

Povezanost vitamina D3 s rizikom od virusne respiracijske infekcije u osoba starije životne dobi

Godan Hauptman, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:619282>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Godan Hauptman

**Povezanost vitamina D3 s rizikom od
virusne respiracijske infekcije u osoba
starije životne dobi**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Godan Hauptman

**Povezanost vitamina D3 s rizikom od
virusne respiracijske infekcije u osoba
starije životne dobi**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertaciju posvećujem majci

Disertacija je najvećim dijelom izrađena u Klinici za dječje bolesti Zagreb i u KBC Zagreb (Zavod za metaboličke bolesti). Jedan dio istraživanja izrađen je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Služba za kliničku mikrobiologiju. Rutinski laboratorijski testovi radili su se u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti, Rockefellerova 3, Zagreb u onih ispitanika koji su imali simptome respiracijske infekcije. Ispitanici su bile osobe smještene u dva Doma za starije i nemoćne osobe „Godan“ u Zagrebu.

Voditeljice rada: izv.prof. dr. sc. Amarela Lukić-Grlić i doc.dr.sc. Alenka Gagro, dr.med.

Zahvale:

Mentoricama doc.dr.sc. Alenki Gagro, dr.med. i izv.prof. dr. sc. Amareli Lukić-Grlić, na razumijevanju i pomoći koju su mi pružale tijekom izrade rada.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Starenje i starost: od definicije do posljedica	1
1.2.1. Biološko starenje.....	2
1.2.1.1. Genetičke teorije starenja.....	3
1.2.1.2. Fiziološke teorije starenja	3
1.2.1.3. Imunološka teorija starenja	4
1.2.1.4. Neuroendokrinološka teorija starenja.....	6
1.2.2. Psihološko starenje	7
1.2.3. Socijalno starenje	7
1.3. Demografsko starenje	8
1.4. Domovi za starije i nemoćne osobe	9
1.5. Ljestvice za procjenu krhkosti u starijih osoba	11
1.5. Virusne respiracijske infekcije u starijih osoba.....	14
1.6. Vrste, prednosti i mane metoda za detekciju respiracijskih virusa u starijih osoba	15
1.7. Cijepljenje protiv gripe u starijih osoba	20
1.8. Uloga vitamina D u zdravlju i bolesti	20
2. HIPOTEZA	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3.1. Opći cilj	24
3.2. Specifični ciljevi.....	24
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	25
4.1. Ispitanici.....	25
4.1.1. Uzorci krvi za analizu	26
4.1.2. Suplementacija vitaminom D	26
4.1.3. Uzorci od bolesnika sa simptomima respiracijskih infekcija.....	26
4.2. Metode rada.....	27
4.2.1. Određivanje vitamina D u serumu	27
4.2.3. Određivanje antitijela protiv citomegalovirusa (CMV) razreda IgG.....	28
4.2.4. Detekcija virusnih antigena testom	28
4.2.5. Statistička analiza	29
5. REZULTATI	30
5.1. Prikaz socio-demografskih i kliničkih karakteristika uključenih ispitanika.....	30
5.2. Koncentracija vitamina D u serumu ispitanika na početku istraživanja	31

5.3. Učinak suplementacije vitaminom D na povećanje vrijednosti vitamina D u serumu nakon tri mjeseca.....	31
5.4. Usporedba sociodemografskih i kliničkih vrijednosti između ispitanika s povećanjem koncentracije vitamina D i ispitanika u kojih su vrijednosti ostale iste ili su niže nego na početku istraživanja	35
5.5. Kliničke i laboratorijske varijable u ispitanika s virusnom respiracijskom infekcijom.....	36
5.6. Usporedba kategorijskih socio-demografskih i kliničkih varijabli obzirom na pozitivan bris na gripu	38
5.7. Učinak suplementacije vitaminom D na incidenciju i kliničku sliku respiracijske infekcije u odnosu na razinu serumskog IgG protiv CMV-a	42
6. RASPRAVA	43
7. ZAKLJUČCI	51
8. SAŽETAK	53
9. SUMMARY	55
10. LITERATURA.....	57
11. ŽIVOTOPIS	70

POPIS OZNAKA I KRATICA

AST	aspartat aminotransferaza
ALT	alanin aminotransferaza
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CI	engl. <i>confidence interval</i>
CMV	citomegalovirus
CRP	C-reaktivni protein
CVI	cerebrovaskularni inzult
EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
gamaGT	gama-glutamil transferaza
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
KKS	kompletna krvna slika
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
25-[OH]D	25-hidroksivitamin D
OR	engl. <i>odds ratio</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
POC	engl. <i>point-of-care</i>
RSV	respiratorni sincicijski virus
RLU	engl. <i>relative light unit</i>
SE	sedimentacija eritrocita
TCR	engl. <i>T cell receptor</i>
Th	<i>T-helper</i> (od engl. pomoćnički T)
VIDA	engl. <i>Vitamin D Assessment</i>
VITAL	engl. <i>VITamin D and OmegA-3 Trial</i>

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Starenje i starost: od definicije do posljedica

Starenje je složeni, fiziološki i individualan proces postupnog i progresivnog smanjenja strukture i funkcije organa i organskih sustava koji nastaje utjecajem nasljeđa, zdravlja i okolinskih faktora. Za razliku od starenja, starost predstavlja određeno životno razdoblje povezano s kronološkom dobi osobe. Važno je istaknuti da se starost ne može izjednačiti s lošim zdravljem i invalidnošću, premda starija dob znači i sve više zdravstvenih problema (1).

Najstarija tumačenja starenja nalazimo u mitovima koji potječu iz pradavnih vremena koja su potom utkana u razne religije i na taj način pomogla ljudima da lakše prihvate misterij starenja. Prema mitologiji, prvi ljudi živjeli su jako dugo, točnije po nekoliko stotina godina. U Starom zavjetu spominju se Adam i Eva, Noa i Metuzalem. U starogrčkoj mitologiji bogovi i njihovi potomci kao i miljenici živjeli su nekoliko tisuća godina. Mit o pomlađivanju također potječe iz pradavnih vremena, te u srednjem vijeku postaje opsesijom alkemičara koji su nastojali otkriti eliksir života, fontanu mladosti i kamen mudraca. Prvi pokušaji da se znanstvenom metodom objasni proces starenja zabilježen je u 17. stoljeću kada je Bacon nastojao opažanjem otkriti uzrok starenja. Prvi uspon u razvoju istraživanja starenja i starosti nastupio je sredinom 1940-ih godina, kad su se u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama počeli razvijati instituti za gerontološka istraživanja, gerontološka udruženja te Odsjek za zrelost i starost Američkog psihološkog udruženja. Istraživanje svih aspekata mehanizama starenja posebno je kulminiralo u posljednjih tridesetak godina.

U razmatranju uzroka i posljedica starenja, važno je razlikovati pojmove primarnog i sekundarnog starenja. Primarno starenje koje još nazivamo fiziološko starenje ili senescencija, odnosi se na normalne, fiziološke procese koji su određeni neizbježnim unutarnjim biološkim čimbenicima i posljedica su sazrijevanja ili protoka vremena (npr. menopauza u žena ili promjene aktivnosti središnjeg živčanog sustava). Sekundarno starenje rezultat je patoloških promjena kao posljedice učinka vanjskih čimbenika, uključujući bolest, okolinske utjecaje i ponašanje (npr. pušenje, smanjenja fizičke aktivnosti i sl.) (2).

Razlikujemo tri osnovna pojma starenja: biološko, psihološko i socijalno (3).

1.2.1. Biološko starenje

Biološko starenje određuje individualna sposobnost prilagodbe organizma na uvjete okoline pa na biološkoj razini osoba može biti puno mlađa ili starija od svoje dobne skupine (4). Starenje je povezano s postupnim gubitkom homeostatskih mehanizama koji održavaju strukturu i funkciju tkiva odraslog organizma. Tako starenje dovodi do iscrpljenja matičnih stanica (engl. stem cells), poremećaja funkcije mitohondrija, poremećaja imunoloških funkcija, smanjenja autofagije, epigenetičkih promjena, nakupljanja somatskih i mitohondrijskih mutacija DNA poremećaja međustanične komunikacije, gubitka telomera, poremećaja osjetljivosti na nutrijente i poremećaja homeostaze bjelančevina (5,6).

Najveći utjecaj na očekivano trajanje života u ljudi imaju čimbenici okoliša (oko 75%), poput prehrane, konzumacije duhana i alkohola, tjelovježbe i duhovnosti (7-9). Obiteljske studije na blizancima i drugim članovima obitelji utvrdile su da je učinak gena na dugovječnost oko 25% (10).

Jedan od glavnih izazova u istraživanju starenja je kako razlikovati uzroke starenja stanica i tkiva od promjena koje ih posljedično prate. S današnjeg gledišta, znamo da je starenje neizbježan proces, te da niti jedna teorija uzroka starenja nije u potpunosti prihvatljiva. Za sada bi za pokušaj objašnjenja starenja trebalo prihvatiti više teorija istodobno te njihovu mogućnost ispreplitanja (11).

U nastavku opisujem teorije biološkog starenja temeljene na njihovim pretpostavljenim uzrocima.

1.2.1.1. Genetičke teorije starenja

Do sada su opisane dvije genetičke teorije starenja: teorija pogreške i teorija programiranog starenja. Teorija pogreške stavlja u prvi plan DNA i RNA kao genetički informacijski sustav stanica. Informacija koja se stvara u tim molekulama i koja se prenosi u enzime i sintezu proteina podložna je nastanku pogreške. Rezultat je sinteza inaktivnih formi proteina koji su disfunkcionalni. Iz ove teorije proizlazi da je fizički vijek organizma u obrnutom razmjeru sa stopom mijene tvari. To znači, što je mijena tvari intenzivnija, veća je mogućnost tzv. biokemijske pogreške i bržeg procesa starenja. Teorija programiranog starenja stavlja na prvo mjesto genetički programirano starenje i govori da postoje specifični geni koji kodiraju životni vijek stanice na principu skraćivanja telomera. Prema toj teoriji starenje je programirano kao i svako drugo životno doba čovjeka (12).

1.2.1.2. Fiziološke teorije starenja

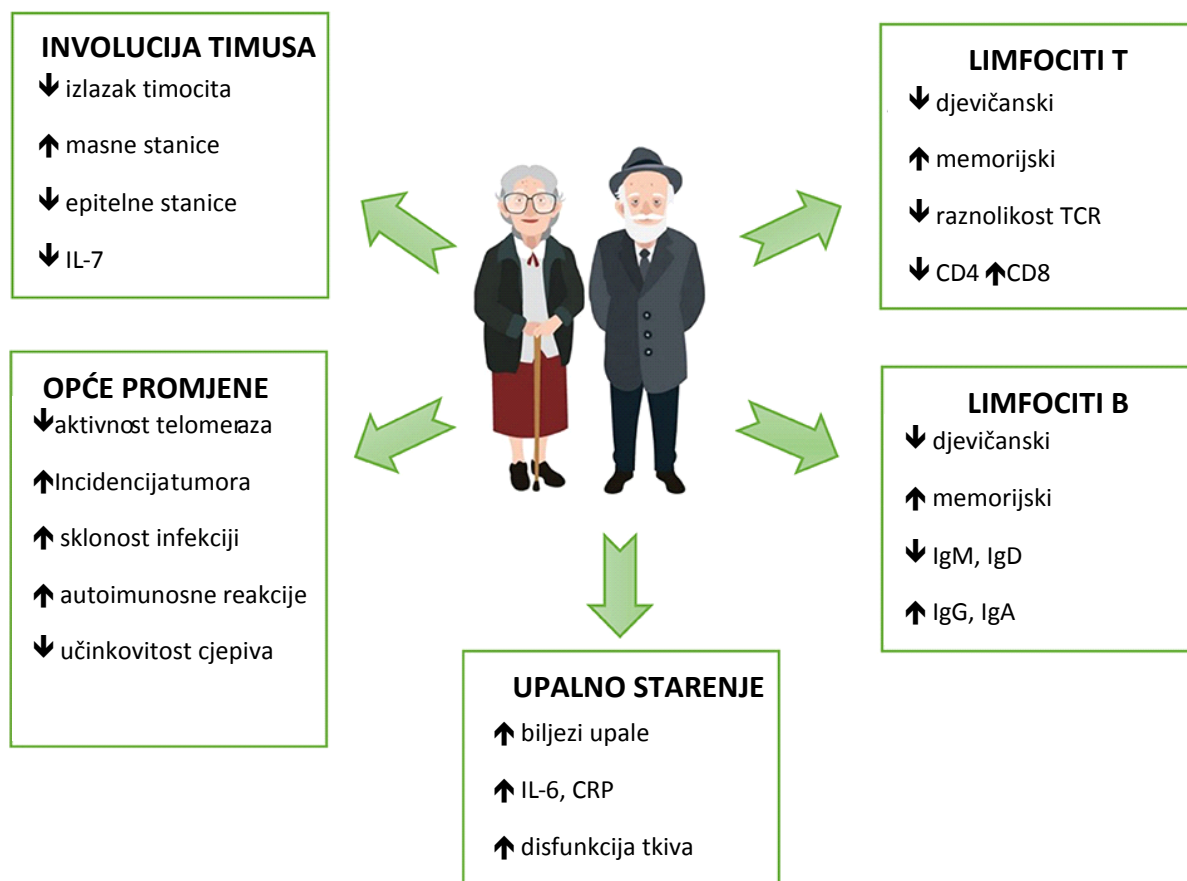
U fiziološke teorije starenja ubrajamo teoriju slobodnih radikala, križne povezanosti i nakupljanja otpadnih tvari. Slobodni radikali su molekule koje sadrže jedan neparni elektron. Taj neparni elektron ima tendenciju davanja ili oduzimanja elektrona drugim molekulama, stoga su slobodni radikali vrlo reaktivni, ali kratkog vijeka. Stvaraju se u tijelu u normalnim uvjetima tijekom metaboličkih procesa, samo mali broj slobodnih radikala ulazi u stanicu i vrlo štetno djeluje na organizam. Smatra se da slobodni radikali štetno djeluju na sintezu unutar DNA kao i na sintezu proteina, primjerice na kolagen, elastin te ubrzavaju proces fibroze unutar intime krvnih žila. Također se smatra da su slobodni radikali odgovorni za degenerativne promjene mozga, imaju negativan učinak na imunološki sustav te pospješuju razvoj mutacija odgovornih za nastanak tumorskih stanica (13).

Osnova teorije križne povezanosti je stvaranje kovalentnih veza između dviju ili više makromolekula ili njihova spajanja s vodikom. Time nastaju agregati makromolekula čiji je rezultat gubitak unutarstanične funkcije nastajanjem mutacija čime nastaje definitivno propadanje stanice (14).

Teorija nakupljanja otpadnih tvari zasniva se na nalazu pigmenta starenja – lipofuscina. Starenjem se lipofuscin nagomilava u tkivu te time ometa funkciju. Nakupljanje lipofuscina koji je mikroskopski gledajući žuto-zeleni pigment proporcionalno je dobi. Lipofuscin je produkt autooksidativne reakcije, što dokazuje činjenica da se njegova količina povećava s nedostatkom vitamina E (15).

1.2.1.3. Imunološka teorija starenja

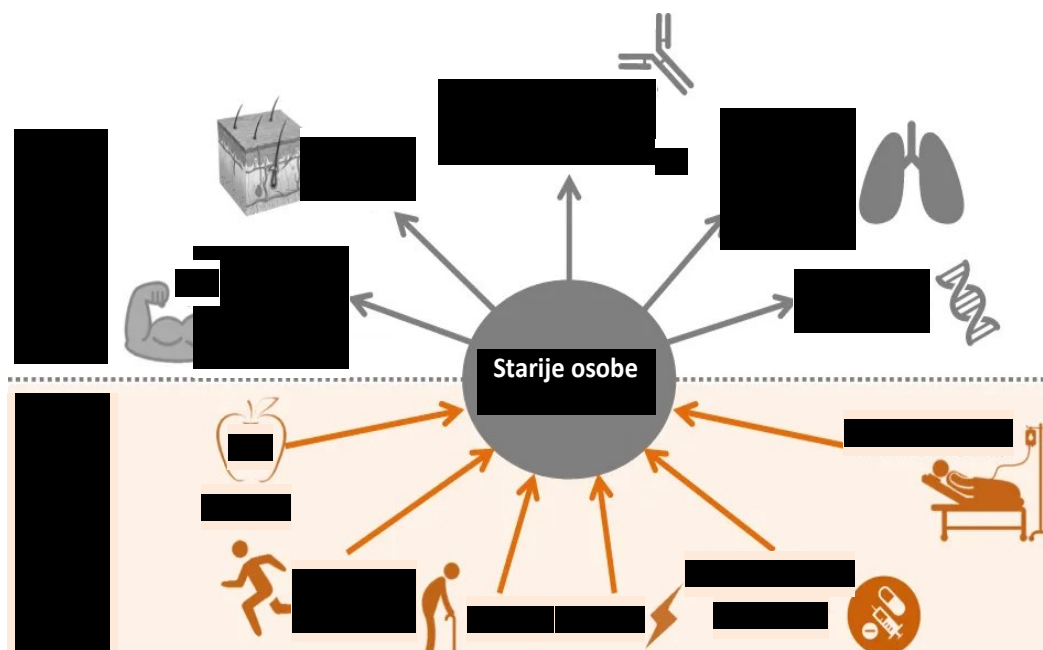
Imunološka teorija starenja temeljena je na činjenicama da u imunološkom sustavu dolazi do promjena u stvaranju protutijela koja su ili disfunkcionalna u obrani organizma ili postaju autoreaktivna te reagiraju na vlastiti organizam. Imunološkoj teoriji doprinosi činjenica da timus kao ključni organ negativne i pozitivne selekcije T-limfocita atrofira starenjem, smanjeno je lučenje interleukina (IL)-7 važnog za diferencijaciju limfocita, a imunocite i epitelne stanice timusa zamjenjuju masne stanice. U starijih osoba mijenjaju se i limfociti T pa tako se smanjuje broj djevičanskih i povećava broj memorijskih stanica, raznolikost receptora limfocita T se smanjuje (TCR, od engl. T cell receptor), a broj pomoćničkih (CD4) smanjuje dok se broj citotoksičkih (CD8) limfocita T povećava. Limfociti B luče također više IgG i IgA, a manje IgM te IgD, većina ih je memorijskih. Također su opisani i indirektni pokazatelji pojačane upale kao što su povećano lučenje C-reaktivnog proteina (CRP) i IL-6. Smanjuju se također funkcije tkiva kao i aktivnost telomeraza, povećava sklonost nastanku tumora i autoimunskih reakcija. Slika 1 prikazuje najvažnije promjene imunosustava koje su opažene u starijih osoba i koje se zajednički nazivaju imunosenescencijom (16).



Slika 1. Imunološke i ostale biološke promjene povezane sa starenjem (16).

Važan aspekt u razumijevanju imunosenescencije predstavlja i razumijevanje mehanizama upalom posredovanog starenja (engl. *inflamm-aging*) kojeg su prvi predložili Franceschi i sur. 2000. godine (17). Brojni su dokazi koji pokazuju da se *inflamm-aging* može povezati s nastankom i kliničkim manifestacijama bolesti koje imaju povišenu incidenciju u osoba starije životne dobi kao što su ateroskleroza, šećerna bolest tip II, osteoporoza, Alzheimerova bolest i autoimunosne bolesti (18).

Slika 2 prikazuje čimbenike koji utječu na starenje organizma te posljedice starenja koji uključuju i povećanu sklonost infekcijama i slabiji odgovor na cjepiva u starijih osoba (19).



Slika 2. Čimbenici koji utječu na imunosenescenciju. Na starenje utječu brojni intrinzički i okolišni čimbenici koji za posljedicu imaju progresivni poremećaj funkcije različitih organa i sustava, uključujući i imunoreaktivnost, čime se povećava osjetljivost na infekcije i smanjuje reakcija na cijepljiva (19).

Istraživanja imunosenescencije pokazala su i moguću ulogu latentne infekcije citomegalovirusom (CMV). Taj beta-herpes virus najčešće dovodi do asimptomatske infekcije u zdravih osoba. Međutim, većina starijih osoba ima protutijela na taj virus koja su odraz latentne infekcije pa se CMV smatra jednim od ključnih virusa koji djeluju kao kronični antigenski stimulus važan za imunosenescenciju (20). Tako je pokazano da starenjem potaknute promjene prvenstveno T-stanične imunosti dodatno su pojačane latentnom infekcijom s CMV-om čime se povećava rizik za respiracijske virusne infekcije u starijih osoba (21). Neučinkovitost cjepiva protiv gripe također se povezuje i s reaktivacijom CMV-infekcije u starijih osoba (22).

1.2.1.4. Neuroendokrinološka teorija starenja

Neuroendokrinološku teoriju starenja prvi su predložili Dilman i suradnici 1992. godine (23). Starenjem se razina hormona smanjuje što je posljedica atrofije

endokrinih žlijezda, smanjene sekrecije različitih hormona, njihove smanjene periferne konverzije u aktivni oblik, pojave protutijela kao i različitih bolesti koje same ili zbog lijekova kojima se liječe starije osobe zbog različitih bolesti utječu na biotransformaciju i eliminaciju hormona. Drugi mogući mehanizam koji podupire neuroendokrinološku teoriju starenja je dobno sniženje razine hormona koje je odraz protektivnog usporavanja staničnog metabolizma. Taj koncept zasniva se na tempu starenja prema „brzini življenja“, tj. što je brža metabolička mijena, to će prije osoba ostariti i umrijeti. Čini se da ovu teoriju potkrijepljuju pokusi na glodavcima kojima se ograničenjem poticajnih hormona usporio metabolizam i time produžio životni vijek (24).

1.2.2. Psihološko starenje

Psihološko starenje definira se izmijenjenom mogućnosti prilagodbe pojedinca promjenama u životnoj okolini. Najčešće praćene promjene u psihologiji starih odnose se na pamćenje i inteligenciju. Starije osobe često se tuže na poteškoće u pamćenju, slabo pamćenje novih sadržaja, zaboravljanje podataka ili gubljenje predmeta (25)

1.2.3. Socijalno starenje

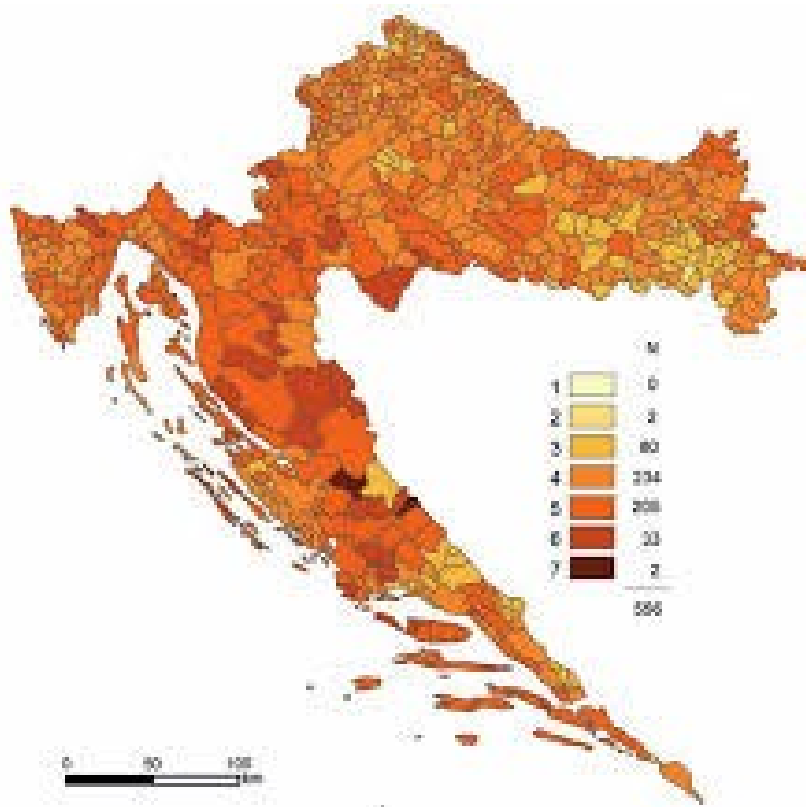
Socijalno starenje nastaje kao posljedica promjene socijalne uloge osobe u društvu prvenstveno zbog uznapredovale kronološke dobi, ali i biološkog te psihološkog starenja. Postojećim zakonima za većinu osoba u našoj zemlji socijalno starenje nastupa iznad 65. godine života kad se iz radno aktivne faze prelazi u umirovljeničko razdoblje. Za te osobe problem socijalne starosti najčešće dovodi i do društvene i profesionalne marginalizacije, osamljenosti i smanjenja sredstava za život (3).

1.3. Demografsko starenje

Prema opće prihvaćenim demografskim kriterijima odnosno klasifikaciji Ujedinjenih naroda, kao početak starije dobi uzima se dobna granica od 65 godina. Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije starost dijelimo na raniju (65 do 74 godine), srednju (75 – 84 godine) i duboku starost (85 i više godina) (26). Udio starijih ljudi u pučanstvu Republike Hrvatske progresivno raste te se Hrvatska svrstava prema klasifikaciji UN-a u četvrtu skupinu europskih država s vrlo starom populacijom. Prema popisu stanovništva iz 2011. godine u Hrvatskoj živi 17,7% ljudi starijih od 65 godina. Valja napomenuti da je 2001. godine taj udio bio 15,62% (slika 3). Zabrinjavajuća je i činjenica da je udio novorođenih manji za 3,7 % od udjela starije populacije (27,28).

Populacijska slika Hrvatske odraz je demografskih kretanja i društvenih zbivanja kroz posljednjih 50 godina. Agresija na Hrvatsku početkom devedesetih godina i rat na našem teritoriju imali su neminovan negativni utjecaj na smanjenje opće populacije, smanjenje fertiliteta, prirodnu depopulaciju i emigracijsku depopulaciju (Slika 3). Udio starijeg pučanstva povećava se i zbog boljih uvjeta i kvalitete života. Ljudi starije životne dobi predstavljaju specifičnu, osjetljivu i ranjivu skupinu pučanstva čiji se udio progresivno povećava, što bitno utječe na zdravstvenu, ekonomsku, socijalnu, obrazovnu i gospodarsku strukturu cjelokupnog pučanstva. Dožive li 65 godina, Hrvati mogu računati da će najdulje pet godina živjeti relativno zdravi, dok će sve godine iznad 70. biti obilježene ozbiljnim zdravstvenim teškoćama i ograničenjima koja te teškoće donose (28).

Iako se očekivani životni vijek čovjeka značajno povećao u posljednjih dvadeset godina, očekivano trajanje zdravog života nije se povećavalo istom stopom. U Europi žene provedu prosječno 25,4%, a muškarci 20,5% života onesposobljeni zbog bolesti ili ozljeda (29). Premda je starija životna dob glavni čimbenik rizika za onemoćalost, doživljavanje duboke starosti ne mora nužno dovesti do onesposobljenosti i/ili invaliditeta (30).



Slika 3. Tipizacija stupnja ostarjelosti stanovništva hrvatskih općina/gradova.

1 – na pragu starenja, 2 – starenje, 3 – starost, 4 – duboka starost, 5 – vrlo duboka starost, 6 – izrazito duboka starost, 7 – krajnje duboka starost, N – broj općina (27)

1.4. Domovi za starije i nemoćne osobe

Domovi za starije i nemoćne osobe nezamjenjive su ustanove za zbrinjavanje starijih osoba koje više nisu u mogućnosti brinuti se o najosnovnijim životnim potrebama, a nemaju adekvatnu pomoć svojih srodnika. Također je potrebno istaći da svaka peta osoba starija od 65 godina u našoj zemlji živi sama. Osim starenja stanovništva, sve manji broj djece u obitelji, porast broja razvoda i samačkih kućanstava, kao i veće uključenosti žena na tržištu rada dodatni su čimbenici koji povećavaju potrebu za dugotrajnim smještajem u domovima socijalne skrbi za starije i nemoćne osobe. Domovi su mjesta koja osobi sa znatno smanjenim fizičkim i ostalim mogućnostima osiguravaju život dostojan čovjeka. U domovima za starije i nemoćne kvaliteta skrbi ima dvije dimenzije: kvalitetu života i određene životne navike, kao i

cjelovitu zdravstvenu zaštitu. Institucijski smještaj starijih osoba osobito u novije vrijeme obuhvaća istovremeno komponentu socijalne skrbi i zdravstvene zaštite. U cijelosti osiguranje kvalitete života osoba starije životne dobi temelji se na ispravno odabranim indikatorima socijalne skrbi i zdravstvene zaštite. Cijeli taj proces je veoma složen i pruža se kroz multidisciplinarni pristup, imajući u vidu specifičnost i vulnerabilnost te populacije, osobito u odnosu na funkcionalnu sposobnost i zdravstveno stanje starije osobe. U Hrvatskoj postoji oko 150 domova za starije i nemoćne, a većina ih je u privatnom vlasništvu (31). Procjenjuje se i da je manje od 3 posto stanovnika naše zemlje (prema podacima iz 2015. godine oko 16000) od ukupnog broja funkcionalno ovisnih osoba, među kojima ima najviše onih starijih od 65 godina, zbrinuto izvan obitelji u organiziranim oblicima institucionalne skrbi kao što su domovi (državni i privatni) i izvaninstitucionalne skrbi u obiteljskim domovima i udomiteljskim obiteljima. Glavni prigovor smještaju izvan obitelji koji je zastupljen u javnosti je što se stariju osobu izdvaja iz njene fizičke i socijalne sredine, te se tako izlaže pojačanom stresu i nezadovoljstvu životom. Promjena boravišta uzrokuje neugodnosti u bilo kojoj životnoj dobi, ali je posebno teška u starosti. U domovima za starije i nemoćne u našoj zemlji prvenstveno su smještene teško bolesne starije osobe, vezane za krevet i/ili s potrebom za uzimanje lijekova nužnih za preživljenje.

Zdravstvena zaštita starijih osoba u Hrvatskoj, u institucijskoj i izvaninstitucijskoj zdravstvenoj skrbi djeluje unutar jedinstvenog zdravstvenog sustava. Trajnu zdravstvenu skrb korisnicima specifične primarne zdravstvene zaštite u domu za starije pruža multidisciplinarni zdravstveni gerontološki tim u sastavu: liječnik specijalist opće/obiteljske medicine, prvostupnica sestrinstva dopunski educirana iz gerijatrijske zdravstvene njege, medicinske sestre, fizioterapeuti i pomoćni zdravstveni djelatnici. Pristup zaštiti starijih ljudi u domovima treba biti cjelovit i osigurati unapređenje svih oblika zdravstvene skrbi: od prevencije, dijagnostike, liječenja do rehabilitacije kao i fizičke, psihičke i socijalne evaluacije funkcionalno onesposobljenih starijih osoba (32). Također se smatra da je zaštita zdravlja starijih osoba glavni pokazatelj napretka, ali i propusta u zaštiti zdravlja cjelokupnog pučanstva (33).

Domovi za starije i nemoćne su pogodno mjesto za širenje infekcija jer starije osobe žive blizu jedan drugome, mnogi imaju komorbiditete, a neki i sklonost dekubitusima te trajno korištenje medicinskih pomagala poput urinarnih katetera.

1.5. Ljestvice za procjenu krhkosti u starijih osoba

Krhkost (engl. *frailty*) definira se kao kliničko stanje povišene osjetljivosti osobe na unutarnje i vanjske stresore koje nosi povišeni rizik razvoja za zdravlje nepovoljnih zbivanja. Buchner je prvi 1992. godine predložio definiciju krhkosti kao sindroma slabosti, smanjene pokretljivosti, ravnoteže i minimalne zalihe (34). Krhkost korelira s porastom dobi, ali nije neizbježna posljedica starenja. Krhkost je prisutna kod približno 10 % starijih od 65 godina. Veća je u žena nego u muškaraca, a više prevladava kod ljudi s nižim obrazovanjem i prihodima, s lošijim zdravstvenim stanjem, kroničnim bolestima i invalidnosti. Prevalencija krhkosti pojavljuje se u svijetu u rasponu od 14 do 43% (35). Najčešće korištene ljestvice krhkosti za starije osobe prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Ljestvice krhkosti koje se koriste za starije osobe.

Ljestvica krhkosti (literatura)	Mjerene varijable	Osobitosti ljestvice
Kriteriji fenotipske krhkosti po Fried-u (36)	gubitak tjelesne mase, iscrpljenost, smanjena tjelesna aktivnost, mišićna slabost procijenjena stiskom šaka, promjena brzine kretanja testom hoda	Prediktivna za snižene ishode zdravlja za različite bolesti i postupke
Ljestvica obilježja krhkosti (37)	uhranjenost, fizička aktivnost, procjena neurološkog sustava testom ravnoteže	Analizirana na populaciji grada Toledo

Instrument za krhkost SHARE (38)	iscrpljenost, gubitak apetita, mišićna slabost procijenjena stiskom šaka, ocjena poteškoće u hodu, snižena fizička aktivnost	Probir na krhkost u primarnoj zdravstvenoj zaštiti
Indeks krhkosti po Rockwood-u (39)	35 varijabli koje se odnose na vrstu kroničnih bolesti, nemogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti, koncentraciji vitamina D, prehrani, poremećaju vida i sluha	
Ljestvica krhkosti FRAIL (40)	samoprocjena pet varijabli: umor, otpornost, pokretljivost, bolest, gubitak tjelesne mase	Nema egzaktnog mjerenja varijabilni
Probirni test za krhkost Gérontopôle (41)	Šest varijabli koje procijenjuju socijalnu, fizičku, funkcijsku i kognitivnu sposobnost starijih osoba	Namijenjen liječnicima u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Nema jasno postavlenu granicu da li je osoba krhka ili nije
Modificirana ljestvica krhkosti Rockwood (42)	Klinički opisi s fotografijama kojima se određuje sedam razina krhkosti	Omogućava predikciju mortaliteta i potrebe za smještaj u zdravstvenu instituciju/dom za starije i nemoćne

U našem istraživanju koristili smo modificiranu ljestvicu krhkosti Rockwood budući je ona validirana za primjenu u starijih osoba smještenih u domovima za starije i nemoćne osobe (42) (Slika 4).

CSHA ljestvica kliničke krhkosti

	1 Odličnog općeg stanja – aktivan, energičan, dobro motiviran i dobrog fizičkog stanja; ova skupina ljudi redovito vježba, te su najbolje fizičke spremne svoje dobne skupine
	2 Dobrog općeg stanja – bez aktivne bolesti, ali slabije fizičke spremne nego osobe iz grupe 1
	3 Dobrog općeg stanja uz liječene komorbiditete – simptomi bolesti su dobro kontrolirani u usporedbi s osobama iz skupine 4
	4 Ranjive osobe – iako ne potpuno ovisne o tuđoj pomoći, ove osobe se žale na „usporenost“ ili imaju simptome bolesti
	5 Blago slabe osobe – s ograničenom ovisnosti o drugima u obavljaju svakodnevnih aktivnosti
	6 Umjereno slabe osobe – pomoć im je potrebna u obavljaju svakodnevnih i životno nužnih aktivnosti
	7 Jako slabe osobe – potpuno ovisne o drugima za obavljanje svakodnevnih aktivnosti
	8 Terminalno bolesne osobe

Note: 1. Canadian Study on Health and Aging
2. K. Rockwood et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. CMAJ 2005; 173:489-495.

**Slika 4. CSHA ljestvica kliničke krhkosti (prevedno s engleskog jezika).
Autor odobrio korištenje za potrebe doktorske disertacije.**

1.5. Virusne respiracijske infekcije u starijih osoba

Infekcije dišnih puteva najučestalije su infekcije suvremenog čovjeka. Razlog tome je što je dišni sustav najotvoreniji organski sustav i u neprestano je vezi s okolinom. Poznato je više od 200 različitih mikroorganizama koji uzrokuju respiracijske infekcije, a od njih su najčešći virusi (u oko 60%) za koje ne postoje učinkoviti specifični lijekovi. Bolest se javlja češće u hladnijem razdoblju godine, a broj „prehlada“ tijekom godine se kod najvećeg broja ljudi kreće od jedne do šest, s tim da najčešće obole djeca uzrasta do pet godina i starije osobe. Razlog tome što je tijekom hladnijeg vremena ljudi duže borave u zatvorenim, slabo provjetravanim prostorima pa su više izloženi kapljicama i virusima drugih osoba. Kliničke manifestacije respiracijskih virusnih infekcija u ljudi su akutni nazofaringitis, akutni sinusitis, akutni faringitis, akutni laringitis i traheitis, akutni obstruktivni laringitis i epiglotitis, akutni laringotraheitis, akutni bronhitis, akutni bronhiolitis i pneumonije. Tegobe traju najčešće od dva do sedam dana.

Virusne respiracijske infekcije osobito mogu biti opasne za osobe starije životne dobi zbog njihove krhkosti i niza kroničnih bolesti povezanih s ovom dobnom skupinom. Starije osobe također su pod povišenim rizikom za nepotrebnu i neučinkovitu uporabu antibiotika za liječenje virusnih respiratornih infekcija. Poznati su brojni rizici koje imaju starije osobe za nastanak i komplikacije virusnih respiracijskih infekcija. Ljudski se organizam mijenja i slabi tijekom godina pa tako i dišni sustav i plućno tkivo. Slabljenje i pogoršanje plućne funkcija počinje u ranoj odrasloj dobi i nastavlja tijekom života. Kako starenjem slabi i pokretljivost trepetiljka na epitelnim stanicama dišnih puteva, smanjuje se refleks kašlja, a sama pluća postaju manje elastična. U osoba starije životne dobi, zbog imunosenescencije i prisutnosti brojnih drugih kroničnih bolesti, postoji i veća opasnost od razvoja komplikacija uzrokovanih sekundarnom bakterijskom infekcijom, ponekad čak i sa smrtnim ishodom. Iz tog razloga posebnu pažnju treba obratiti u slučaju kada se nakon 4 do 6 dana trajanja simptoma prehlade naknadno javi povišena tjelesna temperatura i pogorša opće zdravstveno stanje oboljele starije osobe (43).

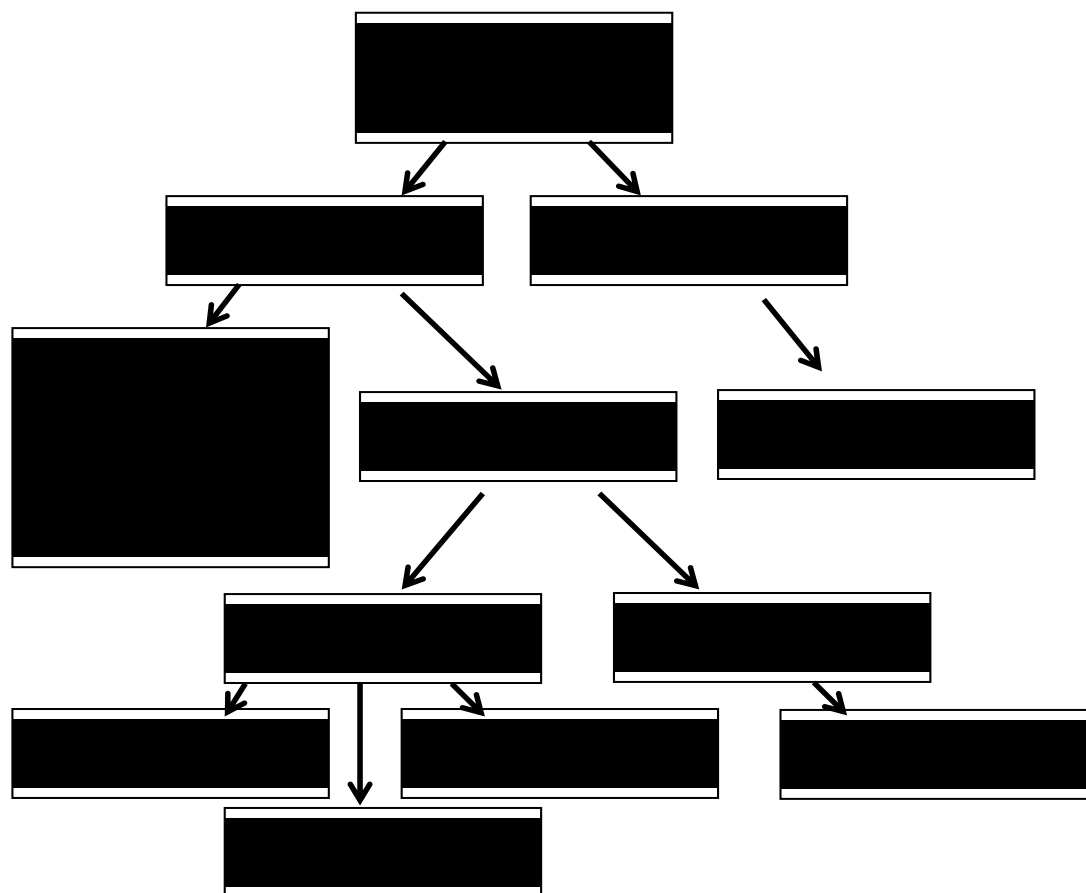
Respiracijske virusne infekcije u starijih osoba najčešće su uzrokovane virusom influence, respiracijskim sincicijskim virusom (RSV), no i ostali virusi (npr. parainfluence, humani metapneumovirus i rinovirusi) povezuju se s infekcijom-ovisnim morbiditetom i mortalitetom. Potrebno je za istaći da se virusna respiracijska infekcija u starijih osoba može prezentirati i atipičnim simptomima (npr. poremećaj svijesti, anorekcija, sklonost padovima, uz izostanak vrućice i drugih tegoba koje u pravilu viidmo kod mlađih osoba (npr. mijalgije, bolovi u grlu, kongestija i sekrecija iz nosa, kašalj, sipnja) (44).

Rizik za razvoj virusnih respiracijskih infekcija u osoba smještenih u domovima za starije i nemoćne istraživani je za gripu i infekciju RSV-om. Raspon incidencije je veliki i iznosi od 5,9 do 85,2% za gripu, dok je za infekciju RSV-om manji (1,1 - 13.5%) (45). Pravovremeno prepoznavanje virusnih infekcija u starijih osoba ima brojne prednosti jer se time smanjuje uporaba nepotrebnih antibiotika i racionalno provode mjere izolacije (46).

S obzirom na ograničene mogućnosti liječenja kao i posljedice najčešćih virusnih infekcija u starijih osoba, rano prepoznavanje infekcija kao i provođenje cijepljenja prije sezone gripe koje je u našoj zemlji besplatno za starije osobe ključne su mjere za sprečavanje morbiditeta i mortaliteta (47,48).

1.6. Vrste, prednosti i mane metoda za detekciju respiracijskih virusa u starijih osoba

Iako su u većine ljudi respiracijske virusne infekcije blažeg tijeka i prolaze samo uz simptomatsku terapiju, dokaz uzročnika važan je za bolesnike koje ubrajamo u rizične skupine, među kojima se posebno ističu osobe starije životne dobi. Slika 5 prikazuje metode koje se koriste u virološkoj dijagnostici respiracijskih infekcija (49).



Slika 5. Metode koje se koriste u dijagnostici virusnih respiracijskih infekcija (49).

Metode neizravne dijagnostike (serološke metode) u pravilu nisu prikladne za dijagnostiku respiratornih virusnih infekcija u svakodnevnoj kliničkoj praksi budući da najčešće zahtijevaju uzimanje tzv. parnih seruma (u akutnoj i konvalescentnoj fazi bolesti) te se najčešće koriste u epidemiološke svrhe ili u retrospektivnim istraživanjima.

U metode izravne (direktne) dijagnostike ubrajaju se izolacija (kultivacija) virusa te metode detekcije, bilo virusnih antigena ili nukleinske kiseline u uzorcima uzetim iz dišnog sustava, iz kliničkog materijala. Najčešće su to obrisak ili aspirat nazofarinksa, ali se koriste i obrisak ždrijela, ispirak nosa i BAL. Uzorke je potrebno uzeti u prvih nekoliko dana bolesti kada se očekuje maksimalna količina virusa na mjestu uzimanja uzorka, promptno slanje u laboratorij te pohranjivanje uzorka na temperaturi 4 °C do 48 sati za metode detekcije i/ili izolacije virusa.

Izolacija, odnosno uzgoj virusa provodi se najčešće na staničnim kulturama. Značajna je za otkrivanje novih virusa, kao što je to npr. SARS-CoV-2. Uzgoj virusa tehnički je, međutim, zahtjevna, skupa te prespora (traje 5-21 dan) metoda za kliničare koji moraju pravovremeno donijeti odluku o liječenju. Osim toga za neke viruse ovo je i neprimjenjiva metoda jer još uvijek nisu nađene podesne stanične linije u kojima se mogu umnožiti.

Metode detekcije virusa predstavljaju tzv. brzu virološku dijagnostiku i danas se najčešće koriste u dijagnostici virusnih infekcija dišnog sustava.

Razlikuju se metode detekcije virusnih antigena te metode molekularne dijagnostike. Za detekciju antigena koriste se imunokromatografski, imunoenzimski i imunofluorescentni testovi. Imunokromatografski testovi su vrlo brze metode, jednostavne za izvođenje. Ti se testovi mogu koristiti kao tzv. *point-of-care* (POC) testovi koji traju do najviše 45 minuta, no u pravilu omogućuju detekciju samo jednog respiracijskog virusa (50). Njihov nedostatak je relativno niska osjetljivost i specifičnost u usporedbi s drugim metodama brze dijagnostike.

Detekcija antigena imunofluorescentnom metodom podrazumijeva dokaz antigena virusa u epitelnim stanicama dišnog sustava pomoću monoklonskih protutijela obilježenih fluoresceinom. Ovom metodom moguće je detektirati viruse influence A i B, parainfluence 1, 2 i 3, RSV-a, metapneumovirusa, adenovirusa. Metoda je relativno osjetljiva i specifična (ovisno i o uzročniku, npr. visoko osjetljiva za RSV), brza je (2-4 sata) te omogućava procjenu kvalitete uzorka.

Glavni nedostatak ove metode je potreba za postojanjem odgovarajuće opreme kao i laboratorijskih djelatnika adekvatno educiranih za izvođenje testa.

Detekcija virusnog antigena provodi se i automatiziranim imunofluorescentnim testom gdje aparat mjeri fluorescentni signal specifičnih imunokompleksa vezanih na polistirenske čestice. Test omogućava detekciju više virusa u istom uzorku. Metoda je brza (20 min – 2 sata), jednostavna za izvođenje, primjenjiva kao POC test, bolje

osjetljiva i specifična u odnosu na druge metode detekcije antigena. Osnovni nedostatak ove metode je visoka cijena.

Molekularne metode u posljednje vrijeme postaju najznačajniji način dokazivanja virusa uzročnika infekcija dišnog sustava. Danas su komercijalno dostupni testovi koji omogućuju detekciju više od 15 respiracijskih virusa istovremeno (engl. *multiplex*). *Multiplex*-testovi istražuju se i u našoj zemlji no još nisu u rutinskoj primjeni (51). Glavna prednost *multiplex* molekularnih metoda jest da negativan nalaz omogućava s većom sigurnosti isključenje virusne etiologije respiracijskih tegoba. Glavni nedostaci su im cijena potrebne opreme kao i potreba za edukacijom laboratorijskog osoblja. Poznato je da se *multiplex*-metodama može dokazati istovremeno prisustvo više virusa. U tim slučajevima određivanje broja kopija virusne DNA/RNA PCR-om u realnom vremenu mogla odrediti koncentracija nukleinskih kiselina virusa i tako ustvrditi koji od detektiranih virusa je odgovoran za bolest ili se uistinu radi o koinfekciji. Također neke viruse je moguće detektirati i u asimptomatskih osoba (npr. rinovirus, koronavirus), dok je to rjeđe za virus gripe i humani metapneumovirus. Također, količina virusnih nukleinskih kiselina u pravilu je veća u osoba s pneumonijom.

Neovisno o velikom napretku u razvoju dijagnostičkih testova za respiracijske viruse, poznato je da u starijih osoba nisu svi dostupni testovi podjednako osjetljivi. Tablica 2 sažeto prikazuje ishode uspješnosti testiranja različitih respiracijskih virusa u starijih osoba (46).

Tablica 2. Primjenjivost različitih testova za detekciju respiracijskih virusa u starijih osoba (46).

virus	kultura	Brzi EIA	DFA/IFA	PCR	serološki test
Influenca tip A	++	+	+	+++	++ ^a
Influenca tip B	++	+	+	+++	++ ^a
RSV	+	+/-	+/-	+++	+++
hMPV	+/-	0	+/-	+++	+++
Virus parainfluenze	+	0	+/-	+++	+++
Koronavirus	0	0	0	+++	+++
Adenovirus	+	0	+/-	+++	+ ^b
Rinovirusi	+	0	0	+++	0 ^c

DFA= direktno fluorescentno antitijelo; EIA= engl. *enzyme immunoassay* (enzimski imunoesej); hMPV= humani metapneumovirus; IFA= imunofluorescentno antitijelo; PCR= engl. *polymerase chain reaction*; RSV= respiracijski sincicijski virus; =, nije poznato; +/-= dostupan no slaba osjetljivost; += slaba osjetljivost; **= dobra osjetljivost; +++= optimalna osjetljivost.

^ainterpretaciju može otežati procijepljenost

^bdostupno za neke serotipove virusa

^cnije dostupno zbog velikog broja serotipova

U svakodnevnom kliničkom okruženju, a posebno u sredinama kao što su domovi za starije i nemoćne osobe, testovi za detekciju respiracijskih virusa mogu biti od velike koristi kako bi se poduzele pravilne mjere liječenja i po potrebi izolacija inficiranih osoba. Kao jedan od mogućih suvremenih, automatiziranih i brzih *point-of-care* testova mogu se koristiti njegove antigenske (testom imunofluorescencije) ili molekularne inačice. U našem istraživanju koristili smo komercijalno dostupan test za određivanje osam respiracijskih virusa (52,53). Iako je njihova osjetljivost detaljnije ispitana za sada samo u djece, brzo dobivanje rezultata (za 20 minuta) i niža cijena od one koju imaju metode molekularne biologije, čine te testove osobito interesantnim za svakodnevnu primjenu.

1.7. Cijepljenje protiv gripe u starijih osoba

Podatci iz literature pokazuju da samo 30-50% starijih osoba, u odnosu na 65-80% mlađih osoba, cijepljenjem je zaštićeno od pojave gripe, što je posljedica smanjene sposobnosti starijih osoba da produciraju specifična protutijela. Naime, analize su pokazale da se zaštitna visina titra protutijela nakon cijepljenja protiv influence može naći u svega 40-60% starijih osoba, dok je u mlađih osoba taj postotak znatno veći i iznosi 70-90% (54,55). Međutim, do razvoja influence u starijih osoba može doći i pri vrlo visokim vrijednostima titra protutijela, što se objašnjava slabijim afinitetom protutijela za površinske antigene virusa influence pa njeni autori zato smatraju da bi bolji uvid u korelate zaštitnosti cjepiva protiv gripe dali testovi stanične imunosti (npr. detekcija CD8+ citotoksičkih T-limfocita) no oni se ne primjenjuju u rutinskoj kliničkoj praksi (56).

1.8. Uloga vitamina D u zdravlju i bolesti

Vitamin D označava skupinu u mastima topljivih spojeva čija je uloga u zdravlju kostiju i homeostazi kalcija i fosfata neosporna. Glavnina tih spojeva u ljudskom organizmu potječe iz endogene sinteze u dermisu utjecajem ultraljubičastog zračenja (oko 90%) budući da mali broj namirnica prirodno sadržava vitamin D. Dva najvažnija spoja u ljudi su vitamin D3 ili kolekalciferol koji nastaje u koži i vitamin D2 ili ergokalciferol koji se nalazi u hrani. Neovisno o njegovom izvoru, vitamin D biološki je aktivan tek nakon hidroksilacije u jetri i bubrezima (57).

Ukupne zalihe vitamina D procjenjuju se mjerenjem razine cirkulirajućeg 25(OH)D čiji je poluživot u plazmi oko dva tjedna. Za zdravlje kostiju koncentracija 25(OH)D od 50 nmol/L najniža je koncentracija vitamina D koja sprječava sekundarni hiperparatiroidizam, povećanu razgradnju kostiju, smanjenje mineralizacije kostiju i/ili sezonske varijacije paratiroidnog hormona u serumu. Koncentracije manje od 25 nmol/L smatraju se deficijencijom, a one između 50 i 75 nmol/L (20 do 30 ng/ml) smatraju se insuficijencijom vitamina D (58). Rizični čimbenici koji se povezuju s nedostatkom vitamina D su starija životna dob, ženski spol, stanovanje na višoj

nadmorskoj visini, tamnija koža, manja izloženost suncu, prehrambene navike i izostanak redovite suplementacije vitaminom D (59). Budući da koncentracija 25(OH)D ovisi ponajprije o stvaranju u koži, u zemljama poput Hrvatske realno je očekivati da su te koncentracije najniže tijekom zimskih mjeseci što je i potvrđeno u istraživanju Laktašević Žerjavić i suradnika u žena u postmenopauzi (60).

Otkriće da gen za receptor vitamina D imaju stanice crijeva, pankreasa, gonada, središnjeg živčanog i imunološkog sustava kao i opažanje da je oko 3% ljudskog genoma pod kontrolom tog vitamina, potaknula su istraživanja i izvanskeletnih učinaka vitamina D i to osobito na učestalost infekcija, bolesti kardiovaskularnog sustava i incidenciju autoimunskih i malignih bolesti (61,62). Rezultati istraživanja pokazali su i da je razina i funkcija vitamina D pod genetskim utjecajem. Iako je varijabilnost genskog učinka velika (od 23 – 80%) među važnijim genima koji određuju razinu 25(OH)D su geni DBP, CYP2R1 i DHCR7, dok polimorfizam gena za receptor vitamin D se povezuje s ishodom bolesti od kojih su najviše istražene infekcije i autoimunosne bolesti (63).

Vitamin D, prvenstveno njegov aktivni metabolit 1,25-dihidroksikolekalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), važan je imunomodulator s brojnim djelovanjima na reakcije prirodne i stečene imunosti (64). Tako $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ povisuje lučenje antimikrobnog peptida katelicidina u monocitima i makrofazima kao i keratinocitima, crijevnim epitelnim stanicama, trofoblastu placente i epitelnim stanicama pluća što se povezuje s učinkovitom obranom od infekcija Gram pozitivnim i negativnim bakterijama. Za razliku od imunoreakcija prirodne imunosti u kojima prvenstveno djeluje stimulirajuće, učinak $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na reakcije stečene imunosti je inhibicijski budući smanjuje prepisivanje gena za IL-2 u Th1-limfocitima, povećava prepisivanje gena za Foxp3 u regulacijskim T-limfocitima te smanjuje prepisivanje gena za IL-17 u Th17-stanicama (65).

Osobe starije od 65 godina života smatraju se posebno rizičnim za razvoj posljedica nedostatka vitamina D (66). Taj rizik povezuje se sa smanjenom mogućnošću stvaranja vitamina D u koži nakon izlaganja suncu, smanjenom hidroksilacijom 25-hidroksivitamina D u bubregu i smanjenjem broja receptora za vitamin D. Osobito rizična skupina za deficijenciju vitamin D3 su osobe smještene u institucijama kao što su domovi za skrb starijih i nemoćnih osoba (67,68). Razvijene

zemlje prepoznale su potrebu za razvojem preporuka za suplementaciju vitaminom D u starijih osoba u svrhu poboljšanja zdravlja kosti (69). Temeljem tih iskustava i posljednje hrvatske smjernice za prehranu osoba starije dobi naglašavaju tu potrebu i daju preporuku za uzimanje 700-800 IU dnevno (70).

Moguća povezanost nedostatka vitamina D s povišenim rizikom za virusne respiracijske infekcije kao i njen lošiji ishod do sada su se istraživale ponajviše u male djece i odraslih osoba uključujući i starije osobe koje ne žive u domovima za starije i nemoćne osobe (71-75).

Iako su opservacijske studije pokazale moguću povezanost statusa vitamin D i akutnih respiracijskih infekcija u općoj populaciji, rezultati randomiziranih kliničkih studija o mogućoj koristi suplementacijom vitamina D su neujednačeni (76-79). Te razlike obrazlažu se raznolikošću dobi i zdravstvenog stanja ispitanika, početnom serumskom koncentracijom vitamina D i načinom suplementacije vitaminom D (npr. svaki dan ili povremeno).

2. HIPOTEZA

Suplementacija vitaminom D u starijih osoba smještenih u domovima za starije i nemoćne osobe snižava rizik od respiracijskih virusnih infekcija.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Glavni cilj istraživanja bio je provesti suplementaciju vitaminom D u dozi 800 IU p.o. osobama ≥ 65 godina starosti smještenih u domovima za starije i nemoćne osobe tijekom tri mjeseca i ispitati incidenciju, vrstu i kliničku prezentaciju virusnih respiracijskih infekcija u periodu od studenog do travnja.

3.2. Specifični ciljevi

1. Utvrditi da li osobe ≥ 65 godina starosti smještene u domovima za starije i nemoćne osobe imaju niže koncentracije 25(OH)D u serumu prije početka davanja vitamina D
2. Odrediti prisutnost virusnih antigena (ukupno 8 različitih respiracijskih virusa) u nazofaringealnom obrisku osoba sa simptomima respiratorne infekcije koji traju manje od 5 dana
3. Odrediti povezanost indeksa fragilnosti i incidencije, kliničke prezentacije te uzročnika virusnih respiracijskih infekcija
4. Ispitati povezanost koncentracije anti-CMV IgG u serumu ispitanika kao biljega imunosenescencije s rizikom nastanka virusnih respiracijskih infekcija tijekom perioda suplementacije vitaminom D.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

U istraživanje je ukupno bilo uključeno 116 ispitanika u dobi od 65-98 godina koji su bili smješteni u Domovima za starije i nemoćne osobe Godan u razdoblju od studenog 2016. godine do svibnja 2017. godine. Suglasnost za istraživanje dobivena je od Etičkog povjerenstva Doma za starije i nemoćne osobe Godan i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je započelo u listopadu 2016. godine, a prikupljanje uzoraka dovršeno je u kolovozu 2017. godine.

Svi ispitanici ili njihovi zakonski skrbnici potpisali su pismenu suglasnost za sudjelovanje u istraživanju. Kriteriji za uključivanje u studiju bili su: dob starija od 65 godina, pretpostavljeno trajanje smještaja u Domu tijekom trajanja istraživanja kroz 12 mjeseci, zbroj bodova prema skali kliničke fragilnosti 5-7, smanjena koncentracija vitamina D u serumu, provedeno cijepljenje protiv sezonske gripe neposredno prije uključivanja u studiju i isključena maligna bolest.

U studiju nisu bili uključeni ispitanici koji nisu cijepljeni protiv gripe za sezonu u kojoj se vršilo ispitivanje, koji boluju od malignih bolesti, koji dobivaju imunosupresivne lijekove (glukokortikoide p.o. ili parenteralno; biološku terapiju te druge imunosupresivne lijekove), kao i osobe na dijalizi zbog kronične bubrežne insuficijencije te štićenici s normalnom razinom serumskog vitamina D. Od 116 osoba smještenih u Domovima njih 97 zadovoljilo je kriterije za uključivanje u istraživanje.

Za svakog ispitanika, osim dobi i spola, zabilježeni su slijedeći parametri: komorbiditeti (kronična opstruktivna plućna bolest, koronarna bolest, šećerna bolest tip II, srčano zatajenje, moždani udar, demencija), broj lijekova koji uzimaju zbog kroničnih tegoba i zbroj bodova prema ljestvici kliničke fragilnosti (engl. Clinical Frailty Scale) na skali od 1 do 7. Ta skala validirana je za osobe smještene u domovima za starije i nemoćne osobe (42).

Uključenih 97 ispitanika podijeljeno je u dvije skupine, ispitivanu i kontrolnu, nakon randomizacije. Za randomizaciju smo koristili javno dostupan program (www.randomizer.org) (Urbaniak, G. C., & Plous, S. (2013). Research Randomizer

(Version 4.0) [Computer software]. Retrieved on June 22, 2013, from <http://www.randomizer.org/>).

4.1.1. Uzorci krvi za analizu

Svakom ispitaniku uzeti su uzorci periferne venske krvi s antikoagulansom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA, od engl. ethylenediaminetetraacetic acid) (5 mL) i bez antikoagulansa (2 mL) na početku istraživanja, te ponovo samo uzorak periferne venske krvi s antikoagulansom EDTA (5 mL) tri mjeseca od početka istraživanja.

U uzorcima periferne venske krvi s antikoagulansom određena je koncentracija vitamina D, a u uzorcima bez antikoagulansa iz kojih je izdvojen serum odredili smo koncentraciju antitijela protiv citomegalovirusa (CMV) razreda IgG.

U šest ispitanika nije učinjeno drugo uzimanje krvi za određivanje koncentracije 25(OH) D iz slijedećih razloga: dvoje ispitanika otišlo je iz doma, a u četiri je došlo do smrtnog ishoda i to u dvoje zbog komplikacija neinfekcijskih kroničnih bolesti, a u preostalih dvoje zbog komplikacija gripe.

4.1.2. Suplementacija vitaminom D

Ispitanici koji su bili randomizirani kao ispitivana skupina dobivali su od strane medicinskog osoblja 800 IU vitamina D u obliku kapi u jutarnjim satima (dvije kapi pripravka vitamina D s malo vode na čajnoj žlici). Kontrolna skupina nije dobivala suplementaciju vitaminom D.

4.1.3. Uzorci od bolesnika sa simptomima respiracijskih infekcija

U ispitanika sa simptomima respiracijskih infekcija do petog dana od pojave simptoma uzeti su nazofaringealni obrisци u svrhu detekcije virusnih antigena i uzorci

krvi za rutinsku laboratorijsku obradu (CRP, KKS, IgG, IgA, IgM, ukupni proteini u serumu, kreatinin, AST, ALT, gamaGT, urin biokemijski). Rutinski laboratorijski testovi radili su se u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti, Rockefellerova 3, Zagreb. U ispitanika su praćeni klinički pokazatelji infekcije, frekvencija disanja u minuti i saturacija O₂ perkutanom oksimetrijom, te se na osnovu kliničke slike i pristiglih laboratorijskih nalaza, nalaza u statusu i saturacije O₂ u oboljelih postavila dijagnoza infekcije gornjih ili donjih dišnih putova od strane liječnika.

4.2. Metode rada

4.2.1. Određivanje vitamina D u serumu

Određivanje koncentracije vitamina D u serumu učinjeno je komercijalno dostupnim testom LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL (DiaSorin Inc., Stillwater, SAD) tehnikom kemiluminiscentnog imunoeseja koji se koristi za kvantitativno određivanje ukupnog 25 OH vitamina D u serumu. Tijekom perioda prve inkubacije uzorka seruma, 25 OH vitamin D se odvaja od proteinskog plazminog nosača, a potom veže na specifično antitijelo. Nakon druge inkubacije i ispiranja, u otopinu se dodaje starter čime počinje kemiluminiscantna reakcija. Potom se mjeri svjetlosni signal (engl. *relative light unit*, RLU) koji je proporcionalan koncentraciji vitamina D u kalibratoru, kontroli i uzorku. Prema specifikaciji proizvođača, raspon koncentracije vitamina D koji mjeri taj test je od 4–150 ng/mL s preciznošću od 7%.

Na osnovu slijedećih koncentracija 25(OH)D u serum odredili smo da li bolesnik ima i koji stupanj manjka vitamin D:

- Vrlo teški nedostatak: <12,5 nmol/L
- Teški nedostatak: 12,5–24 nmol/L
- Umjereni nedostatak: 25–49 nmol/L
- Blagi nedostatak: 50–74 nmol/L
- Normalna koncentracija: 75–175 nmol/L (58).

4.2.3. Određivanje antitijela protiv citomegalovirusa (CMV) razreda IgG

Antitijela na CMV IgM i IgG određena su u uzorcima seruma svih ispitanika na početku istraživanja pomoću komercijalno dostupnog enzimskog imunosorbent testa (ELISA, od engl. enzyme immunosorbent test) (ETI-Cytok M/ETI-Cytok G; DiaSorin, Saluggia, Italija) prema uputi proizvođača i izražena u proizvoljnim jedinicama (AU/ml).

4.2.4. Detekcija virusnih antigena testom

Za dokazivanje respiracijskih virusa u nazofaringealnom obrisku korišten je komercijalno dostupan brzi antigenski test mariPOC® Respi test za detekciju osam respiracijskih virusa (influenca A i B, respiracijski sincicijski virus A i B, virusi parainfluence 1-3, humani metapneumovirus, adenovirus) (ArcDia International Ltd.). Tehnika izrade je temeljena na fluorescentnoj detekciji dvofotonske emisije imunokompleksa – antitijela i antigena (engl. *sandwich immunoassay*) koji se potom detektiraju pomoću lasera u za to razvijenom analizatoru. Nakon uzimanja brisa nazofarinksa, odreže se vršak brisa i uroni u za to posebno pripremljen pufer, promiješa kroz 20-30 sekundi na mješalici, i stavi u analizator. Rezultati se očitavaju kao pozitivni nakon 20 minuta, a negativni i slabo pozitivni nakon dva sata.

4.2.5. Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički. Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi, osim kod dobi koja je prikazana s aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom te analizirana nezavisnim t-testom. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele te su se razlike između pojedinih skupina analizirale χ^2 testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom u slučajevima kada je po ćeliji bilo manje od 10 ispitanika. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone a razlike su analizirane Mann-Whitney U testom te su prikazane Box i Whiskerovim plotom unutar kojeg su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 1,5 interkvartilnih raspona. Izračunati su Spearmanovi koeficijenti korelacije između koncentracija vitamina D na početku i na kraju istraživanja te njihovim omjerom s ostalim kliničkim i socio-demografskim varijablama. Načinjen je binarni logistički regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja je imala porast koncentracije vitamina D nakon 3 mjeseca. Kao prediktorske varijable korištene su one koje su bile značajne na bivarijatnim usporedbama.

P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

5. REZULTATI

5.1. Prikaz socio-demografskih i kliničkih karakteristika uključenih ispitanika

Socio-demografske i kliničke karakteristike uključenih ispitanika (n=97) prikazane su u Tablici 3. Skoro tri četvrtine ispitanika (73,2%) bilo je ženskog spola, dok je prosječna dob ispitanika bila $78,5 \pm 8,8$ godine. Najveći broj ispitanika imalo je normalnu tjelesnu masu (51,5%) ili preuhranjenost (22,7%). Većina ispitanika imala je blagu do umjerenu kliničku krhkost. Od komorbiditeta najčešći je bio kardiovaskularni (87 ispitanika; 89,7%). Nakon randomizacije, standardnu suplementaciju vitaminom D uzimalo je 41 (42,3%) ispitanika.

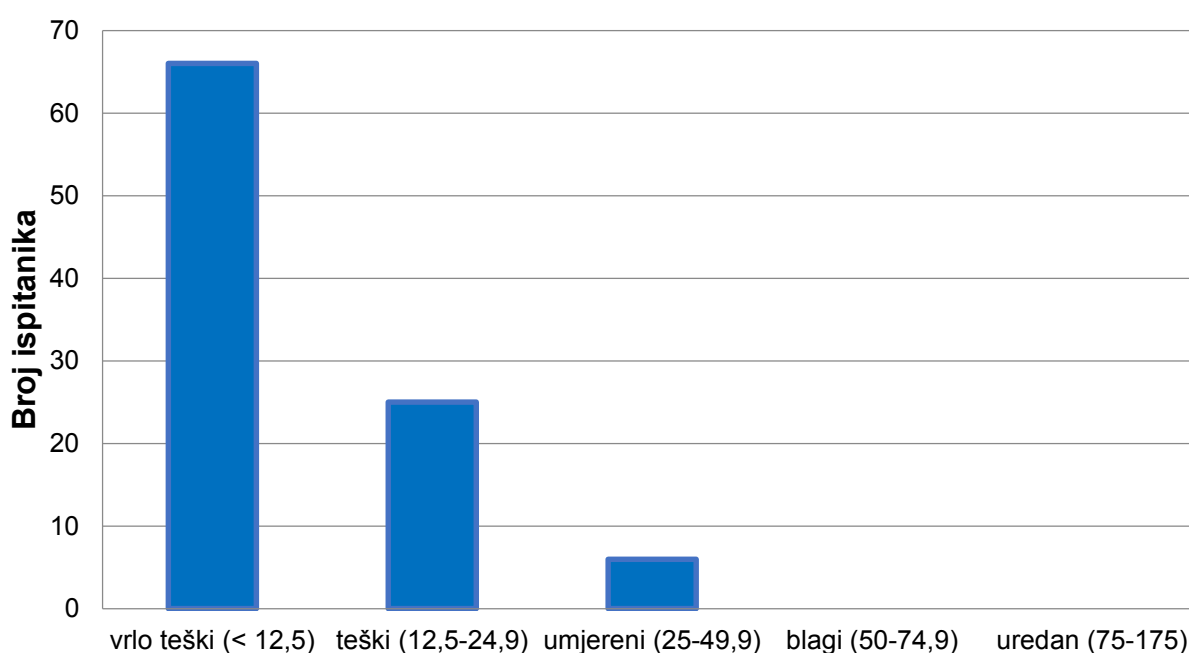
Tablica 3. Socio-demografske i kliničke karakteristike uključenih ispitanika (n=97)

Ženski spol: n (%)	71 (73,2)
Dob (godine): aritmetička sredina $\pm$ SD	$78,5 \pm 8,8$
Indeks tjelesne mase (ITM): aritmetička sredina $\pm$ SD	$22,4 \pm 2,8$
- vrlo teška pothranjenost (ITM < 18), n (%)	2 (2,1)
- pothranjenost (ITM 18-20,99), n (%)	23 (23,7)
- normalna tjelesna masa (ITM 21-24,99), n (%)	50 (51,5)
- preuhranjenost (ITM 25-29,99), n (%)	22 (22,7)
- pretilost (ITM $\geq$ 30), n (%)	0 (0)
Ljestvica kliničke krhkosti: medijan (IOR)*	6,0 (5,0-6,0)
Kardiovaskularni komorbiditet: n (%)	87 (89,7)
Respiratorni komorbiditet (KOPB): n (%)	38 (39,2)
Šećerna bolest tip II: n (%)	20 (20,6)
Srčani zastoj: n (%)	10 (10,3)
Cerebrovaskularna bolest: n (%)	38 (39,2)
Demencija: n (%)	43 (44,3)
Autoimuna bolest: n (%)	22 (22,7)
Broj lijekova koji uzimaju zbog kroničnih tegoba: medijan (IQR)	5,0 (4-7)
Vitamin D suplementacija: n (%)	41 (42,3)

*IQR= interkvartilni raspon; SD= standardna devijacija; KOPB= kronična opstruktivna plućna bolest

5.2. Koncentracija vitamina D u serumu ispitanika na početku istraživanja

Medijan (IQR) koncentracije vitamina D na početku istraživanja bio je 9,2 (5,3 - 14,9) ng/ml. Nitko od ispitanika nije imao preporučene normalne vrijednosti vitamina D u serumu (≥ 75 nmol/L). Prema stupnju nedostatka, najveći broj ispitanika (91, 93,8%) imao je vrlo teški ($<12,5$ nmol/L) ili teški (12,5–24 nmol/L) stupanj hipovitaminoze D (Slika 6).

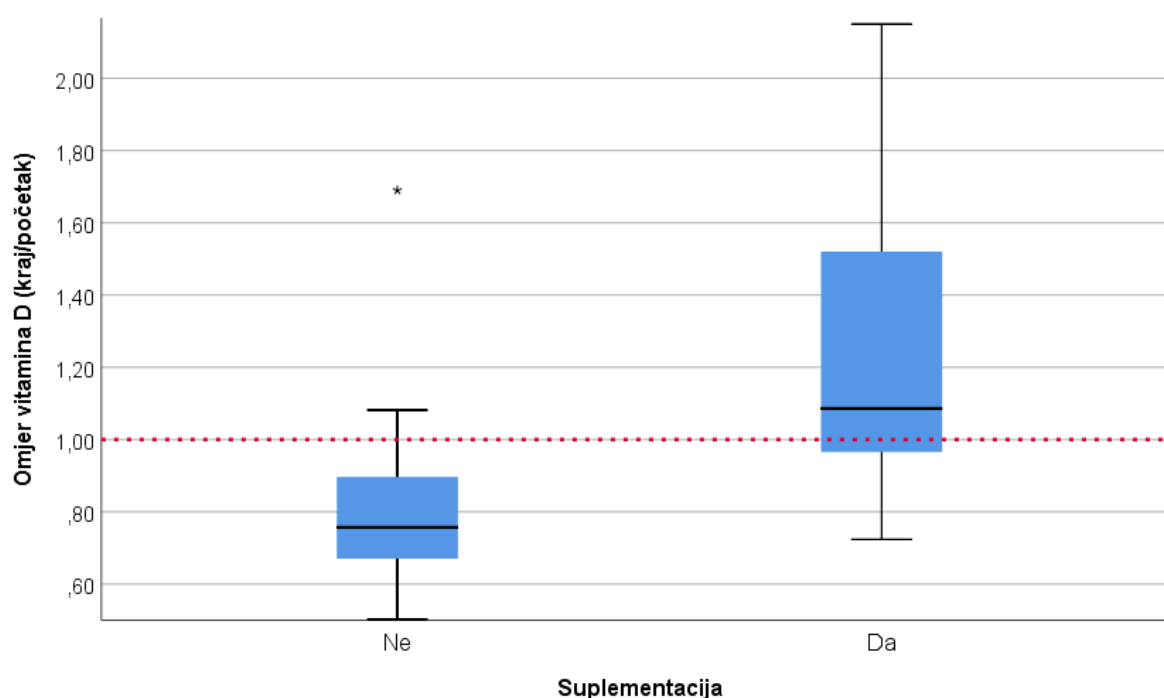


Slika 6. Stupanj nedostatka serumskog vitamina D u ispitanika na početku istraživanja.

5.3. Učinak suplementacije vitaminom D na povećanje vrijednosti vitamina D u serumu nakon tri mjeseca

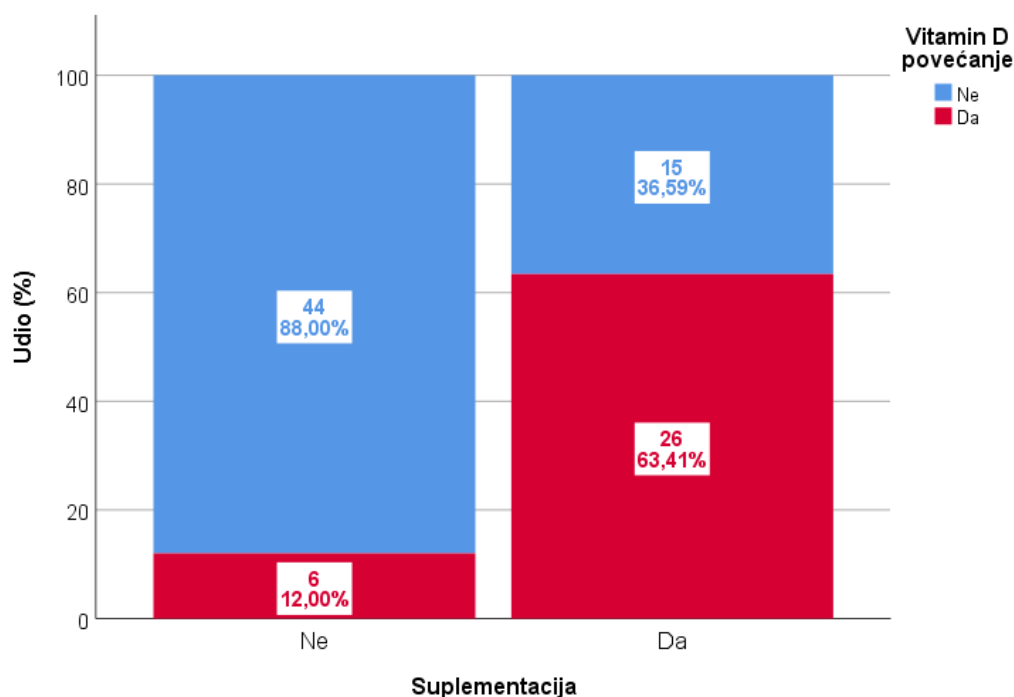
Učinak suplementacije vitaminom D na povećanje vrijednosti vitamina D u serumu nakon tri mjeseca (omjer koncentracije vitamina D nakon tri mjeseca u odnosu na početne vrijednosti) prikazan je na Slici 7. Razvidan je značajan porast

koncentracije kod ispitanika koji su primali suplementaciju s medijanom od 1,09 (0,96-1,56) u odnosu na ispitanike koji nisu primali suplementaciju s medijanom omjera od 0,76 (0,67-0,90).



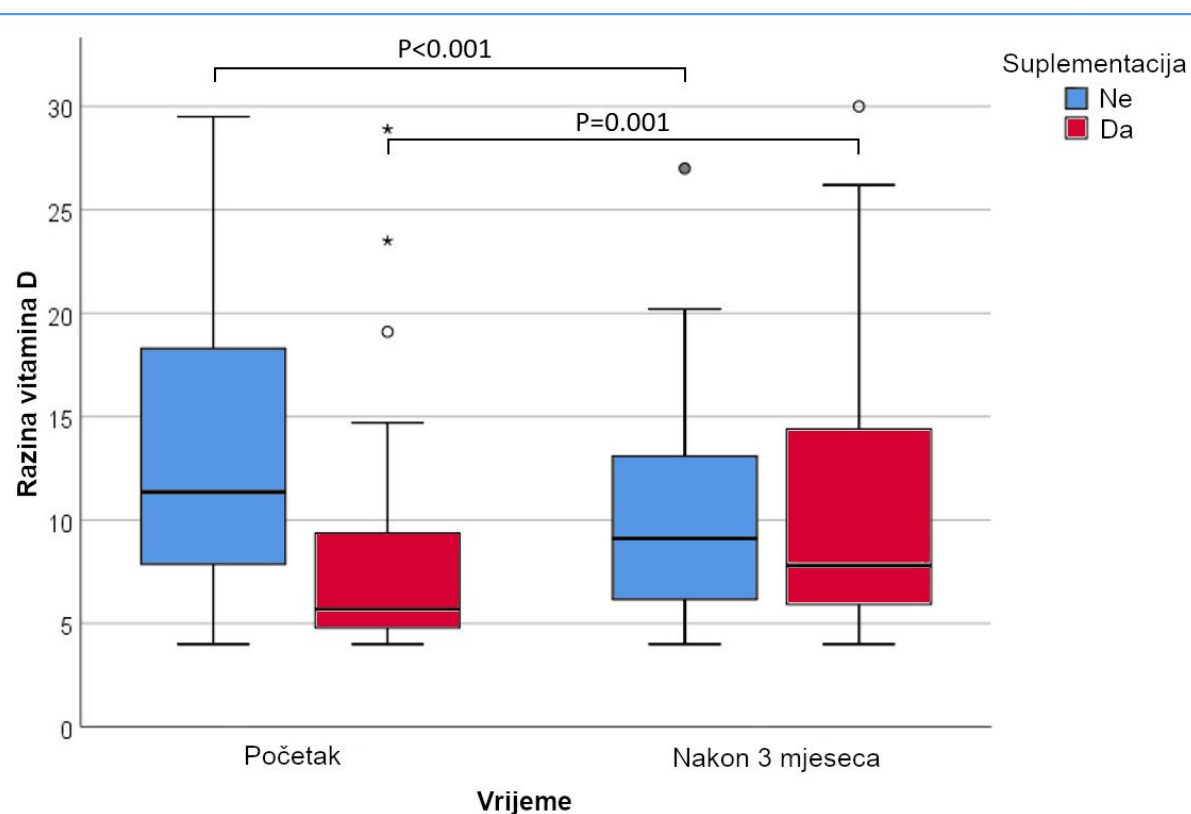
Slika 7. Učinak suplementacije vitaminom D na povećanje vrijednosti vitamina D u serumu nakon 3 mjeseca (omjer koncentracije vitamina D nakon 3 mjeseca u odnosu na početne vrijednosti): Mann-Whitney U test, $P=0,006$

Slika 8. prikazuje učinak suplementacije vitaminom D na povećanje vrijednosti vitamina D u serumu nakon 3 mjeseca ako se povećanje gleda kao binarna kategorijska varijabla (1= postoji povećanje koncentracije, 0= vrijednosti su ostale iste ili su niže nego na početku). Ispitanici koji su primali suplementaciju imali su porast koncentracije vitamina D u 26 (63,4%) slučajeva, dok oni koji nisu primali suplementaciju samo u 12,0%; $P<0,001$. Zaključak slika 6 i 7 je da suplementacija značajno povećava razinu vitamina D.



Slika 8. Učinak suplementacije vitaminom D na povećanje vrijednosti vitamina D u serumu nakon 3 mjeseca: χ^2 test; $P < 0,001$

Iako je na Slikama 7 i 8 prikazano kako standardna suplementacija vitaminom D povećava vrijednosti serumskog vitamina D nakon tri mjeseca, te vrijednosti niti u jednog od ispitanika uključenog u istraživanje, neovisno o tome da li su dobivali suplementaciju vitaminom D ili ne, nije dosegla normalne vrijednosti. Također, nema razlika između skupina koje su primale i koje nisu primale dodatnu suplementaciju vitaminom D što znači da se doze u suplementaciji trebaju povećati kako bi se ostvarila ciljna koncentracija >75 ng/L. U ispitanika koji nisu dobivali suplementaciju vitaminom D došlo je do značajnog smanjenja serumske koncentracije vitamina D nakon tri mjeseca od početka istraživanja ($P < 0,001$) (Slika 9).



Slika 9. Suplementacija vitaminom D kroz tri mjeseca ne povišuje koncentraciju tog vitamina u serumu na normalne vrijednosti, dok ispitanici bez suplementacije imaju značajniju hipovitaminozu D.

5.4. Usporedba sociodemografskih i kliničkih vrijednosti između ispitanika s povećanjem koncentracije vitamina D i ispitanika u kojih su vrijednosti ostale iste ili su niže nego na početku istraživanja

Usporedba sociodemografskih i kliničkih vrijednosti između ispitanika s povećanjem koncentracije vitamina D nakon 3 mjeseca u odnosu na ispitanike u kojih su vrijednosti ostale iste ili su niže nego na početku istraživanja prikazana je u Tablici 4. ispitanici koji su imali povećanje koncentracije vitamina D bili su značajno stariji, uzimali su suplementaciju vitaminom D, češće su imali cerebrovaskularnu bolest, rjeđe su imali autoimune bolesti, uzimali su više lijekova te su imali značajno viši skor na ljestvici kliničke krhkosti.

Tablica 4. Razlike u sociodemografskim i kliničkim vrijednostima između ispitanika koji su imali povećanje koncentracije vitamina D nakon 3 mjeseca i onih u koji su vrijednosti ostale iste ili su niže nego na početku istraživanja.

	Povećanje koncentracije vitamina D n=32	Smanjenje koncentracije vitamina D n=59	P vrijednost
Ženski spol: n (%) ¹	25 (78,1)	44 (74,6)	0,708
Dob (godine): aritmetička sredina ± SD ²	82,8 ± 8,2	75,8 ± 8,2	<0,001
Vitamin D suplementacija: n (%) ¹	26 (81,3)	15 (25,4)	<0,001
Kardiovaskularni komorbiditet: n (%) ¹	30 (93,8)	51 (86,4)	0,287
Respiratorni komorbiditet (KOPB): n (%) ¹	9 (28,1)	27 (45,8)	0,101
Šećerna bolest tip II: n (%) ¹	9 (28,1)	9 (15,3)	0,172
Srčani zastoj: n (%) ¹	4 (12,5)	4 (6,8)	0,445
Cerebrovaskularna bolest: n (%) ¹	22 (68,8)	14 (23,7)	<0,001
Demencija: n (%) ¹	18 (56,3)	21 (35,6)	0,057
Autoimuna bolest: n (%) ¹	2 (6,3)	19 (32,2)	0,004
Ljestvica kliničke fragilnosti: medijan (IQR) ³	6,0 (5,0 - 6,0)	5,0 (5,0 - 6,0)	0,019

Broj lijekova koje uzimaju ispitanici:	7,0 (5,0 - 8,0)	5,0 (3,0 - 6,0)	<0,001
medijan (IQR) ³			

SD= standardna devijacija; KOPB= kronična opstruktivna bolest; IQR= interkvartilni raspon

¹: X² test

²: nezavisni t-test

³: Mann-Whitney U test

5.5. Kliničke i laboratorijske varijable u ispitanika s virusnom respiracijskom infekcijom

Ukupno je 23 ispitanika imalo kliničke i laboratorijske znakove respiracijske infekcije dišnih putova, te im je uzet uzorak za analizu na osam respiracijskih virusa.

Svi ispitanici koji su razvili simptome respiracijske infekcije imali su postavljenu dijagnozu infekcije donjih dišnih putova. Tablica 5 prikazuje kliničke i laboratorijske varijable u tih ispitanika. Jedan ispitanik imao je povišeni gamaGT, dok su ALT i AST bili u svih s respiracijskom infekcijom uredni. Biokemijska analiza urina Šest ispitanika imalo je leukocituriju u rasponu od 1+ do 2+ (rezultati nisu prikazani).

Tablica 5. Kliničke i laboratorijske varijable u ispitanika s virusnom respiracijskom infekcijom.

Varijabla	Srednja vrijednost	SD	Minimum	Maksimum	Percentile		
					25.	50. (medijan)	75.
CRP	26,24	11,14	8,00	43,00	16,50	28,00	35,50
L (x 10 ⁹ /L)	7,91	1,44	5,86	9,90	6,60	8,40	9,15
Neutrofili (x10 ⁹ /L)	4,65	1,15	2,50	6,20	3,53	4,90	5,55
Limfociti (x 10 ⁹ /L)	3,01	0,65	1,90	4,10	2,31	3,20	3,42
Kreatinin (μmol/L)	83,94	13,91	54,00	105,00	76,00	82,00	94,50
sO ₂	84,82	5,38	72,00	92,00	81,00	85,00	89,00

Ukupni proteini (g/L)	67,53	8,50	52,00	87,00	62,00	66,00	73,50
IgM (g/L)	1,81	0,67	0,36	3,10	1,80	1,98	2,10
IgG (g/L)	10,91	3,01	7,30	18,00	8,40	10,90	12,85
IgA (g/L)	2,10	1,04	0,63	3,70	0,98	2,10	3,00

CRP= C-reaktivni protein; L=leukociti; sO2= saturacija kisika mjerena perkutanom oksimetrijom; SD= standardna devijacija; IgM= imunoglobulin M; IgG= imunoglobulin G; IgA= imunoglobulin A

5.6. Usporedba kategorijskih socio-demografskih i kliničkih varijabli obzirom na pozitivan bris na gripu

U 17 ispitanika dokazan je antigen virusa gripe tip A, dok niti jedan drugi virus nije dokazan tijekom trajanja istraživanja. Usporedba kategorijskih socio-demografskih i kliničkih varijabli obzirom na pozitivan bris na gripu prikazana je utablici 6. Ispitanici koji su imali dokazan virus gripe značajno su češće imali smrtni ishod ($P < 0,001$) kao i zatajenje srca ($P = 0,014$). Iako je broj ispitanika s pozitivnim nalazom na gripu koji su dobivali suplementaciju vitaminom D ($n=5$) bio manji nego u kontrolnoj grupi ($n=12$), nije bilo statistički značajne razlike između te dvije grupe ispitanika.

Tablica 6. Usporedba kategorijskih socio-demografskih i kliničkih varijabli obzirom na pozitivan bris na gripu: Fisherov egzaktni test

		Pozitivan bris na gripu				P
		Ne		Da		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	21	26,3%	5	29,4%	0,770
	Ženski	59	73,8%	12	70,6%	
Vitamin D suplementacija	Ne	44	55,0%	12	70,6%	0,288
	Da	36	45,0%	5	29,4%	
Smrtni ishod	Ne	80	100,0%	13	76,5%	<0,001
	Da	0	0,0%	4	23,5%	
Respiratorni komorbiditet (KOPB):	Ne	52	65,0%	7	41,2%	0,100
	Da	28	35,0%	10	58,8%	
Kardiovaskularne bolesti	Ne	8	10,0%	2	11,8%	1,000
	Da	72	90,0%	15	88,2%	
Šećerna bolest tip II	Ne	66	82,5%	11	64,7%	0,110
	Da	14	17,5%	6	35,3%	
Srčani zastoj	Ne	75	93,8%	12	70,6%	0,014
	Da	5	6,3%	5	29,4%	
Cerebrovaskularna bolest	Ne	48	60,0%	11	64,7%	0,790

	Da	32	40,0%	6	35,3%	
Demencija	Ne	44	55,0%	10	58,8%	1,000
	Da	36	45,0%	7	41,2%	
Autoimuna bolest	Ne	61	76,3%	14	82,4%	0,755
	Da	19	23,8%	3	17,6%	

KOPB= kronična opstruktivna bolest

Usporedba kvantitativnih kliničkih varijabli obzirom na pozitivan bris na gripu prikazana je u tablici 7. Ispitanici koji su imali gripu imali su značajno niže koncentracije vitamina D na početku, ali i na kraju istraživanja, skoro dvostruko niže od preporučenih vrijednosti. Također, ispitanici koji su imali dokazanu gripu uzimali su značajno više lijekova ($P=0,001$).

Tablica 7. Usporedba kvantitativnih kliničkih varijabli obzirom na pozitivan bris na gripu: Mann-Whitney U test

Pozitivan bris na gripu		N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob (godine)	Ne	80	65,00	96,00	70,00	78,00	84,75	0,283
	Da	17	66,00	95,00	73,50	79,00	85,50	
Vitamin D početak	Ne	80	4,00	43,20	5,64	9,54	17,10	0,016
	Da	17	4,00	21,90	4,30	5,26	11,95	
Vitamin D kraj	Ne	78	4,00	44,50	6,65	8,98	13,73	0,008
	Da	13	4,00	18,50	4,00	5,21	9,60	
Vitamin D omjer (kraj/početak)	Ne	78	0,55	2,56	0,74	0,91	1,09	0,559
	Da	13	0,50	1,93	0,88	0,97	1,04	
Broj lijekova koje uzimaju	Ne	80	1,00	9,00	3,00	5,00	7,00	0,001
	Da	17	4,00	9,00	5,00	7,00	8,00	
Ljestvica kliničke fragilnosti	Ne	80	5,00	7,00	5,00	6,00	6,00	0,451
	Da	17	5,00	7,00	5,00	6,00	6,00	

Tablica 8. prikazuje povezanost koncentracija vitamina D na početku i na kraju istraživanja s pojedinim kliničkim odrednicama. Broj različitih lijekova koje uzimaju

značajno negativno korelira s vrijednostima vitamina D na početku i na kraju ispitivanja, ali pozitivno korelira s povećanjem vitamina D nakon 3 mjeseca (omjer kraj/početak). Prema nalazu skora, ljestvica kliničke fragilnosti također pozitivno korelira s vrijednostima omjera kraj/početak vitamina D.

Tablica 8. Povezanost koncentracija vitamina D na početku i na kraju istraživanja s pojedinim kliničkim odrednicama: Spearmanov koeficijent korelacije rho

		Vitamin D početak	Vitamin D kraj	Omjer vitamina D (kraj/početak)
Broj lijekova koje uzimaju	Korelacijski koeficijent P	-0,478 <0,001	-0,367 <0,001	0,420 <0,001
Skala kliničke fragilnosti	Korelacijski koeficijent P	-0,368 <0,001	-0,179 0,089	0,380 <0,001
CRP	Korelacijski koeficijent P	-0,141 0,590	-0,031 0,921	0,302 0,317
L ($\times 10^9/L$)	Korelacijski koeficijent P	-0,122 0,641	-0,157 0,608	-0,278 0,357
Neutrofili ($\times 10^9/L$)	Korelacijski koeficijent P	-0,023 0,929	0,292 0,334	0,136 0,659
Limfociti ($\times 10^9/L$)	Korelacijski koeficijent P	0,005 0,985	0,134 0,661	-0,006 0,986
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	Korelacijski koeficijent P	0,140 0,593	-0,265 0,382	-0,205 0,502
spO ₂ (%)	Korelacijski koeficijent P	0,003 0,991	-0,065 0,833	-0,207 0,497
Ukupni proteini (g/L)	Korelacijski koeficijent P	0,164 0,530	0,204 0,505	-0,387 0,191
IgG (g/L)	Korelacijski koeficijent P	-0,111 0,673	-0,261 0,389	0,014 0,964
IgA (g/L)	Korelacijski koeficijent P	0,012 0,962	-0,184 0,547	-0,429 0,144
IgM (g/L)	Korelacijski koeficijent	-0,240	-0,265	-0,140

	P	0,354	0,382	0,649
CRP= C-reaktivni protein; L= leukociti; sO2= saturacija kisika mjerena perkutanom oksimetrijom; SD= standardna devijacija; IgM= imunoglobulin M; IgG= imunoglobulin G; IgA= imunoglobulin A				

Predikcija povećanja koncentracije vitamina D nakon tri mjeseca prikazana je u Tablici 9. Regresijski model je statistički značajan ($P < 0,001$), objašnjava 54,8% varijance zavisne varijable, te ispravno klasificira 81,3% ispitanika. Kao najjači nezavisni prediktor izdvaja se suplementacija vitaminom D koja povećava vjerojatnost pripadnosti skupini s povećanjem koncentracije vitamina D za 10,92 puta ($OR = 10,92$, 95% $CI = 3,08-38,68$), kontrolirana na utjecaj svih ostalih varijabli u modelu.

Tablica 9. Predikcija povećanja koncentracije vitamina D nakon 3 mjeseca: binarna logistička regresija

	OR	95% CI Donji	Gornji	P
Dob (godine)	1,05	0,97	1,14	0,203
Broj lijekova koje uzimaju	1,30	0,90	1,87	0,164
Ljestvica kliničke fragilnosti	0,90	0,32	2,53	0,836
Suplementacija vitaminom D	10,92	3,08	38,68	<0,001
Cerebrovaskularna bolest	3,89	0,99	15,31	0,052
Autoimuna bolest	0,54	0,09	3,29	0,501

OR= engl. *odds ratio* (omjer izgleda); CI= engl. *confidence interval* (interval pouzdanosti)

5.7. Učinak suplementacije vitaminom D na incidenciju i kliničku sliku respiracijske infekcije u odnosu na razinu serumskog IgG protiv CMV-a

Ukupno je 79 (81,4%) ispitanika imalo pozitivan nalaz IgG protiv CMV-a u uzorku seruma uzorkovanog na početku istraživanja. Nismo našli značajne povezanosti između sociodemografskih varijabli, promjenama u koncentracijama vitamina D niti incidenciji te kliničkoj slici respiracijske infekcije u odnosu na mogući stupanj imunosenescencije procijenjen razinom serumskog IgG protiv CMV-a.

6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su, po prvi puta u našoj zemlji, da osobe starije životne dobi (≥ 65 godina), neovisno o dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, komorbiditetima, broju lijekova koje uzimaju zbog kroničnih bolesti te stupnju fragilnosti prema ljestvici validiranoj za osobe smještene u domovima za starije osobe imaju vrlo visoku prevalenciju (94%) vrlo teškog i teškog nedostatka vitamina D. Ta prevalencija značajno je viša od one opisane u radu Laktašić-Žerjavić i sur. za ženske osobe u postmenopauzi starije od 50 godina u našoj zemlji i koja iznosi 14,2% (60). Ta razlika barem je dijelom i očekivana budući su ispitanici uključeni u naše istraživanje značajno stariji i s pridruženim dopunskim rizicima za manjak vitamina D kao što su povećani stupanj krhkosti, smanjena pokretljivost i njoj pridruženo smanjeno izlaganje sunčevim zrakama.

Preporučena poželjna koncentracija serumskog vitamina D radi smanjenja rizika od padova i prijeloma prema smjernicama internacionalnih stručnih društava (Endokrinološko društvo, Nacionalna udruga za osteoporozu, Internacionalna udruga za osteoporozu, Američko gerijatrijsko društvo) u osoba starije dobi je > 75 nmol/L (81-85). Prepoznajući važnost vitamina D, hrvatske nacionalne smjernice za prehranu starijih osoba objavljene 2011. godine istaknule su važnost prepoznavanja mogućeg nedostatka mikronutrijenata, među koje ubrajamo i vitamin D, u prehrani osoba starije dobi (70). Usporedba različitih preporuka i praksi u različitim zemljama detaljnije je opisana i u recentnom preglednom radu (86).

Prevalencija stupnja nedostatka vitamina D koju imaju ispitanici u našem istraživanju u skladu je s podacima iz drugih europskih zemalja (87, 88). Neki istraživači smatraju da bi se u takvih osoba suplementacija trebala uvesti i bez prethodnog određivanja koncentracije vitamina D u serumu (89).

Budući da je glavni cilj našeg istraživanja ispitivanje uloge suplementacije vitaminom D tijekom zimskog perioda i nakon provedenog cijepljenja protiv gripe koje se provodi od 11. mjeseca svake godine, postoji i mogućnost da su koncentracije vitamina D u naših ispitanika niže slijedom ranijih opažanja o nižim vrijednostima

vitamina D u serumu tijekom zimskih mjeseci (90). Međutim, za osobe smještene u domovima za starije osobe, studija Schramm i sur. pokazala je da u tih osoba nema značajne promjene koncentracije serumskog vitamina D što se povezuje s već ranije spomenutim čimbenicima rizika za tu populaciju među kojima je posebno izdvojeno smanjeno izlaganje sunčevim zrakama zbog otežane pokretljivosti (91).

Unatoč postojanju nacionalnih smjernica, niti jedan od ispitanika uključenih u našu studiju nije imao provjeru koncentracije vitamina D u serumu prije smještaja u dom niti je bio na suplementaciji tim vitaminom prije uključivanja u studiju (prema heteroanamnestičkim podacima i dostupnoj medicinskoj dokumentaciji). Obveza propisivanja suplementacije vitamina D i za osobe smještene u domovima za starije i nemoćne nije donešena niti u svim razvijenim zemljama. Dvije recentno objavljene studije provedene u Australiji i Belgiji tako su pokazale da oko 50% liječnika obiteljske medicine u tim zemljama propisuje redovitu suplementaciju vitaminom D iako je ona u Australiji, za razliku od Belgije, obvezna u starijih osoba s nepoznatom koncentracijom vitamina D u serumu ili s dokazanim nedostatkom (92,93).

Učinkovitost rutinske suplementacije vitaminom D neovisno o dobnoj skupini i rizicima, a posebno u starijih osoba također je predmet rasprave. Tako su Wijnen i sur. pokazali da suplementacija s 800 IU/dn ne podiže 25(OH)D do >75 nmol/L niti nakon 26 tjedana suplementacije u većine ispitanika te da bi oni s teškim deficitom trebali imati individualnu shemu terapije (94). Ti su rezultati u skladu s rezultatima našeg istraživanja, a također i otklanjaju sumnju da je vrijeme između testiranja uzoraka u našem istraživanju bilo prekratko. Još uvijek nije posve jasno po kojim kriterijima bi se kreirala takva individualna shema terapije. Pokušano je npr. provesti suplementaciju vitaminom D u starijih osoba smještenih u dom davanjem prvo udarne doze od 200000 IU (engl. *loading dose*), a potom nastavka dozom održavanja 100000 IU svakih 13 tjedana, no niti taj pristup nije bio učinkovit (95). Čini se da je važan i oblik vitamina D koji se daje starijim osobama. Naime, Veleva i sur. su pokazali bolju učinkovitost kolekalciferola u kapsulama koje sadrže 5600 IU tjedno (800 IU/dn) u odnosu na svakodnevno davanje istog lijeka u obliku kapi u dozi 800 IU/dn (96). Budući da nam je u našoj zemlji u vrijeme provođenja našeg istraživanja jedini preparat kolekalciferola bio dostupan u kapima i s obzirom na dob ispitanika te komorbiditete koje im često otežavaju gutanje, u našem smo istraživanju koristili

kolekalciferol u kapima. Međutim, važna razlika u dizajnu studije Veleva i sur. u odnosu na naše istraživanje jest što ti istraživači nisu odredili početnu razinu 25(OH)D prije suplementacije te je još uvijek otvoreno da li bi davanje vitamina D u kapsulama bilo podjednako učinkovito i u ispitanika s vrlo teškim i teškim nedostatkom vitamina D koji su činili 94% od ispitanika uključenih u naše istraživanje.

Također je potrebno jasno navesti da je preporučena doza za suplementaciju vitamina D u starijih osoba u različitim zemljama vrlo raznolika (86). Tako npr. američki Institut za medicinu savjetuje unos od 400 IJ vitamina D na dan kod djece do godinu dana, 600 IJ vitamina D na dan za osobe u dobi od 1 do 70 godina te 800 IJ vitamina D na dan za starije od 70 godina (97). Budući da je nedostatak vitamina D u starijih osoba vrlo rasprostranjen, što pokazuju i naši rezultati, Američko društvo za endokrinologiju savjetuje da se te preporuke uzmu kao minimalni preporučeni unos te je preporučilo više doze (1500 - 2000 IJ/dnevno) za sve osobe s rizikom za nedostatak vitamina D (81). Međutim, recentnije studije posumnjale su da se u izračunu američkog Instituta za medicinu učinila statistička pogreška te da je dnevna potreba za vitaminom D vjerojatno više od 6000 IJ/dnevno (98,99). U usporedbi rezultata studija potrebno je voditi i računa koji pripravci vitamina D su davani ispitanicima. Svi ispitanici uključeni u našu studiju dobivali su vitamin D3 (kolekalciferol) koji je učinkovitiji u podizanju razine serumskog 25(OH)D od ergokalciferola (100).

U našem istraživanju, preporučena doza suplementacije prema nacionalnim smjernicama (800 IJ/dnevno) u ispitanika koji su dobivali suplementaciju jest povisila koncentraciju vitamina D u serumu nakon tri mjeseca terapije, ali ona niti u jednog od tih ispitanika nije dosegla ciljnu koncentraciju >75 ng/L. Usporedba sociodemografskih i kliničkih vrijednosti između ispitanika s povećanjem koncentracije vitamina D nakon 3 mjeseca (iako nisu imali željenu ciljnu koncentraciju) u odnosu na ispitanike u kojih su vrijednosti ostale iste ili su niže nego na početku istraživanja, pokazala je da su ispitanici koji su imali povećanje koncentracije vitamina D bili značajno stariji, češće su imali cerebrovaskularnu bolest, rjeđe su imali autoimune bolesti, uzimali su više lijekova te su imali značajno viši skor na ljestvici kliničke fragilnosti. Ti rezultati mogli bi uputiti koje starije osobe su od višeg rizika za izostanak učinka suplementacije vitaminom D te pomoći pri izradi individualnog izračuna doze vitamina D za suplementaciju.

Važnost vitamina D za različite aspekte zdravlja ljudi predmet je intenzivne rasprave. Potrebno je, naime, istaći da unatoč nedvojbenoj ulozi vitamina D u sprječavanju nastanka rahitisa, studije koje su istraživale doprinos suplementacije vitaminom D u prevenciji padova i lomova u starijih osoba vrlo su kontradiktorne. Tako je recentna meta-analiza 81 randomiziranih kontroliranih studija pokazala da suplementacija vitaminom D neovisno o dozi koja se davala, ne prevenira nastanak lomova niti utječe na gustoću kostiju (101). Ti rezultati dočekani su s velikom kritikom budući su u toj meta-analizi analizirane studije samo s vitaminom D, a ne i pridruženim davanjem kalcija, uključene su studije kratkog trajanja, kao i studije u kojima se vitamin D davao u visokim dozama u bolusu za koje se već zna da nose rizik za lomove. Kritičari te meta-analize također su istaknuli da bi od suplementacije vitaminom D korist prvenstveno trebale imati starije osobe koje imaju dokazan manjak vitamina (102, 103). Osim za zdravlje kostiju, istraživali su se i drugi aspekti koristi suplementacije vitaminom D u ljudi. Najveća meta-analiza objavljenih studija u periodu od 1966-2013. godine pokazala je da je koncentracija 25(OH)D <75 nmol/L vjerojatno preniska i pridružena s povišenim rizikom za smrtnost (104). U nekim drugim studijama npr. VIDA (vitamin D 100.000 IU/dn peroralno) i VITAL (kombinacija vitamina D 2000 IU/dn i 1 g/dn omega-3 masnih kiselina) nije opisan zaštitni učinak na kardiovaskularne bolesti i nastanak raka (105,106). Moguću korist od suplementacije vitaminom D (doza 20000 IU/tjedno) tijekom pet godina u žena u postmenopauzi smanjila je rizik urinarnih infekcija (107). Da li i u kojoj mjeri te u kojoj dozi suplementacija vitaminom D može smanjiti incidenciju urinarnih infekcija i u starijih osoba smještenih u domove, koje su po učestalosti odmah nakon respiracijskih virusnih infekcija, tek treba detaljnije istražiti.

Razlozi za različitost učinka na suplementaciju vitamina D u osoba bilo koje dobi još nisu u potpunosti istraženi. Pretpostavlja se da omjer serumskog 24,25-dihidroksivitamina D i 25(OH)D, polimorfizam proteina koji veže vitamin D, pretilost a moguće i stupanj metilacije DNA molekula CYP2R1 i CYP24A1 doprinose različitosti (108-111).

Virusne respiracijske infekcije osobito mogu biti opasne za osobe starije životne dobi zbog njihove krhkosti i niza kroničnih bolesti povezanih s ovom dobnom skupinom. Te osobe su pod povišenim rizikom za nepotrebnu i neučinkovitu uporabu

antibiotika za liječenje tih infekcija. S obzirom na rizik za respiracijske virusne infekcije osobito u osoba smještenih u domovima za starije (45), postavlja se i pitanje da li nedostak vitamina D nosi povišeni rizik za nastanak tih infekcija te da li se preporučenom suplementacijskom dozom vitamina D može utjecati na pojavnost i kliničku prezentaciju tih infekcija.

U našem istraživanju odabrali smo mjerenje koncentracije vitamina D nakon tri mjeseca i iz razloga što nam je cilj bilo praćenje učinka suplementacije na pojavnost virusnih respiracijskih infekcija. Svi ispitanici cijepljeni su protiv gripe početkom studenog 2016. godine, a prema prethodnim iskustvima najviša incidencija gripe u našoj zemlji je od siječnja do kraja ožujka. Sličan pristup istraživanju učinka suplementacije no samo kao odgovor na cjepivo protiv gripe imali su i Goncalves-Mendes i sur. (112).

Studije su pokazale da je tijekom zimskih mjeseci najčešći dokazani uzročnik virusnih respiracijskih infekcija osoba smještenih u dom za starije i nemoćne virus gripe (45,47). Svi ispitanici uključeni našu studiju cijepljeni su protiv gripe u sezoni 2016/2017 trovalentnim cjepivom prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije sa slijedećim sastavom A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 – sličan soj (A/California/7/2009, NYMC X-181), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) – sličan soj (A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B) i B/Brisbane/60/2008 – sličan soj (B/Brisbane/60/2008, divlji tip). U našem istraživanju nismo ispitivali moguće korelate zaštitnosti nakon cijepljenja, te smo pretpostavili da je zaštitna visina titra protutijela nakon cijepljenja protiv influence u naših ispitanika slična onoj koja se opisuje za osobe starije dobi te na osnovu koje je procijenjena učinkovitost cjepiva u maksimalno 30-50% cijepljenih starijih osoba (54,55). Izostanak učinkovitosti cijepljenja protiv gripe u starijih osoba povezivao se i s manjkom vitamina D no meta-analiza Lee i sur. nije pokazala povezanost (113).

U našem istraživanju ukupno su 23 ispitanika imala kliničke i laboratorijske znakove respiracijske infekcije koja se prezentirala u svih kao infekcija donjih dišnih putova. Poznato je da raspon tegoba u starijih osoba koje uzrokuju respiracijski virusi izrazito raznolik što može otežati pravovremeno postavljanje dijagnoze koja je prvenstveno klinička (114). S obzirom na mjesto izvođenja našeg istraživanja pri dijagnozi smo se koristili i laboratorijskim nalazima te saturacijom O₂ mjerenom

perkutanom oksimetrijom, a dijagnozu infekcije postavio je liječnik. U svih bolesnika uzet je nazofaringealni bris unutar pet dana od početka respiracijske bolesti. Test koji smo koristili za dijagnostiku osam respiracijskih virusa (influenca A i B, respiracijski sincicijski virus A i B, virusi parainfluence 1-3, humani metapneumovirus, adenovirus) je direktni test kojim se određuju virusni antigeni metodom imunoeseja. Glavna prednost mu je, uz mogućnost dokazivanja relevantnih virusa povezanih s virusnim respiracijskim infekcijama u starijih osoba, i njegova brzina izvođenja, koja omogućuje dobivanje prvih rezultata nakon 20 minuta ako je uzorak pozitivan na testirane viruse, do najviše dva sata za izdavanje negativnog i slabopozitivnog nalaza. Taj test također je dostupan za kliničku primjenu u našoj zemlji. Osjetljivost i specifičnog testa kojeg smo koristili u istraživanju niža je za većinu virusa u odnosu na testove molekularne dijagnostike. Za npr. virus influenza A osjetljivost je 71%, a specifičnost 100%, dok je za virus influenza tip B i osjetljivost i specifičnost niža (86%, tj. 98%) (52). I ostale studije koje su uspoređivale ovaj test pokazale su da je glavni nedostatak ovog testa upravo njegova niska osjetljivost (115, 116). Osim toga osjetljivost i specifičnost ovog testa nije ispitana u starijih osoba.

Važno je istaknuti da je u naših ispitanika učestalost infekcije gripom unatoč cijepljenju manja od očekivane koju pokazuju druga istraživanja učinkovitosti cijepljenja protiv gripe u starijih osoba i na osnovu čega se razvijaju vrste cjepiva za starije osobe koje sadrže adjuvanse u svrhu bolje učinkovitosti cjepiva protiv gripe (54,55). Razlog tome može biti pravoremeno prepoznavanje infekcije i poduzimanje zaštitnih mjera izolacije ispitanika s kliničkom slikom respiracijske infekcije. Također je moguće da su ispitanici imali od ranije zaštitnu imunost zbog preboljele infekcije virusom gripe A. Međutim, mogući pozitivni učinak prethodnih cijepljenja protiv gripe je prema novim istraživanjima upitan, budući u ranije cijepljenih osoba razina zaštitnih protutijela je ista ili čak i niža nego u osoba koje se cijepe po prvi puta. Do sada nije poznato da li isti učinak ima prethodno cijepljenje i u osoba starije dobi (117,118).

S obzirom da je šest ispitanika imalo negativan test na ispitivane respiracijske viruse, postavlja se pitanje etiologije infekcije. Uzimajući u obzir kontagioznost gripe i nižu osjetljivost korištenog testa detekcije virusa, ne možemo isključiti mogućnost da je i preostalih šest ispitanika imalo tu infekciju. Iako i drugi respiracijski virusi mogu biti

fatalni za osobe starije dobi, naši rezultati su pokazali da su ispitanici s dokazanom gripom imali značajno češće smrtni ishod kao i zatajenje srca.

Usporedivi test, čiji se rezultati mogu komparirati s našima bio bi multiplexPCR koji se tek od 2020 godine koristi u našoj zemlji (119, 120).

Mogući učinak nedostatka vitamina D u povećanoj sklonosti respiracijskim virusnim infekcijama u starijih osoba smještenima u domovima za starije i nemoćne osobe u kojih je uziman primjeren uzorak za virusnu analizu nije do sada istraživao. Naše istraživanje pokazalo je su ispitanici koji su imali gripu imaju i značajno niže koncentracije vitamina D na početku, ali i na kraju istraživanja, skoro dvostruko niže od preporučenih vrijednosti. Također, ispitanici koji su imali gripu uzimali su značajno više lijekova.

Iako je broj ispitanika s pozitivnim nalazom na gripu koji su dobivali suplementaciju vitaminom D (n=5) bio manji nego u kontrolnoj grupi (n=12), nije bilo statistički značajne razlike između te dvije grupe ispitanika. Opservacijske studije pokazale su moguću povezanost statusa vitamin D i akutnih respiracijskih infekcija u općoj populaciji, međutim, rezultati randomiziranih kliničkih studija o mogućoj koristi suplementacijom vitamina D su neujednačeni (76-79). Te razlike obrazlažu se raznolikošću dobi i zdravstvenog stanja ispitanika, početnom serumskom koncentracijom vitamina D i načinom suplementacije vitaminom D (npr. svaki dan ili povremeno). Međutim, rad Martineau i sur. pokazao je da visoke doze vitamina D datih svaka dva mjeseca (3 mg što iznosi 120000 IJ) u starijih osoba u odnosu na grupu ispitanika koja je dobivala dnevno 400 IU dovodi do povećanog rizika za nastanak infekcija gornjih dišnih putova i produžuje njihovo trajanje, dok nema učinka na infekcije donjih dišnih putova (121). Recentna meta-analiza 25 objavljenih studija iste istraživačke grupe pokazala je da suplementacija vitaminom D smanjuje opći rizik za infekcije dišnih putova i njihovo trajanje (122). Potrebno je istaći da je samo jedna od studija uključenih u meta-analizu ispitala učinak suplementacije vitaminom D u osoba smještenih u domove (123). Ta studija je, međutim, uključila osobe već od 60. godine života koje su dobivale značajno veće doze vitamina D nego u našoj studiji. Također, niti u jednoj od navedenih studija nije se dokazivala etiologija respiracijskih

infekcija te nisu posebno bile promatrane virusima uzrokovane respiracijske infekcije (122).

Istraživanja imunosenescencije pokazala su i moguću ulogu latentne infekcije citomegalovirusom (CMV), a ista se povezuje i s neučinkovitosti cjepiva protiv gripe u starijih osoba (22,43). Do danas nema istraživanja koja su ispitala učinak suplementacije vitaminom D u starijih osoba i CMV-seropozitivnosti na sklonost respiracijskim virusnim infekcijama u osoba starije dobi. U našem istraživanju ukupno je 79 (81,4%) ispitanika imalo pozitivan nalaz IgG protiv CMV-a u uzorku seruma uzorkovanog na početku istraživanja. Međutim, nismo našli značajne povezanosti između sociodemografskih varijabli, promjenama u koncentracijama vitamina D niti incidenciji te kliničkoj slici respiracijske infekcije u odnosu na mogući stupanj imunosenescencije procijenjen razinom serumskog IgG protiv CMV-a. Povećani broj CMV-specifičnih CD4⁺ T-limfocita povezan je s rizikom za respiracijske virusne infekcije u starijih osoba (124). Slijedom tih rezultata, bilo bi potrebno ispitati da li suplementacija vitaminom D utječe na tu podgrupu T-limfocita. Naime, za razliku od imunoreakcija prirođene imunosti u kojima prvenstveno djeluje stimulirajuće, učinak vitamina D *in vitro* na reakcije stečene imunosti je inhibicijski budući smanjuje prepisivanje gena za IL-2 u Th1-limfocitima, povećava prepisivanje gena za Foxp3 u regulacijskim T-limfocitima te smanjuje prepisivanje gena za IL-17 u Th17-stanicama (125). Da li i u kojoj dozi suplementacija vitaminom D i u starijih osoba djelovanjem na sastavnice specifične imunosti može doprinijeti zaštiti od virusnih respiracijskih infekcija tek treba istražiti.

7. ZAKLJUČCI

1. Rezultati našeg istraživanja pokazali su, po prvi puta u našoj zemlji, da osobe starije životne dobi (≥ 65 godina), neovisno o dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, komorbiditetima, broju lijekova koje uzimaju zbog kroničnih bolesti te stupnju fragilnosti prema ljestvici validiranoj za osobe smještene u domovima za starije osobe imaju vrlo visoku prevalenciju (94%) vrlo teškog i teškog nedostatka vitamina D.
2. Potrebno je podići svjesnost o visokom udjelu nedostatka vitamina D u osoba starije životne dobi smještenih u domove u našoj zemlji budući niti jedan od ispitanika nije imao provjeru koncentracije vitamina D u serumu prije smještaja u dom niti je bio na suplementaciji tim vitaminom prije uključivanja u studiju.
3. Potrebno je odrediti koncentraciju vitamina D u osoba starije dobi smještenih u domove za starije i nemoćne osobe prije uvođenja suplementacije preporučenom dozom prema nacionalnim smjernicama budući ta doza neće biti učinkovita u najvećeg broja ispitanika.
4. Preporučena doza suplementacije prema nacionalnim smjernicama (800 IJ/dnevno) u ispitanika koji su dobivali suplementaciju jest povisila koncentraciju vitamina D u serumu nakon tri mjeseca terapije, ali ona niti u jednog od tih ispitanika nije dosegla ciljnu koncentraciju >75 ng/L. Slijedom tog nalaza našeg istraživanja, potrebna su dodatna istraživanja koja doza i s kojim ciljem prevencije treba biti davana starijim osobama smještenim u domove za starije i nemoćne.
5. Naši rezultati u skladu su s rezultatima većine istraživanja koja su pokazala da najveći učinak suplementacije vitaminom D imaju starije osobe s rizicima kao što su cerebrovaskularna bolest, uzimanje više lijekova i viši stupanj krhkosti. U budućim istraživanjima posebnu pažnju treba posvetiti starijim osobama koje imaju te identificirane čimbenike rizika.
6. Unatoč tome što su bili procijepljeni protiv gripe, u 17 ispitanika dokazan je virus influence tip A kao uzrok respiracijske infekcije. Ta učestalost infekcije unatoč cijepljenju manja je od očekivane budući rezultati drugih istraživanja pokazuju da je zaštitnost cjepiva protiv gripe u osoba starije dobi 30-50%. Naši rezultati upućuju da je cijepljenje starijih osoba smještenih u domove, uz

pravovremeno i brzo prepoznavanje infekcije virusom influence te provođenje zaštitnih mjera za širenje infekcije, učinkovito.

7. Ispitanici koji su imali gripu imali su značajno niže koncentracije vitamina D na početku, ali i na kraju istraživanja, te uzimali više lijekova. Ti rizični čimbenici trebali bi se uzeti u obzir kod prepoznavanja osoba s povećanim rizikom za gripu unatoč cijepljenju.
8. Etiologija virusne respiracijske infekcije u šest ispitanika u kojih nije korištenim dijagnostičkim testom dokazan niti jedan od testiranih uzročnika nije nam poznata. S obzirom na manju osjetljivost korištenog testa u odnosu na testove molekularne dijagnostike, moguće je da je i tih šest bolesnika imalo gripu tip A.
9. Dijagnostički test za dokazivanje virusa u nazofaringealnom obrisku koji smo koristili u istraživanjima potrebno je ispitati i u starijih osoba smještenih u domove kako bi se vidjelo da li mu je osjetljivost slična kao u istraživanjima na ispitanicima mlađe životne dobi.
10. Iako je broj ispitanika s pozitivnim nalazom na gripu koji su dobivali suplementaciju vitaminom D u dozi 800IU/dn bio manji nego u kontrolnoj grupi, razlika nije bila statistički značajna. Smatramo da bi u narednim istraživanjima trebalo uključiti veći broj ispitanika kako bi se vidjelo da li na tom većem uzorku ta razlika možda i jest značajna.
11. U našem istraživanju po prvi puta smo pokazali da mjerenje serumskog IgG protiv CMV-a nije primjeren surogatni biljeg imunosenescencije u procjeni učinka ispitivanih sociodemografskih varijabli niti incidenciji te kliničkoj slici respiracijske infekcije virusom influence u starijih osoba.
12. S obzirom na poznate učinke vitamina D na različite sastavnice imunološkog sustava u ljudi, optimalna doza tog vitamina u sprečavanju infekcija treba biti razmatrana i u sklopu ključnog mehanizma obrane od te infekcije.

8. SAŽETAK

Povezanost vitamina D3 s rizikom od virusne respiracijske infekcije u osoba starije životne dobi

Ana Godan Hauptman

Ciljevi istraživanja: Fiziološki procesi imunosenescencije obilježeni reaktivacijom CMV-infekcije i komorbiditeti doprinose fragilnosti starijih osoba smještenih u domovima za starije i nemoćne, uključujući i povećani rizik za nastanak virusnih respiracijskih infekcija. Te osobe često imaju i nedostatak vitamina D koji može doprinijeti riziku za infekcije. Cilj disertacije je provesti suplementaciju vitaminom D u dozi 800 IU p.o. osobama ≥ 65 godina starosti smještenih u domovima za starije i nemoćne osobe procijepljenih protiv gripe tijekom tri mjeseca i ispitati doprinos različitih kliničkih varijabli incidenciji, vrsti i kliničkoj prezentaciji virusnih respiracijskih infekcija.

Ispitanici i metode: U ovo prospektivno istraživanje uključeno je 97 osoba randomiziranih u dvije skupine: prvu, koja je dobivala suplementaciju vitaminom D i drugu, kontrolnu skupinu, koja nije dobivala suplementaciju tim vitaminom. Svim ispitanicima zabilježeni su komorbiditeti, uzimanje lijekova za kronične tegobe i stupanj krhkosti po Rockwoodu te uzeti uzorci krvi za određivanje koncentracije vitamina D (prije i nakon 3 mjeseca) kao i za određivanje anti-CMV IgG na početku istraživanja. U ispitanika koji su razvili simptome respiracijskih infekcija učinjeni su laboratorijski nalazi i nazofaringealni obrisak za detekciju osam virusnih antigena testom MariPOC®.

Rezultati: Prosječna dob ispitanika bila je $78,5 \pm 8,8$ godine, a od toga su 73,2% činile osobe ženskog spola. Najveći broj ispitanika imalo je normalnu tjelesnu masu (51,5%) ili preuhranjenost (22,7%), a većina je imala blagu do umjerenu kliničku fragilnost. Od komorbiditeta najčešći je bio kardiovaskularni (87 ispitanika; 89,7%). Nakon randomizacije, standardnu suplementaciju vitaminom D uzimalo je 41 (42,3%)

ispitanika. Najveći broj ispitanika (91, 93,8%) imao je vrlo teški (<12,5 nmol/L) ili teški (12.5–24 nmol/L) stupanj hipovitaminoze D. Suplementacija vitaminom D povećala je vrijednosti serumskog vitamina D nakon tri mjeseca, ali te vrijednosti niti u jednog od ispitanika nije dosegla normalne vrijednosti (>75 ng/L). Ispitanici koji su imali povećanje koncentracije vitamina D bili su značajno stariji, češće su imali cerebrovaskularnu bolest, rjeđe su imali autoimune bolesti, uzimali su više lijekova te su imali značajno viši skor na ljestvici kliničke krhkosti. Od ukupno 23 ispitanika s respiracijskim tegobama, svi su imali dijagnozu infekcije donjih dišnih putova, a u 17 ispitanika dokazan je antigen virusa gripe tip A, dok niti jedan od drugih virusa nije dokazan tijekom trajanja istraživanja. Ispitanici koji su imali gripu značajno su češće imali smrtni ishod kao i zatajenje srca, značajno niže koncentracije vitamina D na početku i kraju istraživanja te su zimali više lijekova za kronične tegobe. Iako je broj ispitanika s pozitivnim nalazom na gripu koji su dobivali suplementaciju vitaminom D (n=5) bio manji nego u kontrolnoj grupi (n=12), nije bilo statistički značajne razlike između te dvije grupe ispitanika. Mjerenje serumskog IgG protiv CMV-a nije primjeren surogatni biljeg imunosenescencije u procjeni učinka ispitivanih sociodemografskih varijabli niti incidenciji te kliničkoj slici respiracijske infekcije virusom influence u starijih osoba.

Zaključak: Suplementacija vitaminom D u dozi 800 IU p.o. osobama ≥ 65 godina starosti smještenih u domovima za starije i nemoćne osobe tijekom tri mjeseca nije utjecala na incidenciju, vrstu i kliničku prezentaciju virusnih respiracijskih infekcija. S obzirom na poznate učinke vitamina D na različite sastavnice imunološkog sustava u ljudi, optimalna doza tog vitamina u sprečavanju infekcija treba biti razmatrana i u sklopu ključnog mehanizma obrane od te infekcije.

9. SUMMARY

Association of vitamin D3 with the risk for respiratory viral infections in elderly persons

Ana Godan Hauptman

PhD Thesis 2021

Aim: The aim of disertation is to supplement vitamin D at 800 IU p.o. for three months to nursing home residents ≥ 65 years of age following vaccination against influenza and to examine the contribution of different clinical variables to the incidence, type and clinical presentation of viral respiratory infections.

Patients and methods: This prospective study included 97 elderly randomized to two groups: the first one, which received vitamin D supplementation and the second, the control group, withou supplementation. Comorbidities, use of prescription drugs for chronic problems and Rockwood level of fragility were reported for all subjects. Blood samples were taken for determination of vitamin D concentrations (before and after 3 months) as well as for determination of anti-CMV IgG at the beginning of the study. Laboratory findings and nasopharyngeal swab were performed in subjects who developed symptoms of respiratory infections for the detection of eight viral antigens by MariPOC ®.

Results: Mean age of subjects was 78.5 ± 8.8 years, of which 73.2% were female. Baseline vitamin D level in the majority of residents showed a very severe (< 12.5 nmol/L) or severe ($12.5-24$ nmol/L) degree of vitamin D deficiency . After randomisation, standard vitamin D supplementation was taken by 41 subjects. Vitamin D supplementation increased serum vitamin D levels at three months, but these values did not reach normal (> 75 ng/L) in any of the subjects. Subjects who had increased vitamin D concentrations were significantly older, had higher clinical cerebrovascular disease and fewer autoimmune diseases. Out of 23 subjects with respiratory problems, all had a diagnosis of lower respiratory tract infection. Seventeen subjects

had a type A influenza, while none of the other viruses had been shown during the study. Subjects with influenza had significantly higher deaths as well as heart failure, significantly lower vitamin D concentrations at the beginning and end of the study and were taking more prescription drugs for chronic problems. Vitamin D supplementation did not affect the incidence of infection. Measurement of anti-CMV IgG was not an adequate surrogate of immunosenescence in assessing the effect of tested sociodemographic variables or incidence and clinical evidence of respiratory infection with influenza virus in the elderly.

Conclusion: Vitamin D supplementation at 800 IU p.o. to nursing home residents $\geq$ 65 years of age over three months did not affect the incidence, type and clinical presentation of viral respiratory infections. Given the known effects of vitamin D on the various components of the immune system in humans, the optimal dose of this vitamin in preventing infections should also be considered as part of a key defence mechanism against this infection.

10. LITERATURA

1. Prince MJ, Wu F, Guo Y, Gutierrez Robledo LM, O'Donnell M, Sullivan R, i sur. The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *Lancet*. 2015; 385(9967):549-62.
2. Rattan SI. Aging is not a disease: implications for intervention. *Aging Dis*. 2014;5(3):196-202.
3. Dziechciaż M, Filip R. Biological psychological and social determinants of old age: bio-psycho-social aspects of human aging. *Ann Agric Environ Med*. 2014;21(4):835-8.
4. Sholl J. The sciences of healthy aging await a theory of health. *Biogerontology*. Biogerontology. 2020 Mar 19. doi: 10.1007/s10522-020-09872-0. [Epub ahead of print]
5. Singh PP, Demmitt BA, Nath RD, Brunet A. The Genetics of Aging: A Vertebrate Perspective. *Cell*. 2019;177(1): 200–20.
6. Johnson AA, Stolzing A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. *Aging Cell*. 2019 Dec;18(6):e13048. doi: 10.1111/acer.13048
7. Frishman WH. Ten Secrets to a Long Life. *Am J Med*. 2019;132(5):564-6.
8. Daskalopoulou C, Stubbs B, Kralj C, Koukounari A, Prince M, Prina AM. Associations of smoking and alcohol consumption with healthy ageing: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMJ Open*. 2018 Apr 17;8(4):e019540. doi: 10.1136/bmjopen-2017-019540
9. Bertozzi B, Tosti V, Fontana L. Beyond Calories: An Integrated Approach to Promote Health, Longevity, and Well-Being. *Gerontology*. 2017;63(1):13-9.
10. Kornadt AE, Kandler C. Genetic and environmental sources of individual differences in views on aging. *Psychol Aging*. 2017;32(4):388-99.
11. da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev*. 2016;29:90-112.
12. Gladyshev VN. Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes. *Aging Cell*. 2016(4);15:594-602.

13. Koltover VK. Free Radical Timer of Aging: from Chemistry of Free Radicals to Systems Theory of Reliability. *Curr Aging Sci.* 2017;10(1):12-17.
14. Ogrodnik M, Salmonowicz H, Gladyshev VN. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells. *Aging Cell.* 2019 Feb;18(1):e12841. doi: 10.1111/acer.12841
15. Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci.* 2018 Jul 5;12:464. doi: 10.3389/fnins.2018.00464
16. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, i sur. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2019 Sep 25;10:2247. doi: 10.3389/fimmu.2019.02247
17. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244-54.
18. Flynn MG, Markofski MM, Carrillo AE. Elevated Inflammatory Status and Increased Risk of Chronic Disease in Chronological Aging: Inflamm-aging or Inflamm-inactivity? *Aging Dis.* 2019;10(1):147-56.
19. Del Giudice G, Goronzy JJ, Grubeck-Loebenstein B, Lambert PH, Mrkvan T, Stoddard JJ, Doherty TM. Fighting against a protean enemy: immunosenescence, vaccines, and healthy aging. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017 Dec 21;4:1. doi: 10.1038/s41514-017-0020-0
20. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res.* 2011;157(2):175-9.
21. Johnstone J, Parsons R, Botelho F, Millar J, McNeil S, Fulop T, i sur. Immune biomarkers predictive of respiratory viral infection in elderly nursing home residents. *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(9):e108481. doi: 10.1371/journal.pone.0108481
22. Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhaney JE. *Front Immunol.* 2017 Jul 17;8:784. doi: 10.3389/fimmu.2017.00784

23. Dilman VM, Revskoy SY, Golubev AG. Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging. *Int Rev Neurobiol.* 1986;28:89-156.
24. Bradford S, Ramsetty A, Bragg S, Bain J. Endocrine Conditions in Older Adults: Anti-Aging Therapies. *FP Essent.* 2018;474:33-8.
25. Kiely KM, Brady B, Byles J. Gender, mental health and ageing. *Maturitas.* 2019;129:76-84.
26. Zavod za javno zdravstvo Varaždinske županije. Svjetski dan zdravlja 2012. - Osnovni pojmovi o starenju. Irena Stipešević Rakamarić. [Internet]; 2012 [pristupljeno 15.12.2019.]. Dostupno na: <http://www.zzzzzv.hr/?gid=2&aid=165>
27. Nejašmić I, Toskić A. Starenje stanovništva u Hrvatskoj—sadašnje stanje i perspektive. *Hrvatski geografski glasnik* [Internet]. 2013 [pristupljeno 11.01.2020.];75.(1.):89-110. <https://doi.org/10.21861/HGG.2013.75.01.05>
28. Akrap A. Demografski slom Hrvatske: Hrvatska do 2051. *Bogoslovska smotra* [Internet]. 2015 [pristupljeno 11.01.2020.];85(3):855-868. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/148000>
29. Jagger C, Gillies C, Moscone F, Cambois E, Van Oyen H, Nusselder W, i sur. Inequalities in healthy life years in the 25 countries of the European Union in 2005: a cross-national meta-regression analysis. *Lancet.* 2008;372(9656):2124–31.
30. Motta M, Ferlito L, Magnolfi SU, Petruzzi E, Pinzani P, Malentacchi F, i sur. Cognitive and functional status in the extreme longevity. *Arch Gerontol Geriatr.* 2008;46(2):245-52.
31. Bađun M. Financiranje domova za starije i nemoćne osobe u Hrvatskoj. *Revija za socijalnu politiku* [Internet]. 2017 [pristupljeno 11.01.2020.];24(1):19-42. <https://doi.org/10.3935/rsp.v24i1.1370> Rev soc polit 2017;1:19-43.
32. Godan, Ljiljana. Kvaliteta života osoba treće životne dobi i osoba koje o njima brinu [magistarski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2006.
33. Laklija M, Rusac S, Žganec N. Trendovi u skrbi za osobe starije životne dobi u Republici Hrvatskoj i u zemljama Europske Unije. *Revija za socijalnu*

- politiku [Internet]. 2008 [pristupljeno 13.01.2020.];15(2):171-188. <https://doi.org/10.3935/rsp.v15i2.743>
34. Buchner DM, Wagner EH. Preventing frail health. *Clin Geriatr Med*. 1992;8(1):1-17.
35. Proietti M, Cesari M. Frailty: What Is It? *Adv Exp Med Biol*. 2020;1216:1-7.
36. Fried LP, Tangen CM, Walston J i sur. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(3):M146–56.
37. García-García FJ, Carcaillon L, Fernandez-Tresguerres J, Alfaro A, Larrion JL, Castillo C, i sur. A new operational definition of frailty: the frailty trait scale. *J Am Med Dir Assoc*. 2014 May;15(5):371.e7-371.e13. doi: 10.1016/j.jamda.2014.01.004
38. Romero-Ortuno R, Walsh CD, Lawlor BA, Kenny RA. A frailty instrument for primary care: findings from the survey of health, ageing and retirement in Europe (SHARE). *BMC Geriatr*. 2010 Aug 24;10:57. doi: 10.1186/1471-2318-10-57
39. Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I, Mitnitski A. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ*. 2005;173(5):489-95.
40. Morley JE. Developing novel therapeutic approaches to frailty. *Curr Pharm Des*. 2009;15(29):3384–95.
41. Vellas B, Balardy L, Gillette-Guyonnet S, Abellan Van Kan G, Ghisolfi-Marque A, Subra J, i sur. Looking for frailty in community-dwelling older persons: the G rontop le Frailty Screening Tool (GFST). *J Nutr Health Aging* 2013;17(7):629–31.
42. Rockwood K, Mitnitski A. Frailty defined by deficit accumulation and geriatric medicine defined by frailty. *Clin Geriatr Med* 2011;27(1):17-26.
43. Norman DC. Clinical Features of Infection in Older Adults. *Clin Geriatr Med*. 2016;32(3):433-41.
44. Falsey AR, Dallal GE, Formica MA, Andolina GG, Hamer DH, Leka LL, Meydani SN. Long-term care facilities: a cornucopia of viral pathogens. *J Am Geriatr Soc*. 2008;56(7):1281-5.
45. Childs A, Zullo AR, Joyce NR, McConeghy KW, van Aalst R, Moyo P, i sur. The burden of respiratory infections among older adults in long-term care: a

- systematic review. *BMC Geriatr.* 2019 Aug 5;19(1):210. doi: 10.1186/s12877-019-1236-6
46. Talbot HK, Falsey AR. The diagnosis of viral respiratory diseases in older adults. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):747-51.
47. Utsumi M, Makimoto K, Quroshi N, Ashida N. Types of infectious outbreaks and their impact in elderly care facilities: a review of the literature. *Age Ageing.* 2010;39(3):299-305.
48. Lee MH, Lee GA, Lee SH, Park YH. A systematic review on the causes of the transmission and control measures of outbreaks in long-term care facilities: Back to basics of infection control. *PLoS One.* 2020 Mar 10;15(3):e0229911. doi: 10.1371/journal.pone.0229911
49. Modrow S. Laboratory Methods for Detecting Viral Infections. U: Modrow S, Falke D, Truyen U, Schatzl H, ur. *Molecular virology.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013, str. 163-81.
50. Basile K, Kok J, Dwyer DE. Point-of-care diagnostics for respiratory viral infections. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(1):75-83.
51. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivković-Jureković I, Čepin-Bogović J, Gagro A, Vraneš J. Etiology and clinical characteristics of single and multiple respiratory virus infections diagnosed in Croatian children in two respiratory seasons. *J Pathog.* 2016;2016:2168780. doi: 10.1155/2016/2168780
52. Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Lara-Oya A, Pedrosa-Corral I, Riazzi-Damas C, Navarro-Marí JM. Analytical performance of the automated multianalyte point-of-care mariPOC® for the detection of respiratory viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83(3):252-6.
53. Gunell M, Antikainen P, Porjo N, Irjala K, Vakkila J, Hotakainen K, i sur. Comprehensive real-time epidemiological data from respiratory infections in Finland between 2010 and 2014 obtained from an automated and multianalyte mariPOC® respiratory pathogen test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(3):405-13.
54. Ciabattini A, Nardini C, Santoro F, Garagnani P, Franceschi C, Medagliani D. Vaccination in the elderly: The challenge of immune changes with aging. *Semin Immunol.* 2018;40:83-94.

55. Boraschi D, Italiani P. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly: strategies for improving response. *Immunol Lett.* 2014;162(1 Pt B):346-53.
56. Henry C, Zheng NY, Huang M, Cabanov A, Rojas KT, Kaur K, i sur. Influenza Virus Vaccination Elicits Poorly Adapted B Cell Responses in Elderly Individuals. *Cell Host Microbe.* 2019;25(3):357-66.
57. Dastani Z, Li R, Richards B. Genetic regulation of vitamin D levels. *Calcif Tissue Int.* 2013;92(2):106-17.
58. Ryan JW, Anderson PH, Morris HA. Pleiotropic Activities of Vitamin D Receptors - Adequate Activation for Multiple Health Outcomes. *Clin Biochem Rev* 2015;36(2):53-61.
59. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, i sur. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009;20(11):1807-20.
60. Laktasic Zerjavic N, Korsic M, Crncevic Orlic Z, Kovac Z, Polasek O, Soldo Juresa D. Vitamin D status, dependence on age and seasonal variations in the concentration of vitamin D in Croatian postmenopausal women initially screened for osteoporosis. *Clin Rheumatol.* 2010;29(8):861–7.
61. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, Wiese R, DeLuca HF. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics.* 1991;11(1):168-73.
62. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013;5(7):2502-21.
63. Jolliffe DA, Walton RT, Griffiths CJ, Martineau AR. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: review of genetic association studies. *J Steroid Biochem Mol Biol J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;164:18-29.
64. Szymczak I, Pawliczak R. The active metabolite of vitamin D3 as a potential immunomodulator. *Scand J Immunol.* 2016;83(2):83-91.
65. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients.* 2015;7(10):8251-60.

66. Timpini A, Pini L, Tantucci C, Cossi S, Grassi V. Vitamin D and health status in elderly. *Intern Emerg Med*. 2011;6(1):11-21.
67. Bruyere O, Decock C, Delhez M, Collette J, Reginster JY. Highest prevalence of vitamin D inadequacy in institutionalized women compared with noninstitutionalized women: a case-control study. *Womens Health (Lond Engl)* 2009;5(1):49-54.
68. Rolland Y, de Souto Barreto P, Abellan Van Kan G, Annweiler C, Beauchet O, Bischoff-Ferrari H, i sur. Vitamin D supplementation in older adults: searching for specific guidelines in nursing homes. *J Nutr Health Aging*. 2013;17(1):402-12.
69. ter Borg S, Verlaan S, Hemsworth J, Mijnders DM, Schols JM, Luiking YC, de Groot LC. Micronutrient intakes and potential inadequacies of community-dwelling older adults: a systematic review. *Br J Nutr* 2015;113(8):1195-206.
70. Vranešić Bender D, Krznarić Ž, Reiner Ž, Roksandić Tomek S, Duraković Z, Kaić-Rak A, i sur. Hrvatske smjernice za prehranu osoba starije dobi, dio I. Liječnički vjesnik [Internet]. 2011 [pristupljeno 17.04.2020.];133(7-8):0-0. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/171834>
71. Esposito S, Lelii M. Vitamin D and respiratory tract infections in childhood. *BMC Infect Dis*. 2015 Oct 28;15:487. doi: 10.1186/s12879-015-1196-1
72. Greiller CL, Martineau AR. Modulation of the immune response to respiratory viruses by vitamin D. *Nutrients*. 2015;7(6):4240-70.
73. Sabetta JR, DePetrillo P, Cipriani RJ, Smardin J, Burns LA, Landry ML. Serum 25-hydroxy vitamin D and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. *PLoS One*. 2010 Jun 14;5(6):e11088. doi: 10.1371/journal.pone.0011088
74. Robertsen S, Grimnes G, Melbye H. Association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and symptoms of respiratory tract infection in a Norwegian population: the Tromsø Study. *Public Health Nutr*. 2014;17(4):780-6.
75. Monlezun DJ, Bittner EA, Christopher KB, Camargo CA, Quraishi SA. Vitamin D status and acute respiratory infection: cross sectional results from

- the United States National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2006. *Nutrients*. 2015;7(3):1933-44.
76. Mao S, Huang S. Vitamin D supplementation and risk of respiratory tract infections: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Infect Dis*. 2013;45(9):696-702.
77. Charan J, Goyal JP, Saxena D, Yadav P. Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012;3(4):300-3.
78. Bergman P, Lindh AU, Björkhem-Bergman L, Lindh JD. Vitamin D and respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2013 Jun 19;8(6):e65835. doi: 10.1371/journal.pone.0065835
79. Aloia JF, Islam S, Mikhail M. Vitamin D and Acute Respiratory Infections- The PODA Trial. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Sep 4;6(9):ofz228. doi: 10.1093/ofid/ofz228. eCollection 2019 Sep
80. Ryan JW, Anderson PH, Morris HA. Pleiotropic activities of vitamin D receptors - adequate activation for multiple health outcomes. *Clin Biochem Rev* 2015;36(2):53-61.
81. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, i sur. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-30
82. 2013 Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Dostupno na: <http://nof.org/files/nof/public/content/resource/913/files/580.pdf>. Datum pristupa: 14. 4. 2020.
83. Smith LM, Gallagher JC. Dietary Vitamin D Intake for the Elderly Population: Update on the Recommended Dietary Allowance for Vitamin D. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(4):871-84.
84. Dawson-Hughes B1, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GE, Josse RG, i sur. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int*. 2010;21(7):1151-4.
85. American Geriatrics Society Workgroup on Vitamin D Supplementation for Older Adults. Recommendations abstracted from the American Geriatrics

- Society Consensus Statement on vitamin D for Prevention of Falls and Their Consequences. *J Am Geriatr Soc.* 2014;62(1):147-52.
86. Bouillon I. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(8):466-79.
87. Papapetrou PD, Triantafyllopoulou M, Korakovouni A. Severe vitamin D deficiency in the institutionalized elderly. *J Endocrinol Invest.* 2008;31(9):784-7.
88. Schilling S. Epidemic vitamin D deficiency among patients in an elderly care rehabilitation facility. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(3):33-8.
89. Boettger SF, Angersbach B, Klimek CN, Wanderley ALM, Shaibekov A, Sieske L, i sur. Prevalence and predictors of vitamin D-deficiency in frail older hospitalized patients. *BMC Geriatr.* 2018 Sep 20;18(1):219. doi: 10.1186/s12877-018-0919-8
90. Adams JS, Hewison M. Update in Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2010;95(2):471–8.
91. Schramm S, Lahner H, Jockel KH, Erbel R, Fuhrer D, Moebus S, Heinz Nixdorf Recall Study Group. Impact of season and different vitamin D thresholds on prevalence of vitamin D deficiency in epidemiological cohorts- a note of caution. *Endocrine.* 2017;56(3):658–66.
92. Buckinx F, Reginster JY, Cavalier E, Petermans J, Ricour C, Dardenne C, Bruyère O. Determinants of vitamin D supplementation prescription in nursing homes: a survey among general practitioners. *Osteoporos Int.* 2016;27(3):881-6.
93. Curtain CM, Williams M, Cousins JM, Peterson GM, Winzenberg T. Vitamin D Supplementation in Tasmanian nursing home residents. *Drugs Aging.* 2016;33(10):747-54.
94. Wijnen H, Salemink D, Roovers L, Taekema D, de Boer H. Vitamin D supplementation in nursing home patients: randomized controlled trial of standard daily dose versus individualized loading dose regimen. *Drugs Aging.* 2015;32(5):371-8.
95. Toren-Wielema M, Veenhuizen R, Kappelle JW, Veeger N, van Roon E. Efficacy of a standardized oral vitamin D dosing regimen in nursing home residents. *Drugs Aging* 2018;35(12):1079-87.

96. Veleva BI, Chel VG, Achterberg WP. Efficacy of daily 800 IU vitamin D supplementation in reaching vitamin D sufficiency in nursing home residents: cross-sectional patient file study. *BMC Geriatr*. 2014 Sep 19;14:103. doi: 10.1186/1471-2318-14-103
97. Ross C, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Washington: National Academies Press; 2011.
98. Veugeliers PJ, Ekwaru JP. A statistical error in the estimation of the recommended dietary allowance for vitamin D. *Nutrients*. 2014 Oct 20;6(10):4472-5. doi: 10.3390/nu6104472
99. Vasquez A, Pizzorno J. Concerns About The Integrity of The Scientific Research Process—Focus On Recent Negative Publications Regarding Nutrition, Multivitamins, Fish Oil And Cardiovascular Disease. *Integr Med (Encinitas)* 2019;18(1):8–15.
100. Tripkovic L1, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, i sur. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(6):1357-64.
101. Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018;6(11):847-58.
102. Lips D, Bilezikian JP, Bouillon R. Vitamin D: Give to Those Who Need it. *JBMR Plus*. 2019 Nov 14;4(1):e10232. doi: 10.1002/jbm4.10232
103. Bischoff-Ferrari HA. Should vitamin D administration for fracture prevention be continued? : A discussion of recent meta-analysis findings. *Z Gerontol Geriatr* 2019;52(5):428-32.
104. Garland CF, Kim JJ, Mohr SB, Gorham ED, Grant WB, Giovannucci EL, i sur. Meta-analysis of all-cause mortality according to serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Public Health*. 2014;104:e43-e50.
105. Scragg RKR. Overview of results from the Vitamin D Assessment (ViDA) study. *J Endocrinol Invest*. 2019;42(12):1391-9.

106. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, i sur. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2019;380(1):33-44.
107. Jorde R, Sollid ST, Svartberg J, Joakimsen RM, Grimnes G, Hutchinson MY. Prevention of urinary tract infections with vitamin D supplementation 20,000 IU per week for five years. Results from an RCT including 511 subjects. *Infect Dis (Lond)* 2016;48(11-12):823-8.
108. Wagner D, Hanwell HE, Schnabl K, Yazdanpanah M, Kimball S, Fu L, i sur. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D(3) to 25-hydroxyvitamin D(3) is predictive of 25-hydroxyvitamin D(3) response to vitamin D(3) supplementation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;126(3-5):72–7.
109. Fu L, Yun F, Oczak M, Wong BY, Vieth R, Cole DE. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clin Biochem*. 2009;42(10-11):1174–7.
110. Blum M, Dallal GE, Dawson-Hughes B. Body size and serum 25 hydroxy vitamin D response to oral supplements in healthy older adults. *J Am Coll Nutr*. 2008;27(2):274–9.
111. Zhou Y, Zhao LJ, Xu X, Ye A, Travers-Gustafson D, Zhou B, i sur. DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt A:207-14.
112. Goncalves-Mendes N, Talvas J, Dualé C, Guttman A, Corbin V, Marceau G, i sur. Impact of Vitamin D Supplementation on Influenza Vaccine Response and Immune Functions in Deficient Elderly Persons: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Front Immunol*. 2019 Feb 8;10:65. doi: 10.3389/fimmu.2019.00065
113. Lee MD, Lin CH, Lei WT, Chang HY, Lee HC, Yeung CY, i sur. Does Vitamin D Deficiency Affect the Immunogenic Responses to Influenza Vaccination? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2018 Mar 26;10(4). pii: E409. doi: 10.3390/nu10040409
114. Kodama F, Nace DA, Jump RLP. Respiratory Syncytial Virus and Other Noninfluenza Respiratory Viruses in Older Adults. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31(4):767-90.

115. Ivaska L, Niemelä J, Heikkinen T, Vuorinen T, Peltola V. Identification of respiratory viruses with a novel point-of-care multianalyte antigen detection test in children with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2013;57(2):136-40.
116. Bruning AHL, de Kruijf WB, van Weert HCPM, Willems WLM, de Jong MD, Pajkrt D, i sur. Diagnostic performance and clinical feasibility of a point-of-care test for respiratory viral infections in primary health care. *Fam Pract.* 2017;34(5):558-63.
117. Tete SM, Jul-Larsen Å, Rostami S, Lunde THF, Sølund H, Krammer F, Cox RJ. Impact of pre-existing immunity on the induction of functional cross-reactive anti-hemagglutinin stalk antibodies following vaccination with an AS03 adjuvanted pandemic H1N1 vaccine. *Vaccine.* 2018;36(6):2213-9.
118. Lee J, Paparoditis P, Horton AP, Frühwirth A, McDaniel JR, Jung J, i sur. Persistent Antibody Clonotypes Dominate the Serum Response to Influenza over Multiple Years and Repeated Vaccinations. *Cell Host Microbe.* 2019;25(3):367-76.
119. Civljak R, Tot T, Falsey AR, Huljev E, Vranes J, Ljubin-Sternak S. Viral pathogens associated with acute respiratory illness in hospitalized adults and elderly from Zagreb, Croatia, 2016 to 2018. *J Med Virol.* 2019;91(7):1202-9.
120. Civljak R, Kosutic-Gulija T, Slovic A, Huljev E, Turcic N, Mestrovic T, i sur. An Outbreak of Human Parainfluenza Virus 3 (Phylogenetic Subcluster C5) Infection among Adults at a Residential Care Facility for the Disabled in Croatia, 2018. *Intervirology.* 2019 Oct 29:1-8. doi: 10.1159/000503630. [Epub ahead of print]
121. Martineau AR, Hanifa Y, Witt KD, Barnes NC, Hooper RL, Patel M, i sur. Double-blind randomised controlled trial of vitamin D3 supplementation for the prevention of acute respiratory infection in older adults and their carers (ViDiFlu). *Thorax.* 2015;70(10):953-60.
122. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, i sur. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ.* 2017 Feb 15;356:i6583. doi: 10.1136/bmj.i6583

123. Ginde AA, Blatchford P, Breese K, Zarrabi L, Linnebur SA, Wallace JI, i sur.. High-Dose Monthly Vitamin D for Prevention of Acute Respiratory Infection in Older Long-Term Care Residents: A Randomized Clinical Trial. *J Am Geriatr Soc.* 2017;65(3):496-503.
124. Johnstone J, Parsons R, Botelho F, Millar J, McNeil S, Fulop T, i sur. Immune biomarkers predictive of respiratory viral infection in elderly nursing home residents. *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(9):e108481. doi: 10.1371/journal.pone.0108481
125. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients* 2015;7(10):8251-60.

11. ŽIVOTOPIS

Ana Godan Hauptman rođena je 18.07.1983.g. u Zagrebu gdje je 2001. g. završila Školu za medicinske sestre, a 2007. godine diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2007. g. zaposlena je u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb, prvo kao stažistica, potom od 2009. g. kao specijalizantica interne medicine. Specijalistički ispit iz interne medicine položila je 2013. godine, te je do 2019. godine radila u Zavodu za intenzivnu medicinu, Klinika za internu medicinu, KBC Zagreb.. Užu specijalizaciju iz intenzivne medicine završila je u KBC Zagreb 2017. godine. Od 2019. godine radi na Zavodu za bolesti metabolizma, Klinika za internu medicinu, KBC Zagreb. Također je 2006.g završila edukaciju za PR managera na Pučkom otvorenom učilištu u Zagrebu. Uspješno je završila „Tečaj iz osnova medicinske akupunkture“, te stekla stručnu osposobljenost za primjenu akupunkture u rujnu 2021.godine.

Autor je i koautor 5 stručnih i znanstvenih radova, te ima više aktivnih sudjelovanja s kongresnim priopćenjima na domaćim i međunarodnim skupovima. Područja njenog stručnog interesa su interna medicina, intenzivno liječenje, rijetke metaboličke bolesti i infekcije u starijih osoba. Udana je i majka jedne kćeri.