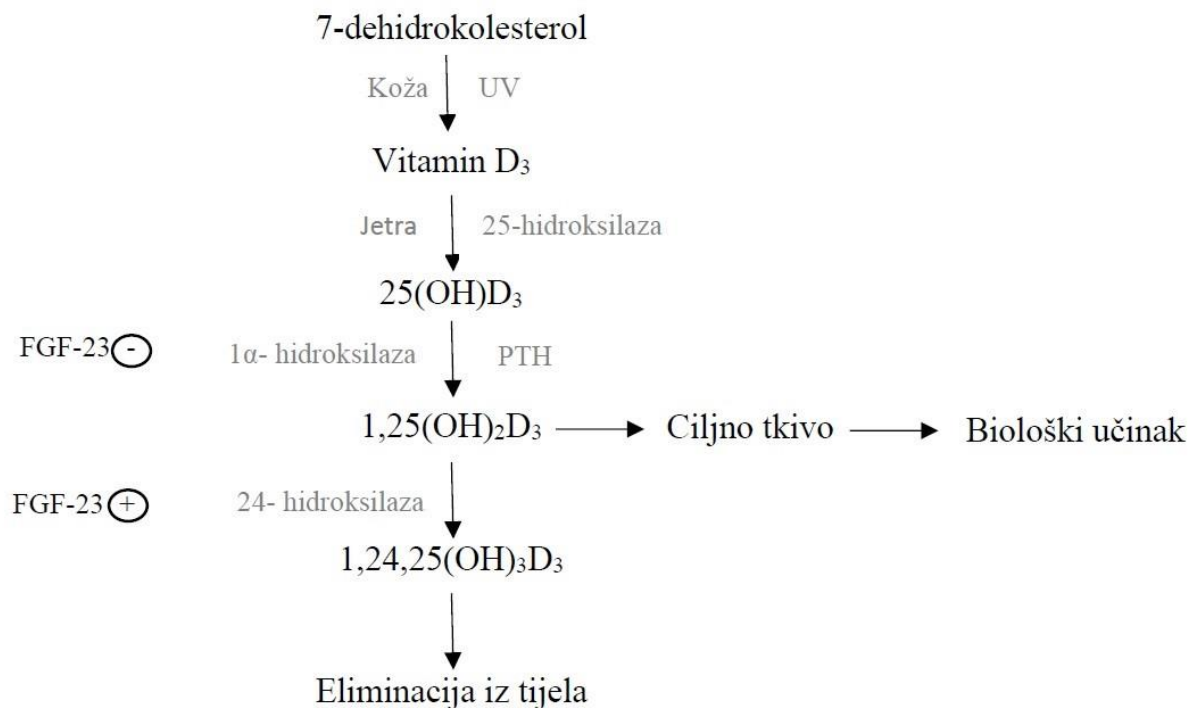
Sinteza vitamina D započinje u koži gdje dolazi do pretvorbe 7-dehidrokolesterola, posredstvom UV-B zraka sunčeva svjetla, u previtamin D koji se ubrzo izomerizira u vitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol). Stvoreni vitamin D<sub>3</sub> pohranjuje se u jetri zajedno s vitaminom D apsorbiranim iz crijeva. Uz skladištenje, u jetri se vrši i hidroksilacija posredstvom enzima 25- hidroksilaza kako bi se od inaktivne forme dobio aktivniji oblik. No, i tako stvoreni 25(OH)D<sub>3</sub> ima 100-1000x manju aktivnost od krajnjeg metabolita, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, koji se sintetizira u bubrezima. 25(OH)D<sub>3</sub> je hidroksilacijom povećana topivost te se filtrira u glomerulu bubrega te dolazi do proksimalnih tubula gdje se reapsorbira u tubularne stanice. Stanice proksimalnog tubula ekspimiraju enzim 1α- hidroksilazu koja dodajući jednu hidroksilnu skupinu 25(OH)D<sub>3</sub> ga pretvara u biološki aktivni oblik, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, koji ostvaruje učinak(1,4,6).

Učinci 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dominantno su vezani uz metabolizam kalcija i održavanje njegove serumske koncentracije unutar vrlo uskih granica. Navedeno se postiže povećanjem

crijevne apsorpcije.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  je liposolubilna spoj što mu omogućuje difuziju kroz staničnu membranu i dolazak do jezgre stanice gdje mu se nalazi receptor (engl. *vitamin D receptor, VDR*). VDR je heterodimer u čijem sastavu se još nalazi i retinoid X receptor (engl. *retinoid X receptor, RXR*). Vezivanjem aktivne forme za heterodimer VDR/RXR dolazi do transkripcije ciljnih gena(7). U slučaju crijeva radi se o genima čiji produkt su proteini kalbindin i epitelni kalcijski kanal koji su zaduženi za apsorpciju kalcija čime se podiže njegova serumska koncentracija. Drugi regulacijski mehanizam odvija se reakcijama u koštanom tkivu gdje  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vezivanjem za receptor u osteoblastima potiče ekspresiju receptora aktivatora nuklearnog čimbenika kapa B (engl. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL*). Njegov receptor (RANK) nalazi se na proosteoklastima, a vezanjem RANKL za RANK dolazi do pretvorbe proosteoklasta u osteoklaste čijom aktivnošću dolazi do resorpcije kosti i posljedičnog oslobađanja kalcija u krvotok(4).

## 1.2. Regulacija sinteze $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Serumske vrijednosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  rezultat su ravnoteže između sinteze i razgradnje. Pad koncentracije serumskog kalcija stimulira lučenje paratiroidnog hormona (engl. *parathyroid hormone, PTH*) koji potiče ekspresiju  $1\alpha$ -hidroksilaze u proksimalnim stanicama tubula čiji supstrat je  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , a produkt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Produkt mehanizmom negativne povratne sprege inhibira sintezu enzima, ali uz to inhibira i lučenje PTH iz doštitnih žlijezda. Uz navedeno, na poticaj  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u koštanom tkivu se oslobađa FGF 23 koji krvlju dolazi do bubrega gdje suprimira ekspresiju  $1\alpha$ -hidroksilaze, a stimulira ekspresiju 24-hidroksilaze, enzima čiji supstrat je aktivna forma vitamina D, a produkt inaktivna forma koja se izlučuje iz tijela(6). Pojednostavljeni prikaz metabolizma vitamina D nalazi se na Slici 1.



**Slika 1. Metabolizam vitamina D.** Pojednostavljeni prikaz metabolizma vitamina D od sinteze do razgradnje i eliminacije iz tijela

*Preuzeto i prilagođeno prema: Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: Metabolism. Endocrinol Metab Clin North Am.2010;39(2):243-53 (6)*

Unazad nekoliko godina prihvaćena je činjenica kako uloga vitamina D nije vezana isključivo uz održavanje homeostaze kalcija. Dapače, neki autori smatraju kako je uloga vezana za mineralizaciju kostiju filogenetski mlađa u odnosu na ostale uloge vitamina D, a svoju tvrdnju potkrjepljuju prisutnošću VDR-a i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u tijelu paklare, kralježnjaka koji nema kalcificirani kostur i zube. Prisutnost VDR-a i  $1\alpha$ -hidroksilaze dokazana je u stanicama imunološkog sustava, trombocita, crijeva, gušterače, prostate i placente čovjeka(8). Uloge vitamina D vezane za navedene stanice i tkiva aktivno se istražuju, a dvije posebno zapažene i zanimljive uloge su imunomodulacijska i antitumorska aktivnost(9).

### 1.3. Imunomodulacijska aktivnost

#### 1.3.1. Vitamin D i urođena imunost

Sustav urođene imunosti prva je linija obrane organizma. Sastoji se od više elemenata, a uključuje cjelovitost kože i sluznice, stanične elemente (makrofagi, neutrofili, NK stanice) te enzime i proteine s opsonizirajućim ili baktericidnim učinkom. Dokazano je kako makrofagi sadrže VDR i enzim  $1\alpha$ -hidroksilazu što im omogućuje sintezu aktivnog oblika vitamina D. Ekspresiju enzima stimulira lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharid, LPS*) prisutan u stijenci bakterija te proupalni citokin IL- $1\beta$ . Stvoreni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  može djelovati autokrino, na stanicu koja ga je stvorila, i parakrino, na stanice u okruženju, stimulirajući stvaranje baktericidnih spojeva katelicidina i  $\beta$  defenzina. Zamjećuje se kako je ekspresija enzima pod utjecajem tvari u lokalnom miljeu, a ne PTH(3).

#### 1.3.2. Vitamin D i stečena imunost

Animalnim studijama dokazano je kako vitamin D ima protuupalni učinak koji ostvaruje sprječavanjem pretjeranog odgovora na patogene i poticanjem tolerancije vlastitih antigena. Pretpostavka je kako se mehanizam odvija preko dendritičkih stanica koje su antigen prezentirajuće.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inducira ekspresiju gena za protuupalni citokin IL-10, a inhibira ekspresiju proupalnih citokina IL-12 i TNF- $\alpha$  čime se stvara okoliš u kojem se imunološki odgovor preusmjerava s pomoćničkih limfocita T1 (Th1) i Th17 na Th2 i regulacijske T limfocite (Treg). Navedeni imaju protuupalni učinak. Kliničke studije nisu tako uvjerljive, rezultati su inkonzistentni te se još ne može govoriti o dokazanom terapijskom učinku kod autoimunih bolesti ili upalnih bolesti crijeva(3).

#### 1.4. Antitumorska aktivnost

Uz već navedene stanice koje posjeduju VDR i  $1\alpha$ -hidroksilazu zamijećeno je kako su isti prisutni i u većini tumorskih stanica(10). *In vitro* i *in vivo* istraživanja na animalnim modelima jasno su dokazala kako vitamin D ima antitumorski učinak koji se očituje kroz antiproliferativni i protuupalni učinak, stimulaciju apoptoze i diferencijacije stanica te inhibiciju angiogenze, invazije i metastaziranja tumorskih stanica. Navedena svojstva potencijalno otvaraju brojne mogućnosti u prevenciji i liječenju novotvorina. Široki spektar antitumorskih učinaka posljedica je dvaju mehanizama djelovanja vitamina D. Prvi je genski gdje je transkripcija posljedica vezivanja vitamina D za njegov receptor. Drugi mehanizam posredovan je drugim glasniciima. Naime, uz VDR, vitamin D može se vezati za memVDR i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -MARRS receptore. Vezivanjem za memVDR dolazi do otvaranja kalcijevih kanala što potiče aktivaciju protein kinaze C (engl. *protein kinase C*, *PKC*) koja fosforilira Ras protein. Vezivanjem za  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -MARRS aktivira se fosfolipaza C koja aktivira PKC s posljedičnom fosforilacijom Ras proteina. Daljnji slijed zbivanja zajednički je za oba puta. Započinje kaskada aktivacije proteina Ras, Raf, MEK, ERK-MAPK 1/2 što rezultira transkripcijom gena (11).

##### 1.4.1. Protuupalni učinak

Upala može stimulirati nastanak i progresiju tumora tako što dovodi do stvaranja citokina, slobodnih kisikovih i dušikovih radikala koji izravno oštećuju stanice te potiče staničnu proliferaciju. Radovi pokazuju kako inhibicija upalnog odgovora dovodi do antitumorskog učinka na više načina, od čega su svi povezani s metabolizmom medijatora upale, prostaglandinima. Učinak prostaglandina može se umanjiti na 3 načina pri čemu vitamin D može utjecati na sva tri. Prvi je inhibicija sinteze prostaglandinskih receptora. Nadalje, vitamin D inhibira sintezu enzima

ciklooksigenaze 2 (COX-2) koji katalizira pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandine. Posljednji mehanizam je indukcija ekspresije enzima 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaze čijom aktivnošću se prostaglandini prevode u inaktivne spojeve (12).

#### 1.4.2. Proapoptotski učinak

Apoptoza se definira kao programirana stanična smrt. Produženi životni vijek jedno je od obilježja tumorskih stanica. Vitamin D može na nekoliko načina potaknuti apoptozu. Najbolje je istražen mehanizam indukcije proapoptotskih proteina Bax, Bad i Bak te supresija antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-X<sub>2</sub> u različitim tumorskim stanicama (10). Uz navedeni opisuju se još 2 mehanizma koji mogu dovesti do apoptoze tumorskih stanica. Vitamin D potiče ekspresiju kalcijskog kanala TRPV6 što za posljedicu ima utok kalcijskih iona u stanicu čime se povećava propusnost mitohondrijske membrane s posljedičnim otpuštanjem citokroma c i aktivacijom egzekucijskih kaspaza što u konačnici rezultira apoptozom. Apoptoza može biti potaknuta i pojačanom unutarstaničnom produkcijom slobodnih kisikovih radikala koja je također opisana kao odgovor na stimulaciju vitaminom D (13).

#### 1.4.3. Antiproliferativni učinak

Vitamin D ostvaruje antiproliferativni učinak suprimirajući aktivnost protoonkogeni c-Myc i c-Fos te ciklin ovisne kinaze 2 čime se uvjetuje zastoj u kontrolnoj točki između G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub> staničnog ciklusa s posljedičnom staničnom smrću (11).

#### 1.4.4. Stimulacija diferencijacije stanica

Utjecaj na diferencijaciju stanica najbolje je istražen na primjeru karcinoma debelog crijeva gdje je zabilježeno kako vitamin D potiče ekspresiju proteina staničnog spoja E- kadherina (10). Gubitak proteina staničnog spoja dovodi do gubitka kontaktne

inhibicije, što je jedno od osnovnih karakteristika maligniteta, omogućavajući tumorskim stanicama metastaziranje (13).

#### 1.4.5. Inhibicija angiogeneze

Jedno od obilježja novotvorina je ubrzana dioba stanica koja dovodi do rasta tumorske mase. Rast izravno ovisi o količini dostupnih nutrijenata koji se dostavljaju krvlju. Stoga, za rast tumora nužno je stvaranje novih krvnih žila što se naziva angiogenezom. Angiogeneza je dominantno posljedica otpuštanja vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*) iz tumorskih stanica (14). U in vitro modelima na stanicama karcinoma prostate pokazalo se kako pod utjecajem vitamina D dolazi do smanjene ekspresije VEGF-a (12).

U prilog antitumorskog učinka vitamina D idu i epidemiološke studije. Naime, pokazalo se kako su stope smrtnosti od karcinoma više u zemljama niže geografske širine, a geografska širina indirektni je pokazatelj izloženosti UV-B sunčevim zrakama te se može koristiti kao surogat kriterij za hipovitaminozu D. Među karcinomima s povišenom stopom smrtnosti koja je povezana s nižom izloženosti UV-B zračenju nalazi se i karcinom bubrega (15).

### 1.5. Karcinom bubrega

#### 1.5.1. Epidemiologija, etiologija i histopatologija

Karcinom bubrega zloćudna je novotvorina porijekla stanica koje izgrađuju bubreg. Prema porijeklu karcinom bubrega može se podijeliti na karcinom bubrežnih stanica, koji čini do 85% svih karcinoma, zatim na karcinom prijelaznog epitela te parenhimalne epitelne tumore kao što su onkocitom, tumor sabirnih cijevi i sarkom bubrega (16). Karcinom bubrega na 13. je mjestu najčešće dijagnosticiranih, a 16. je uzrok smrti od tumora u svijetu. Uzimajući Europu, procijenjeno je kako se godišnje dijagnosticira



prosječno 115 000 karcinoma, što predstavlja 3.9% svih novootkrivenih karcinoma, a 49 000 Europljana umre od karcinoma bubrega. Navedeni broj predstavlja 3.2% umrlih od raka u Europi (17). U Hrvatskoj se godišnje otkrije 700- 800 karcinoma bubrega. Prema posljednjim podacima Registra za rak u 2017. godini dijagnosticirana su 550 slučajeva kod muškaraca i 280 slučajeva u žena, što predstavlja 4% novootkrivenih karcinoma u muškaraca, 3% u žena (18). Najčešće se javlja u periodu između 60. i 80. godine života s medijanom od 64 godine. Iako je incidencija u porastu, smrtnost opada. Smatra se kako je glavni uzrok pada smrtnosti sve češća upotreba slikovnih dijagnostičkih metoda gdje se karcinom bubrega nađe slučajno, dok je još manjih dimenzija i ograničen na bubreg. Čimbenici rizika povezani s razvojem karcinoma bubrega su brojni, od čega 3 najbolje istražena i najčešće prisutna su pušenje, hipertenzija i debljina. Kako spomenuti čimbenici pogoduju nastanku karcinoma nije razjašnjeno. Uz navedene mogu se spomenuti i ostali čimbenici rizika među kojima se nalaze upotreba analgetika, naročito acetilsalicilne kiseline i acetaminofena, profesionalna izloženost toksičnim spojevima kao što je kadmij, stečena cistična bolest bubrega koja se javlja kod pacijenata na dijalizi te genetska predispozicija koja se najbolje očituje kod mutacije VHL gena u sklopu Von Hippel-Lindau sindroma(16). Najčešći histološki tip karcinoma bubrega je karcinom bubrežnih stanica te će se na njegovom primjeru opisati klinička slika, dijagnostika s procjenom proširenosti te liječenje i prognoza za pacijente (14).

#### 1.5.2. Klinička slika

Spomenuto je kako se karcinom bubrega često otkrije u asimptomatskoj fazi, kao slučajan nalaz na ultrazvuku ili CT-u abdomena. U onih pacijenata koji nisu asimptomatski, simptomi i znakovi uglavnom su posljedica invazije tumora u okolne strukture ili su posljedica postojanja metastaza. Najčešće prisutan simptom je

hematurija, a posljedica je invazije tumora u sustav odvodnih cijevi bubrega. Palpabilna trbušna masa povezana je s tumorom donjeg pola bubrega, a može se naći u mršavih ljudi (19). Ako je uz navedene simptome prisutna lumbalna bol govori se o Lenkovu trijasu simptoma (20). Kada je prisutan ukazuje na već uznapredovalu bolest. Invazija u donju šuplju venu može se manifestirati pojavom edema, ascitesa ili plućnom tromboembolijom. Anemija je prisutna u 29-88% pacijenata, a može biti mikrocitna ili normocitna, uz povišene vrijednosti feritina. Navedeno odgovara obrascu anemije kronične bolesti. Vrućicu kao simptom navodi do 20% pacijenata, a uglavnom ju prate noćno znojenje, umor te gubitak apetita i tjelesne mase. Hiperkalcemija je prisutna u do 15% bolesnika s uznapredovalom bolesti. Nastanak je povezan s prisutnošću koštanih metastaza ili može biti posljedica proizvodnje proteina sličnog paratireoidnom hormonu od strane tumora. Ostali simptomi i znakovi su rjeđi, a uključuju postojanje kaheksije, eritrocitoze, amiloidoze ili trombocitoze(19).

### 1.5.3. Dijagnoza

Osobe s nekim od navedenih simptoma opravdano je uputiti na ultrazvuk abdomena. Nalaskom tvorbe u bubregu nužno je učiniti distinkciju radi li se o jednostavnoj cisti ili ne. Jednostavna cista se na ultrazvuku prepoznaje kao anehogena okrugla tvorba jasno ograničena s tankom stijenkom od okolnog tkiva s vidljivom posteriornom hiperehogenom sjenom. Ukoliko su svi navedeni kriteriji zadovoljeni nije nužno daljnje postupanje te se preporuča praćenje. Ukoliko tvorba nekim svojstvom odudara od gore navedenog opisa nužno je učiniti CT abdomena(19). Karakteristike maligne tvorbe na CT-u su zadebljala, nepravilna stijenka ciste, prisutnost septa, postkontrastna opacifikacija te nalaz solidne mase, nekroze ili kalcifikacije (21). Temeljem nalaza CT-a postavlja se dijagnoza karcinoma bubrega. Preoperativna biopsija bubrega u resektabilnih tumora nije nužna zbog niske specifičnosti i straha od mogućeg

peritonealnog rasapa tumora. Konačna dijagnoza karcinoma bubrega kao i određivanje histološkog tipa vrši se analizom tkiva dobivenog parcijalnom ili totalnom nefrektomijom. Iznimku čini nalaz proširene bolesti kada se dijagnoza postavlja na temelju analize bioptata metastatskog čvora(19).

#### 1.5.4. Procjena proširenosti bolesti

Procjena proširenosti bolesti preduvjet je adekvatnog liječenja, a posljedično tome i ishoda kod bolesnika. CT abdomena metoda je izbora za procjenu lokalne invazije i zahvaćenosti limfnih čvorova, dok se uz njega rutinski radi i CT grudnog koša kako bi se procijenila zahvaćenost plućnih i medijastinalnih limfnih čvorova. Scintigrafija skeleta, kao metoda procjene prisutnosti koštanih metastaza, indicirana je u pacijenata s kostoboljom i/ili povišenim serumskim vrijednostima alkalne fosfataze.

Temeljem nalaza slikovnih pretraga određuje se stadij bolesti pomoću TNM klasifikacijskog sustava. Tumori, ovisno o veličini, koji su ograničeni na bubreg svrstavaju se u razred T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>. Tumor označen kao T<sub>3</sub> širi se u *v.renalis* ili u perinefritičko tkivo, ali ne probija Gerotinu fasciju. Tumori koji se šire izvan Gerotine fascije ili zahvaćaju ipsilateralnu nadbubrežnu žlijezdu označavaju se kao T<sub>4</sub>. Udaljene ili nodalne metastaze označavaju se kao prisutne ili odsutne(19).

#### 1.5.5. Terapijski pristup karcinomu bubrežnih stanica

Terapijski pristup bolesniku s karcinomom bubrežnih stanica prije svega ovisi o proširenosti bolesti. Prema proširenosti bolest se može podijeliti na lokalnu i uznapredovalu. Lokalizirana bolest obuhvaća stadije I,II i III prema TNM klasifikaciji, dok se o uznapredovaloj bolesti govori kada se onda dijagnosticira u stadiju IV što podrazumijeva nalaz barem jednog od slijedećih svojstava: prodor izvan Gerotine fascije ili u ipsilateralnu nadbubrežnu žlijezdu te nalaz udaljenih metastaza(22).

#### 1.5.5.1. Pristup bolesniku s lokaliziranom bolešću

Kirurški pristup preporučeni je način liječenja bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica u stadijima I,II i III. Nakon utvrđivanja nepostojanja udaljenih metastaza gleda se veličina tumora. Ukoliko se radi o tumoru promjera manjeg od 4 cm preporučeni zahvat je parcijalna nefrektomija. Parcijalna nefrektomija preporuča se i u nekim situacijama kada tumor mjeri više od 4 cm. Stanja koja ulaze u navedenu kategoriju su postojanje samo jednog bubrega, bilateralni tumori te postojanje ili rizik od razvoja kronične bubrežne ozljede. Za sve ostale nalaze u stadijima I,II i III kada god je operacija moguća preporuča se radikalna nefrektomija. Kirurški zahvat je lječidbeni i ne preporuča se adjuvantna kemoterapija(22).

#### 1.5.5.2. Pristup bolesniku s uznapredovalom bolešću

Bolesnik s uznapredovalom bolešću je svaki čija bolest je svrstana u stadij IV. Idući korak je procjena rizika prema IMDC gdje se kao čimbenici rizika navode Karnofski indeks <80%, <1 godine od postavljanja dijagnoze, hemoglobin ispod donje granice normale, serumske razine kalcija iznad gornje granice normale te neutrofilija i trombocitoza. Ukoliko je prisutan barem jedan čimbenik rizika preporuča se sistemska terapija nivolumabom i ipilimumabom ili kombinacijom pembrolizumaba i axitiniba. U odsutnosti čimbenika rizika evaluira se bolest pri čemu se kod simptomatskih bolesnika primjenjuje imunoterapija istovjetna kao i kada su prisutni čimbenici rizika. U asimptomatskih bolesnika bez čimbenika rizika preporuča se praćenje (22).

### 1.5.6. Prognostički čimbenici u bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica

Glavni čimbenik koji utječe na prognozu u bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica je anatomska proširenost bolesti. Anatomska proširenost bolesti procjenjuje se TNM klasifikacijom temeljem koje se određuje stadij bolesti. Što je bolest u višem stadiju preživljenje je manje(23). Odnos stadija bolesti i preživljenja prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Odnos petogodišnjeg preživljenja i stadija bolesti u pacijenata s karcinomom bubrega

*Preuzeto i prilagođeno prema: Choueiri TK. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma. U: UpToDate, Richie JP, Atkins MB ed. UpToDate[Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.2.2020] Dostupno na: <https://www.uptodate.com> (23)*

Stadij bolesti	Petogodišnje preživljenje
I	80.9%
II	73.7%
III	53.3%
IV	8.2%

## 1.6. Povezanost serumskih razina 25-hidroksivitamina D i karcinoma bubrega

Pretraživanjem baze podataka *Medline* nalazi se nekoliko radova koji govore o protektivnom djelovanju vitamina D na karcinom debelog crijeva, dojke, prostate i jajnika(11,15,24). Odnos se opisuje U- krivuljom što znači kako su niske i visoke vrijednosti serumskog vitamina D povezane s većom incidencijom zloćudnih novotvorina(11,25). S druge strane postoje studije koje ne pronalaze povezanost između serumskih razina vitamina D i incidencije tumora(11,26). Malo je studija koje govore o odnosu incidencije karcinoma bubrega i koncentracije vitamina D. Dio njih odnos opisuje U krivuljom, a prema podacima projekta „Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers“ nije pronađena veza između cirkulirajućeg 25(OH)D i povećanog rizika za razvoj karcinoma bubrega(27-30). Zbog malog broja radova i suprotstavljenih rezultata nužna su daljnja istraživanja.

## 2. HIPOTEZA I SVRHA RADA

Hipoteza ovog diplomskog rada je da postoji povezanost serumske razine 25-hidroksi vitamina D i karcinoma bubrega u sjevernom priobalju Hrvatske.

Kako bismo ostvarili ovu hipotezu postavljena su dva cilja:

1. Istražiti povezanost i oblik te povezanosti između serumskih razina 25-hidroksi vitamina D i vjerojatnosti pojave karcinoma bubrega u sjevernom priobalju Hrvatske.
2. Istražiti postoji li povezanost između serumskih razina 25-hidroksi vitamina D i vjerojatnosti pojave karcinoma bubrega u sjevernom priobalju Hrvatske prilagodbom za kovarijable koje su prethodnim istraživanjima povezane s karcinomom bubrega, uključujući pušenje, konzumiranje alkohola, opekline od sunca te stupanj postignutog obrazovanja.

### 3. ISPITANCI I POSTUPCI

#### 3.1. Tip istraživanja i ispitanici

Provedeno je deskriptivno presječno istraživanje u sjevernom priobalju Hrvatske gdje prema procjeni živi 300 000 ljudi. Ispitivana skupina sastojala se od bolesnika dijagnosticiranih s karcinomom bubrega. Istraživanje je dobilo suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra u Rijeci (KBC Rijeka) te su svi sudionici u istraživanju potpisali informirani pristanak.

U istraživanju je sudjelovalo 227 pacijenata KBC-a Rijeka od čega je njih 144, prosječne dobi  $64 \pm 8$  godina, dijagnosticirano s karcinomom bubrega, dok je preostalih 83 činilo kontrolnu skupinu. Kontrolna skupina odgovarala je po spolu i dobi ispitivanoj, a sačinjavali su je urološki pacijenti s nemaligim oboljenjima kao što su bubrežni kamenci. Isključni kriteriji za kontrolnu skupinu bili su terapija vitaminom D, njegovim aktivnim metabolitima ili sintetskim analogima unazad 6 mjeseci, uzimanje medikamentozne terapije za liječenje osteoporoze te hiperparatireoidizam i teška hipokalcijemija.

Svakom sudioniku pojedinačno objašnjena je svrha istraživanja te koja su očekivanja od samih sudionika. Nakon potpisivanja informiranog pristanka sudionici su ispunili upitnik te im je uzorkovana venska krv u KBC-u Rijeka s ciljem određivanja serumske koncentracije 25(OH)D.

Korišteni upitnik kreiran je koristeći se FINDRISK i FRS alatima za procjenu rizika te Zajedničkom izjavom za dijagnozu metaboličkog sindroma iz 2009. godine (*engl. 2009 Joint Statement criteria for diagnosis of MetS*)(31,32,33). Upitnik se sastojao od 4 dijela sadržavajući pitanja otvorenog i zatvorenog tipa. Prvi dio uključivao je pitanja vezana za opće podatke o sudionicima, a traženi podaci bili su kako slijedi: dob, spol,



nacionalnost, bračni status, stečeni stupanj obrazovanja, radni status, mjesto prebivanja, mjesečni prihod i ocjena vlastitog zdravlja. Druga skupina sastojala se od pitanja o tjelesnoj visini i masi i opsegu struka, dok su trećom skupinom prikupljeni podaci o vrijednostima sistemskog krvnog tlaka, glukoze u krvi natašte, ukupnog i HDL-C kolesterola te triglicerida. Posljednja skupina sastojala se od 10 pitanja, od čega su prva 4 bila o pušenju cigareta, kroničnim bolestima i kroničnoj upotrebi lijekova. Preostalih 6 pitanja preuzeto je iz FINDRISK upitnika, a odnosila u se na učestalost tridesetominutne dnevne tjelesne aktivnosti, dnevnu konzumaciju voća i povrća, povijest uzimanja antihipertenzivne terapije, postojanje hiperglikemije i povijesti šećerene bolesti tipa 2 u obitelji.

Budući da se pri sastavljanju upitnika koristila strana literatura, sva pitanja su prevedena s engleskog na hrvatski jezik. Očuvana točnost i značenje prevedenih pitanja provjereni su prije prikupljanja podataka. Također, prikupljanju podataka prethodila je provjera sadržaja, dizajna, čitljivosti i razumljivosti upitnika na 10 ispitanika koji nisu sudjelovali u istraživanju.

### 3.2. Uzorci krvi i laboratorijska mjerenja

Uzorkovanje periferne venske krvi sudionicima ispitivane i kontrolne skupine, pri čemu isti nisu bili natašte, vršilo se tokom godine, a za svaki uzorak naznačen je period uzorkovanja čime je u obzir uzeta i sezonska varijacija serumskih koncentracija 25(OH)D do koje dolazi zbog različite izloženosti sunčevim UV-B zrakama. Godinu smo podijelili u 2 glavna perioda: ljeto, odnosno period od lipnja do studenoga u kojem je izloženost UV-B zračenju veća, te zima, odnosno period od prosinca do svibnja u kojem je izloženost sunčevom UV-B zračenju manja. Uzorci krvi su centrifugirani, a dobiveni serum su odvojeni i pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  bez ponovnih ciklusa odmrzavanja

i smrzavanja. Ispitanicima je dan već prethodno opisani upitnik na ispunjavanje prilikom uzimanja venske krvi. Podaci prikupljeni upitnikom prikazani su u tablici 2.

Serumske vrijednosti 25(OH)D određivane su enzimskim imunotestom tvrtke Immunodyagnostic Systems (IDS, Frankfurt, Njemačka) metodom ELISA na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Uzorci su razrijeđeni s otopinom 25(OH)D označenim biotinom i inkubirani u mikrotitarskim jažicama obloženim s visokospecifičnim ovčjim protutijelima na 25(OH)D na sobnoj temperaturi kroz 2 sata. Zatim je dodan avidin obilježen enzimom hren peroksidaza (*engl. horseradish peroxidase*) koji se selektivno veže za biotinski kompleks što rezultira pojavom boje nakon ispiranja i dodavanja kromogenog supstrata. Apsorbancija zaustavnih reakcija iz smjese očitana je na čitaču mikrotitarskih ploča pri čemu je dobiveni intenzitet obojenja obrnuto proporcionalan serumskoj koncentraciji 25(OH)D.

### 3.3. Statistička analiza

Kreirani su logistički regresijski modeli kako bi se odredio omjer šansi (*engl. odds ratio, OR*) i 95%-tni interval pouzdanosti (*engl. confident interval, CI*) za karcinom bubrega u odnosu na serumske koncentracije 25(OH)D koje su bile raspoređene u 4 kategorije. Četiri kategorije jesu intervali serumskih koncentracija s vrijednostima  $\leq 29.9$  nmol/L, 30-49.9 nmol/L, 50-74.9 nmol/L i  $\geq 75$  nmol/L, a kreirane su prema postojećoj literaturi(1). Osnovni logistički regresijski modeli uključivali su samo kategorije koncentracija 25(OH)D kako bi se istražile glavne poveznice s incidencijom karcinoma bubrega u našem uzorku hrvatske populacije. Prilagođeni regresijski modeli dodatno su postavljeni za kontrolu potencijalno značajnih objašnjavajućih varijabli kao što su dob ispitanika u trenutku uzorkovanja krvi, pušenje cigareta, izloženost suncu na poslu ili u slobodno vrijeme te doba godine (ljet/zima) u kojem je uzet uzorak krvi. Prehrambene navike i obrasci ponašanja su također uključeni u model kako bi se

ispitao njihov značaj. Dodatne objašnjavajuće varijable tretirane su kao kategoričke varijable u modelu, izuzev dobi koja je uključena kao kontinuirana varijabla. Sve navedene varijable proizlaze iz upitnika koji je dan ispitanicima na ispunjavanje prilikom uzorkovanja krvi. Dodatnim regresijskim modelima također je ispitana povezanost karcinoma bubrega i serumskih koncentracija 25(OH)D u različitim slojevima podataka na temelju unaprijed definiranih kategorija koje uključuju profesionalnu izloženost ultraljubičastom zračenju, dob, spol, godišnje doba u kojem je uzet uzorak te pušenje cigareta. Razlike su uočene u stratificiranoj analizi za spol i godišnje doba u kojem je prikupljen uzorak krvi, a što je i naznačeno u odjeljku s rezultatima. Parametrijska i neparametrijska ispitivanja su korištena za određivanje statističke značajnosti. Statistička analiza provedena je koristeći se programom Statistica 11. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima i dobrom kliničkom praksom. Nadalje, svim sudionicima u istraživanju osigurana je privatnost i anonimnost u skladu s etičkim i bioetičkim principima. Pravednost i dobročinstvo istraživanja učinjeni su u skladu s Nirnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike ispitanika

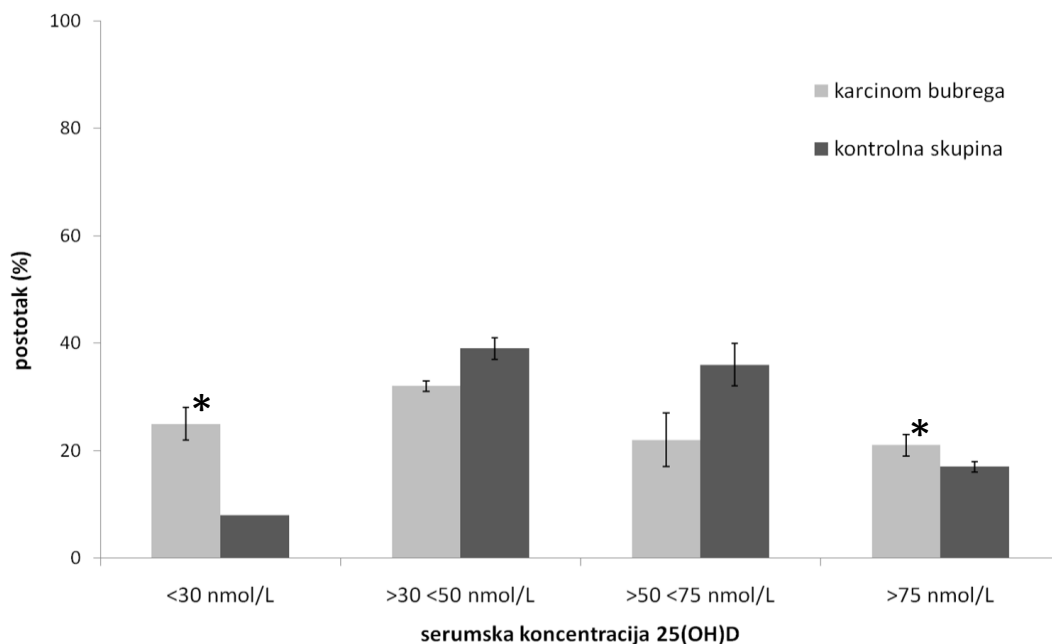
Svi ispitanici uključeni u ovo istraživanje pripadaju bijeloj rasi. Prosječno, u uzorcima krvi uzorkovanim u zimskom periodu zabilježena je niža koncentracija 25(OH)D u odnosu na one uzorkovane u ljetnom periodu (54.8 nmol/L; 68.6 nmol/L,  $p=0.001$ ). Prosječna vrijednost cirkulirajućeg 25(OH)D u bolesnika s karcinomom bubrega iznosila je 52 nmol/L, dok je prosječna vrijednost u kontrolnoj skupini iznosila 54 nmol/L. Kao što se i očekivalo, serumske vrijednosti 25(OH)D bile su značajno pomaknute u lijevo. Raspodjela vrijednosti 25(OH)D kao i odabranih karakteristika za slučajeve i kontrole prikazani su u Tablici 2 te na Slici 2.

Tablica 2. Karakteristike ispitanika

Karakteristika	Karcinom bubrega			Kontrolna skupina		
	<i>N</i>	% ( <i>da</i> )	<i>Mean±sd</i> ( <i>raspon</i> )	<i>N</i>	% ( <i>da</i> )	<i>Mean±sd</i> ( <i>raspon</i> )
	144			83		
<b>Serumska koncentracija 25(OH)D</b>						
<30 nmol/L	36	25		7	8	
>30&<50 nmol/L	46	32		32	39	
>50&<75 nmol/L	32	22		30	36	
>75 nmol/L	30	21		14	17	
<b>Spol i dob</b>						
Žena	48	33		70	84	
Muškarac	96	67		13	16	
Dob			64±8 (4-42)			68±9 (34-82)
<b>Bračni status</b>	112	78		56	67	
<b>Broj djece</b>			1.8±0.8 (0-3)			1.8±0.9 (0-5)
<b>Razina obrazovanja</b>						
Osnovna škola ili niže	52	36		20	25	
Srednja škola	72	50		53	63	
Fakultet	20	14		10	12	
<b>Karakteristike zanimanja</b>						
Obavljanje posla na otvorenom do 30. godine	76	53		38	46	
Fizički rad do 30. godine	72	50		47	57	
Obavljanje posla na otvorenom nakon 30. godine	27	19		38	46	
Fizički rad nakon 30. godine	48	33		36	43	
Rad s naftom i derivatima	0	0		6	7	

<b>Tjelesna aktivnost (u dječjoj dobi)</b>						
Ništa	32	22		30	36	
Povremena	60	42		53	64	
Česta	52	36		1	1	
<b>Tjelesna aktivnost (sada)</b>						
Ništa	32	22		21	25	
Povremena	60	42		46	55	
Česta	52	36		16	20	
<b>Učestalost opeklina od sunca (u dječjoj dobi)</b>						
Nikada	115	80		66	80	
Ponekad	4	3		0	0	
Često	25	17		17	20	
<b>Učestalost opeklina od sunca (sada)</b>						
Nikada	76	53		59	70	
Ponekad	4	3		2	3	
Često	64	44		22	27	
<b>Ljetovanja na obali</b>						
Nikada	27	19		37	43	
Ponekad	92	64		35	42	
Često	25	17		11	13	
<b>Prehrambene navike</b>						
Konsumacija plave ribe	96	67		50	60	
Konsumacija alkohola	63	44		13	16	
Pušenje cigareta	31	22		12	14	
<b>Samoprocjena zdravlja (mjereno vizualno-analognom ljestvicom)</b>			6.19±1.7 (1-10)			5.88±1.9 (1-10)
<b>Period uzorkovanja krvi</b>	65	45		14	17	

\* Vrijednosti su izražene srednjom vrijednošću ± SEM, rasponom vrijednosti ili brojem (postotak) u skupini s karcinomom bubrega i kontroli.

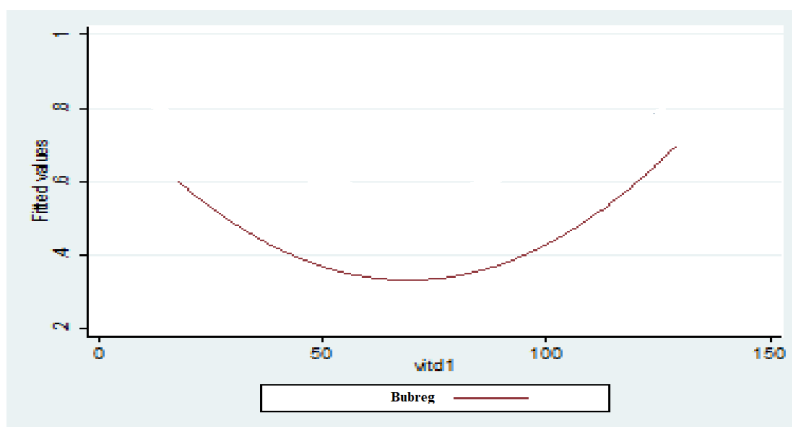


**Slika 2. Postotak serumskih koncentracija 25(OH)D (nmol/l) u ispitanika sa karcinomom bubrega i kontrola.** Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ .

Generalno, naši ispitanici su oženjeni, imaju djecu, s osnovnoškolskim ili srednjoškolskim stupnjem obrazovanja. Gotovo polovina ispitanika navela je kako se bavila fizičkim poslom, često na otvorenom, prije i nakon 30. godine života. Izloženost ultraljubičastom zračenju kao i fizički rad gotovo su ravnomjerno raspoređeni između slučajeva i kontrola. Skupinu bolesnika s karcinomom bubrega činilo je 40% žena s rasponom dobi od 42 do 86 godina. Prosječna dob iznosila je 64 godine. Kontrolna skupina uglavnom se sastojala od žena, a raspon dobi unutar skupine je od 34 do 82 godine s prosječnom dobi od 68 godina. U ispitivanoj skupini 67% ispitanika navelo je kako barem jednom tjedno konzumira plavu ribu, a njih 44% navelo je konzumaciju alkohola na dnevnoj bazi. Informacije prikupljene upitnikom sukladne su podacima iz drugih studija, stoga upućuju na teoretsku valjanost podataka.

#### 4.2. Analiza povezanosti karcinom bubrega i serumske koncentracije 25(OH)D

Vjerojatnost pojave karcinoma bubrega pokazuje nelinearnu povezanost sa serumskim koncentracijama 25(OH)D. Navedeno se može iščitati iz rezultata prikazanih u tablicama 3 i 4 te je grafički prikazano na slici 3. Na slici 3 vidi se kako je s višim vrijednostima 25(OH)D zabilježen pad vjerojatnosti pojave karcinoma bubrega. Međutim, pri vrijednostima višim od 70-75 nmol/L uočava se njen porast. Stoga, zbog krivulje u obliku slova U ne postoji razlika u riziku za dobivanje karcinoma bubrega između najnižeg i najvišeg kvartila vrijednosti cirkulirajućeg 25(OH)D. Sličan nelinearan odnos u obliku U-krivulje već je prethodno opisan u dostupnoj literaturi te je oblik krivulje poduprt i rezultatima logističkih regresija kako stratificiranih tako i nestratificiranih podataka(27).



**Slika 3. Odnos vjerojatnosti pojave karcinoma bubrega i serumske koncentracije 25(OH)D**



Rezultati prikupljenih podataka za karcinom bubrega prikazani su u Tablici 4. Povećanje koncentracije 25(OH)D statistički je značajno povezano sa smanjenim rizikom od razvoja karcinoma bubrega. Drugim riječima, vrijednosti 25(OH)D iz kategorija 2 i 3 statistički su značajno povezane sa smanjenim rizikom od karcinoma bubrega u odnosu na kategoriju 1 gdje su vrijednosti 25(OH)D niže od 30 nmol/L. S druge strane nije pronađena značajna razlika u riziku između dviju krajnjih kategorija.

Prilagodbom za kovarijable (prilagođeni model u Tablici 3) koje su prethodnim istraživanjima povezane s karcinomom bubrega, uključujući pušenje, konzumiranje alkohola, opekline od sunca te stupanj postignutog obrazovanja, u određenoj je mjeri promijenilo glavni rezultat. Povećanje koncentracije 25(OH)D uglavnom nije povezano sa smanjenim rizikom za karcinom bubrega u 5%-tnom intervalu. Iako zadržan smjer odnosa, rezultati prilagođenih modela su manje uvjerljivi.

Tablica 3. Omjeri vjerojatnosti i 95%-tni intervali pouzdanosti za povezanost između koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D i rizika za karcinom bubrega.

		Osnovni logistički model (neprilagođeni) <sup>a</sup>	Prilagođeni logistički modeli <sup>a,b</sup>
		Karcinom bubrega	Karcinom bubrega
	<b>Broj</b>	144	144
<b>&gt;30&amp;&lt;50 nmol/L</b>	<b>OR</b>	0.26	0.3
	<b>95% CI</b>	0.09-0.76	0.07-1.26
	<b>p</b>	0.01	0.1
<b>&gt;50&amp;&lt;75 nmol/L</b>	<b>OR</b>	0.20	0.32
	<b>95% CI</b>	0.07-0.61	0.07-1.4
	<b>p-value</b>	0.001	0.13
<b>&gt;75nmol/L</b>	<b>OR</b>	0.43	0.9
	<b>95% CI</b>	0.13-1.39	0.2-3.9
	<b>p</b>	0.16	0.91

Korištene pokrate: OR-omjer vjerojatnosti, CI- interval pouzdanosti

<sup>a</sup> Izostavljena referentna kategorija je kategorija 1 (<30 nmol/L).

<sup>b</sup> Prilagođeni modeli prilagođeni su za dob, spol, stečeni stupanj obtazovanja, konzumaciju alkohola, profesionalnu izloženost suncu, pušenje cigareta i konzumaciju plave ribe

Analiza stratificirana po spolu (Tablica 4) pokazuje da su niske koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D statistički značajno povezane s većim rizikom od karcinoma bubrega ( $p > 0.01$ ) kod muškaraca. Isto se ne može reći za žene gdje je stratificiranom analizom pokazano kako nije pronađena statistički značajna povezanost između niskih koncentracija serumskog 25(OH)D i karcinoma bubrega te nelinearan odnos u obliku U-krivulje nije zamijećen. U analizi stratificiranoj po godišnjem dobu (Tablica 4) zamijećeno je kako su niske koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D statistički značajno povezane s većim rizikom za karcinom bubrega u grupi gdje su uzorci prikupljeni u

zimskom periodu. Međutim, takav oblik povezanosti nije zamijećen za uzorke uzete u ljetnom periodu.

Tablica 4. Omjeri vjerojatnosti i 95%-tni intervali pouzdanosti za povezanost između koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D i rizika za karcinom bubrega prilagođeni za dob, godišnje doba i pušenje cigareta.

	N	>30&<50 nmol/L			>49.9& <75 nmol/L			>74.9 nmol/L		
		OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
<b>Muškarci</b>	112	0.32	0.09-1.16	0.08	0.25	0.06-0.95	0.04	0.34	0.08-1.43	0.14
<b>Žene</b>	32	0.29	0.03-2.32	0.24	0.17	0.02-1.44	0.1	1.71	0.12-23.9	0.69
<b>Zima</b>	41	0.25	0.06-1.07	0.06	0.19	0.04-0.88	0.03	0.46	0.1-2.11	0.32
<b>Ljeto</b>	103	0.66	0.11-3.9	0.65	0.33	0.06-1.88	0.21	1.33	0.1-17.1	0.88
<b>Pušači</b>	44	0.20	0.25-0.63	0.32	-	-	-	2	78.2	0.71
<b>Nepušači</b>	100	0.13	0.26-0.67	0.01	0.37	0.91-1.61	0.19	0.77	0.17-3.41	0.73

Korištene pokrate: OR-omjer vjerojatnosti, CI- interval pouzdanosti

## 5. RASPRAVA

Dobiveni rezultati pokazuju kako su više vrijednosti cirkulirajućeg 25(OH)D povezane s nižim stopama incidencije karcinoma bubrega u sjevernom priobalju Hrvatske. Navedeni nalaz o inverznom odnosu koncentracije 25(OH)D i rizika za razvoj raka uklapa se u nalaze većine epidemioloških studija koje su istraživale povezanost s drugim histološkim tipovima raka (34). Postojeći dokazi o povezanosti vrijednosti 25(OH)D i karcinoma bubrega su oskudni te oprečni. Naš rezultat povezanosti u obliku U-krivulje usporediv je s istraživanjem koje su proveli Gallicchio i suradnici, a koje je pokazalo kako ne postoji niti porast niti smanjenje rizika za razvoj karcinoma bubrega u skupini najvišeg kvartila vrijednosti u odnosu na onu s najnižim kvartilom vrijednosti cirkulirajućeg 25(OH)D (35). Koristeći stratificirane podatke pronašli smo potvrdu glavnog pronalaska među podacima stratificirane za muškarce i uzorke krvi prikupljene zimi. Za žene nismo pronašli statistički značajnu povezanost između cirkulirajućih vrijednosti 25(OH)D i karcinoma bubrega što se vjerojatno može objasniti manjom zastupljenošću žena u našem uzorku. Slično tome većina uzoraka krvi prikupljena je u zimskom periodu što je očito imalo učinka na snagu stupnja povezanosti u grupi uzorka prikupljenih ljeti. Međutim, rezultati prilagođenih proširenih modela nisu toliko uvjerljivi. Razlog se vjerojatno krije u manjoj veličini uzorka i potencijalno neotkrivenim odnosima između kovarijabli koji djeluju u više smjerova. Iako, analiza nakon procjene nije otkrila problem s multikolinearnošću. Gallicchio sa suradnicima nije pronašao poveznicu između niskih koncentracija serumskog 25(OH)D i rizika za karcinom bubrega u muškaraca i žena, ali je dokazao kako su koncentracije 25(OH)D > 75 nmol/L, sa statističkom značajnošću u intervalu od 12%, povezane s povećanim rizikom za karcinom bubrega kod muškaraca. Ovo posljednje donekle potvrđuje naš rezultat o većem riziku za karcinom bubrega pri višim serumskim koncentracijama 25(OH)D.

Ljudski bubreg ključan je organ za metabolizam vitamina D s obilnom aktivnošću 1 $\alpha$ -hidroksilaze. Autokrini/parakrini sinteza 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> je glavna posebnost bubrega koja možda pridonosi njegovoj normalnoj fiziologiji. Prema podacima registra za rak postoje razlike u incidenciji za karcinom bubrega između muškaraca i žena, pri čemu stopa incidencije na 100 000 stanovnika za muškarce iznosi 27.6, a za žene 13.1 (18). Valja naglasiti kako Hrvatskoj nedostaju adekvatni podaci o serumskim vrijednostima vitamina D u populaciji, a isti bi zasigurno pomogli boljem razumijevanju odnosa između deficijencije vitamina D i rizika za razvoj raka. Trebalo bi provesti velika istraživanja unutar populacije s ciljem dobivanja reprezentativnog populacijskog uzorka koji bi se mogao uspoređivati s epidemiološkim podacima o serumskim koncentracijama 25(OH)D u svijetu. U ograničenja naše studije treba spomenuti i određivanje vrijednosti 25(OH)D na temelju samo jednog uzorka krvi. Višestruko uzorkovanje tokom različitih mjeseci u godini moglo bi dovesti do preciznije procjene vrijednosti 25(OH)D unutar ispitivanih skupina. Premda, Jorde i suradnici su dokazali kako je dovoljno jedno uzorkovanje 25(OH)D u epidemiološkim studijama čiji cilj je povezivanje niskih serumskih koncentracija vitamina D s povećanim rizikom pojave oboljenja i povećanja smrtnosti(36). Naša studija je prva epidemiološka studija koja je istražila odnos serumskih koncentracija 25(OH)D i stope incidencije karcinoma bubrega u Hrvatskoj

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem rezultata *in vitro* i *in vivo* istraživanja koji govore u prilog antitumorskog učinka vitamina D odlučili smo provesti istraživanje o odnosu koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D i rizika za karcinom bubrega. Rezultati istraživanja pokazali su kako je taj odnos nelinearan, a može se opisati U-krivuljom pri čemu niži rizik za karcinom bubrega postoji pri vrijednostima 25(OH)D između 30 i 75 nmol/L. Rezultati prilagođenih modela za kovarijable pušenje, konzumiranje alkohola, opekline od sunca i stupanj obrazovanja, nisu toliko uvjerljivi te nije pronađena statistička značajnost premda je oblik krivulje odnosa zadržan.

Stratifikacijom po spolu uočilo se kako niske koncentracije 25(OH)D značajno povećavaju rizik od karcinoma bubrega kod muškaraca, ali ne i kod žena. Stratifikacijom po dobu godine, primijećen je veći rizik za karcinom bubrega kod osoba u kojih je uzorak krvi uzet zimi, a izmjerena im je niža vrijednost cirkulirajućeg 25(OH)D. Moguća objašnjenja rezultata stratificirane analize iznesena su u raspravi ovoga rada. Iako dobivene rezultate treba dodatno provjeriti kliničkim ispitivanjima, oni ukazuju na važan odnos između vitamina D i prevencije raka.

## 7. SAŽETAK

Vitamin D je liposolubilan spoj čija je osnovna uloga održavanje homeostaze kalcijevih iona u organizmu. No, receptor vitamina D i enzim 1 $\alpha$ -hidroksilaza prisutni su u mnogim tkivima što čini temelj pretpostavke, koja je *in vitro* i *in vivo* modelima i potvrđena, kako uz osnovnu postoje i druge uloge vitamina D. Prema dostupnoj literaturi jedna od njih je i antitumorska aktivnost. Cilj ovoga rada bio je istražiti postoji li povezanost i koji je oblik povezanosti između koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D i incidencije karcinoma bubrega. Istraživanje je obuhvatilo 227 osoba, od čega je njih 144 dijagnosticirano s karcinomom bubrega, a 83 sudionika su činila kontrolnu skupinu. Ispitanicima je imunoenzimskim testom određena serumska koncentracija 25(OH)D, a anketnim upitnikom su prikupljeni podaci koji su kasnije korišteni u regresijskim modelima prilikom statističke obrade podataka.

Statističkom obradom podataka pronađen je nelinearan odnos u obliku U-krivulje između cirkulirajućeg 25(OH)D i incidencije karcinoma bubrega pri čemu je porast koncentracije do 75 nmol/L obrnuto proporcionalan s incidencijom karcinoma bubrega, a isto se ne može reći za vrijednosti više od navedene u odnosu na skupinu s vrijednostima nižim od 30 nmol/L. Rezultati prilagođenih modela za određene parametre nisu toliko uvjerljivi. Stratifikacijom podataka pokazalo se kako niske vrijednosti 25(OH)D značajno povećavaju rizik kod muškaraca. Istraživanje je pokazalo važan odnos između koncentracije cirkulirajućeg 25(OH)D i karcinoma bubrega koji se može opisati U-krivuljom premda vrijednost dobivenih rezultata svakako treba provjeriti kliničkim studijama.

Ključne riječi: Karcinom bubrega; Omjer šansi; Vitamin D

## 8. SUMMARY

Vitamin D is a liposoluble compound whose primary role is maintaining the homeostasis of calcium levels in the body. However, vitamin D receptor and enzyme 1 $\alpha$ -hydroxylase are present in many tissues, which forms the basis of the assumption, which is confirmed in in vitro and in vivo models, of additional roles of vitamin D. According to the available literature one of them is antitumor activity. The aim of this study was to determine the association and shape of that association between circulating 25(OH)D levels and the incidence of kidney cancer. 227 people were included in the study, 144 were diagnosed with kidney cancer, and remaining 83 participants formed the control group. *Serum 25(OH)D was measured with an enzyme immunoassay*, while other data used in regression models during statistical analysis were collected with the questionnaire.

Statistical analysis revealed a non-linear association in the form of a U-shaped curve between circulating 25(OH)D levels and the incidence of kidney cancer. Incidence is reversely proportional to increasing 25(OH)D levels till the value of 75 nmol/L compared to the group with levels lower than 30 nmol/l, where there was no difference in incidence between the groups with highest and lowest levels of 25(OH)D. Results of adjusted models for certain parameters are not as conclusive. Stratification of the data showed that low values 25(OH)D significantly increased the risk in men. Research has shown an important association in form of U-shaped curve between circulating 25(OH)D and kidney cancer, although the value of the results obtained should certainly be explored by clinical trials.

Key words: Incidence, Kidney cancer; Odds ratio; Vitamin D



## 9. LITERATURA

1. Ods.od.nih.gov [Internet]. Bethesda: NIH Office of Dietary Supplements; [ažurirano 7.8.2019.;citirano20.1.2020.].Dostupnona:<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>
2. Pazirandeh S, Burns DL. Overview of vitamin D. U: UpToDate, Motil KJ, Drezner MK ed. UpToDate[Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.1.2020.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
3. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrien, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients* [Internet]. 3.11.2018. [citirano 20.1.2020.];2018; 10(11):1656. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6266123/>
4. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med.*2007;357:266-81
5. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1689S-96S
6. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D:Metabolism. *Endocrinol Mateb Clin North Am.*2010;39(2):243-53
7. Pike JW, Meyer MB, Lee S, Onal M, Benkusky NA. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. *J Clin Invest.*2017;127(4):1146-54
8. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):95-102
9. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103:316-21

10. Diaz L, Diaz-Munoz M, Garcia-Gaytan AC, Mendez I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients*.2015;7(6):5020-50
11. Ness RA, Miller DD, Li W, The role of vitamin D in cancer prevention. *Chin J Nat Med*. 2015; 13(7):481-97
12. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.2011;51:311-36
13. Picotto G, Liaudat AC, Bohl L, Tolosa de Talamori N. Molecular Aspects of Vitamin D Anticancer Activity. *Cancer Invest*.2012;30(8):604-14
14. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M., urednici. *Patologija*. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
15. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States). *Cancer Causes Control*.2005;16:83-95
16. Atkins MB, Choueiri TK. Epidemiology, pathology, and pathogenesis of renal cell carcinoma. U: UpToDate, Richie JP ed. UpToDate[Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.2.2020] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
17. Kidney Cancer (KC) Factsheet. European Network of Cancer Registries. ENCR Factsheets. February 2017; Dostupno na: [https://www.encl.eu/sites/default/files/factsheets/ENCR\\_Factsheet\\_Kidney\\_2017.pdf](https://www.encl.eu/sites/default/files/factsheets/ENCR_Factsheet_Kidney_2017.pdf)
18. Šekerija M, Bubanović LJ, Novak P, Veltruski K, Glibo M, Stavinoha M et al. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017., Bilten 42, Zagreb, 2020.
19. Atkins MB. Clinical manifestations, evaluation, and staging of renal cell carcinoma. U: UpToDate, Richie JP ed. UpToDate[Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.2.2020] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>

20. Fučkar Ž, Španjol J. Urologija II (specijalni dio). Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2013.
21. Radiopaedia.org [Internet]. Radiopaedia.org. 2020 [citirano 20.2.2020.]. Dostupno na: <https://radiopaedia.org/articles/renal-cell-carcinoma-1>
22. Atkins MB. Overview of the treatment of renal cell carcinoma. U: UpToDate, Richie JP ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.2.2020] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
23. Choueiri TK. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma. U: UpToDate, Richie JP, Atkins MB ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.2.2020] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
24. Sheng L, Callen DF, Turner AG. Vitamin D3 signalling and breast cancer: Insights from transgenic mouse models. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;178:348-353
25. Shahvazi S, Soltani S, Ahmadi SM, de Souza RJ, Salehi-Abargouei A. The Effect of Vitamin D Supplementation on Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Horm Metab Res.* 2019;51:11-21
26. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S et al. VITAL Research Group. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2019;380:33-44
27. Muller DC, Fanidi A, Midttun Ø, Steffen A, Dossus L, Boutron-Ruault MC et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D3 in relation to renal cell carcinoma incidence and survival in the EPIC cohort. *Am J Epidemiol.* 2014;180(8):810-20
28. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer. *Clin Chem.* 2013;59(5):771-80

29. Joh HK, Giovanucci EL, Bertrand KA, Lim S, Cho E. Predicted plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of renal cell cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(10):726-32
30. Lin ZJ, Zhang XL, Yang ZS, She XY, Xie Y, Xie WJ. Relationship between Vitamin D receptor gene polymorphism and renal cell carcinoma susceptibility. *J Cancer Res Ther.* 2018;14:820-825
31. Lindström J, Tuomilehto J. The diabetes risk score: a practical tool to predict type 2 diabetes risk. *Diabetes Care.* 2003;26(3):725-31
32. Ioannidis G, Jantzi M, Bucek J, Adachi JD, Giangregorio L, Hirdes J et al. Development and validation of the Fracture Risk Scale (FRS) that predicts fracture over a 1-year time period in institutionalised frail older people living in Canada: an electronic recordlinked longitudinal cohort study. *BMJ Open*[Internet]1.9.2017. [citirano 1.5.2020.];2017;7:e016477.  
Dostupno na: <https://bmjopen.bmj.com/content/7/9/e016477.info>
33. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640-5
34. Bouillon R. Vitamin D and extraskeletal health. U: UpToDate, Rosen CJ, Mulder JE ed. UpToDate[Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020 [citirano 20.2.2020]  
Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
35. Gallicchio L, Helzlsouer KJ, Chow WH, Freedman DM, Hankinson SE, Hartge P et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and the risk of rarer cancers: Design and

methods of the Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *Am J Epidemiol.* 2010;172(1):10-20

36. Jorde R, Sneve M, Hutchinson M, Emaus N, Figenschau Y, Grimnes G. Tracking of serum 25-hydroxyvitamin D levels during 14 years in a population-based study and during 12 months in an intervention study. 2010. *Am J Epidemiol*;171(8):903-8

## 10. ŽIVOTOPIS

Domagoj Mičetić, rođen 31. listopada 1995. godine u Rijeci, pohađao je Osnovnu školu Vežica te Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci, cijelo vrijeme pokazujući sklonost prema prirodnim znanostima, nakon čega je 2014. godine upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.

Tijekom fakultetskog obrazovanja istaknuo se odličnim uspjehom te je za isti nagrađen dvjema dekanovim nagradama za izvrsnost. Uz svladavanje obaveza obnašao je dužnost demonstratora na Zavodu za anatomiju, Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Katedri za internu medicinu te u Kabinetu vještina pri Katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje. U akademskoj godini 2019./2020. preuzeo je dužnost voditelja demonstratora na Zavodu za anatomiju. Nadalje, znatan dio vremena posvetio je studentskom aktivizmu radom u Međunarodnoj udruzi studenata medicine Hrvatska (CroMSIC) kao član organizacijskog odbora Natjecanja u kliničkim vještinama i Ljetne škole medicine ronjenja te obnašajući dužnost lokalnog dužnosnika za profesionalne razmjene u akademskoj godini 2018./2019. Znanje i vještine upotpunio je sudjelujući kako aktivno tako i pasivno na studentskim kongresima i znanstvenim skupovima te odlaskom na dvije međunarodne profesionalne razmjene u Portugal 2018. i Japan 2019. godine.