

# Prediktivni značaj određivanja koncentracije vitamina D u bolesnika s rakom debelog crijeva

---

**Antunac Golubić, Zrna**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

*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:105:060470>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Zrna Antunac Golubić**

**Prediktivni značaj određivanja koncentracije  
vitamina D u bolesnika s rakom debeloga  
crijeva**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2020.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Zrna Antunac Golubić**

**Prediktivni značaj određivanja koncentracije  
vitamina D u bolesnika s rakom debeloga  
crijeva**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Klinici za onkologiju, KBC-a Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: Molekularni biljezi u solidnim tumorima – Prediktivni i prognostički značaj, br. 108-1080058-0047.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Stjepko Pleština, specijalist interne medicine, uži specijalist internističke onkologije

## ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru prof.dr.sc. Stjepku Pleštini na pomoći oko planiranja istraživanja, provođenja kliničkog ispitivanja i stvaranja ove disertacije.

Također, zahvaljujem se svim kolegama koji su surađivali tijekom provođenja istraživanja, osobito ing.Ivani Baršić.

Rad posvećujem svojoj obitelji bez čije podrške i pomoći ne bih uspjela.

## POPIS KRATICA

NSAR – nesteroidni protuupalni lijekovi  
HNL – hormonsko nadomjesno liječenje  
FAP – familijarna adenomatozna polipoza  
SAD – Sjedinjene Američke Države  
BMI – indeks tjelesne mase  
25(OH)D – 25-hidroksivitamin D  
1,25(OH)2D – 1,25-dihidroksivitamin D  
UV – ultraljubičasto  
CYP – citokrom P  
PTH – paratiroidni hormon  
RIA – radioimunološka metoda  
HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti  
LC-MS-MS – tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa  
RXR – X-receptor retinoične kiseline  
ij – internacionalna jedinica  
DNK – deoksiribonukleinska kiselina  
mRNK – glasnička ribonukleinska kiselina  
VDR – vitamin D receptor  
VDRE- element odgovora na vitamin D  
CDK- kinaza ovisna o ciklinima  
EGF – endotelni čimbenik rasta  
EGFR -receptor endotelnog čimbenika rasta  
EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija  
VEGF – žilnoendotelni čimbenik rasta  
CAMP – kateholicidin antimikrobni peptid  
NF $\kappa$ B – nuklearni čimbenik kappa B  
I $\kappa$ B – inhibitor nuklearnog čimbenika kappa B  
CaSR – receptor osjetljiv na kalcij  
TS – timidilat sintetaza  
5-FU – 5-fluorouracil  
g – gram  
Ca – kalcij  
PO<sub>4</sub> – fosfati  
AP – alkalna fosfataza  
OS- ukupno preživljenje  
PFS- vrijeme do progresije bolesti

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I SVRHA RADA</b> .....	<b>1</b>
1.1. Epidemiologija raka debelog crijeva .....	2
1.2. Etiologija raka debelog crijeva .....	3
1.2.1. Nasljedni čimbenici .....	3
1.2.2. Ostali čimbenici .....	4
1.2.2.1. Prehrana, debljina i životne navike .....	4
1.2.2.2. Lijekovi .....	7
1.3. Terapija metastatskog raka debelog crijeva .....	8
1.4. Vitamin D .....	10
1.4.1. Procjena statusa D vitamina u organizmu .....	14
1.4.2. Insuficijencija, deficijencija i toksičnost vitamina D .....	14
1.4.3. Preporuke o dnevnom unosu vitamina D u odrasloj populaciji ...	16
1.4.4. Vitamin D i rak debelog crijeva .....	17
1.4.4.1. Protutumorsko djelovanje vitamina D <i>in vitro</i> .....	18
1.4.4.2 VDR i rak debelog crijeva .....	24
1.4.4.3. Analози vitamina D .....	27
1.4.4.4. Vitamin D i kemoterapija .....	28
1.4.4.5. Djelovanje vitamina D <i>in vivo</i> .....	29
1.4.5. Epidemiološka i klinička istraživanja .....	29
1.4.5.1. Vitamin D i incidencija raka debelog crijeva .....	30
1.4.5.2. Vitamin D i prognoza raka debelog crijeva .....	32
1.5. Svrha istraživanja .....	36
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>38</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>39</b>
3.1. Opći cilj .....	39
3.2. Specifični ciljevi .....	39
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>40</b>
4.1. Ispitanici .....	40
4.2. Materijali i metode .....	41
4.2.1. Mjerenje serumske koncentracije 25(OH)D.....	41
4.3. Statistička analiza .....	43
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>44</b>
<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>53</b>
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>59</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>60</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>61</b>
<b>10. LITERATURA</b> .....	<b>62</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>79</b>

## 1.UVOD I SVRHA RADA

Rak debelog crijeva je drugo najčešće sjelo raka te je među vodećim uzrocima smrti oboljelih od raka (1). Oko dvije trećine slučajeva javlja se u ekonomski razvijenim zemljama. Incidencija raka debelog crijeva je bila u porastu do 1985. godine kada se bilježi kontinuirani pad incidencije. Uzrok tome nije u potpunosti jasan, ali se povezuje sa smanjenjem pušenja, povećanom upotrebom nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAR) te hormonskog nadomjesnog liječenja (HNL) (2–4). Metode probira, kao što je kolonoskopija ili rektosigmoidoskopija, omogućavaju ranije otkrivanje i liječenje premalignih lezija te sprječavaju pojavu raka debelog crijeva (5). Unatoč zapaženom smanjenu incidencije u ukupnoj populaciji, zapažen je porast incidencije raka debelog crijeva u bolesnika mlađih od 50 godina (4). U svijetu se prati i značajan pad mortaliteta od zloćudnih bolesti pa tako i od raka debelog crijeva, ali uz veliku razliku među zemljama. I u Hrvatskoj je zabilježen pad mortaliteta od raka debelog crijeva, ali još uvijek nedovoljan (6). Uzrok nastanka raka debelog crijeva je nepoznat. Samo 10 % slučajeva je nasljedno, a ostali su sporadični (7). Poznati su mnogi rizični čimbenici za pojavu raka debelog crijeva te se mnogo ulaže u prevenciju i rano otkrivanje raka debelog crijeva. Kirurgija je jedina kurativna metoda liječenja. Oko 50 % bolesnika se izliječi operacijom što znači da će u polovice bolesnika bolest progredirati te neće biti izlječiva (8). U gotovo jedne trećine bolesnika se rak debelog crijeva otkrije u uznapredovaloj fazi bolesti (9). Ipak, i tu je zahvaljujući brzom napretku i pojavi novih terapijskih opcija postignut značajan uspjeh, ali uz značajan financijski teret i ograničenu dostupnost. U posljednjih dvadeset godina preživljenje bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva je dvostruko duže te bolesnici žive oko 3 godine (10). Osim poboljšanja



prevencije i ranog otkrivanja raka debelog crijeva, bolje poznavanje prediktivnih i prognostičkih čimbenika omogućilo bi učinkovitiju primjenu dostupnih lijekova kao i primjenu novih.

## 1.1 Epidemiologija raka debelog crijeva

Rak debelog crijeva je treće najčešće sjelo karcinoma i čini 10 posto svih solidnih tumora u svijetu. Nešto je češći u muškaraca nego u žena te je u Europi četvrti uzrok smrti od karcinoma. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je drugi, a prema podacima Registra za rak drugi je uzrok smrti od raka i u Hrvatskoj (1,11). Kao što je u uvodu navedeno, u zemljama s povijesno visokom incidencijom raka debelog crijeva do 1985. godine pojavnost raka debelog crijeva je rasla, nakon čega se prati stabilizacija (npr. Zapadna Europa) ili postupni pad (npr. SAD, Kanada). Razlozi navedenog trenda nisu u potpunosti jasni, ali uz potencijalne razloge navedene u uvodu, intenzivnije provođenje kolonoskopije kod bolesnika starijih od 50 godina vjerojatno je pridonijela ovom trendu. U zemljama s povijesno niskom incidencijom raka debelog crijeva prati se porast incidencije (12). U Hrvatskoj je prema podacima Registra za rak u 2017. godini bilo 3659 novooboljelih od raka debelog crijeva, od toga je bilo 2143 muškaraca te 1516 žena. U istoj godini od raka debelog crijeva umrlo je 2027 ljudi (858 žena te 1169 muškarca) (1). Na pojavnost raka debelog crijeva najviše utječe dob, osobito nakon 45. do 50. godine života.

Retrospektivne studije su, međutim, pokazale porast incidencije u osoba mlađih od 50 godina. Procjenjuje se da će incidencija u populaciji od 20 do 34 godine do 2030. godine porasti za više od 100 posto (13). Razlozi ovakvog trenda nisu još razjašnjeni. Pretpostavlja se, iako za

sada bez čvrstih dokaza, da se rak debelog crijeva kod mlađe populacije razlikuje od onog u starijoj i po svom biološkom ponašanju, što bi zahtijevalo i drukčiji pristup liječenju (14).

## 1.2. Etiologija raka debelog crijeva

### 1.2.1 Nasljedni čimbenici

Većina slučajeva raka debelog crijeva je sporadična, samo 10 posto slučajeva uzrokovano je jasno definiranim genetskim nasljednim sindromima kao što su sindrom Lynch i familijarna adenomatozna polipoza (FAP) (7,15,16) .

Međutim, nasljeđe predstavlja važnu ulogu u pojavi sporadičnog raka debelog crijeva pri čemu pozitivna obiteljska anamneza nosi povećan rizik za razvoj raka debelog crijeva tijekom cijelog života. Način na koji se bolest pojavljuje u obitelji određuje i razinu rizika. Otprilike 20 posto slučajeva raka debelog crijeva vezano je uz obiteljsko nasljeđe. Pojava bolesti u obitelji, kao i pojava premalignih lezija pridonosi povećanom riziku sporadičnog raka debelog crijeva, a ovisi o učestalosti u prvom i drugom koljenu te o dobi u kojoj se pojavljuje. Pojava raka debelog crijeva kod samo jednog člana rodbine u prvom koljenu dvostruko povećava rizik za pojavu bolesti (17–19). Iako postoji jasna genetska predispozicija za rak debelog crijeva, penetrantnost gena je vrlo varijabilna i pod utjecajem je okolišnih čimbenika (20). Utjecaj okolišnih čimbenika na samu genetsku predispoziciju nije pak do kraja razjašnjen, ali bi genski polimorfizmi mogli imati važnu ulogu. Budući da se genski polimorfizmi razlikuju među rasama i etničkim skupinama, time bi se mogla objasniti različita pojavnost raka debelog crijeva u određenim dijelovima svijeta (21–24).

### 1.2.2. Ostali čimbenici

Teško je objektivno procijeniti učinak okolišnih čimbenika na pojavu bolesti, no njihov učinak je važan, što se vidi iz opažanja da sklonost oboljevanju od raka debelog crijeva brzo raste u ljudi koji migriraju iz zemalja s niskom incidencijom u one s visokom (25). Važnost okolišnih čimbenika često je podcijenjena te su potrebne velike epidemiološke studije da bi se ispitala uloga okolišnih čimbenika na pojavu određene bolesti. Nasljedni čimbenici se ne mogu mijenjati, ali dobrim poznavanjem učinka okoliša na pojavu raka i modifikacijom čimbenika iz okoline može se smanjiti rizik za razvoj određene bolesti. Prema novijim saznanjima temeljenima na velikim populacijskim studijama kao što je *Women's Health Initiative* identificirano je jedanaest čimbenika koji utječu na rizik od raka debelog crijeva te tri čimbenika koji utječu na rizik od raka rektuma, a za koje se prije smatralo da nemaju nikakav utjecaj (26). I određeni komorbiditeti mogu utjecati na rizik od pojave bolesti pa tako oboljeli od upalnih bolesti crijeva (Crohnova bolest, ulcerozni kolitis) imaju veći rizik od raka debelog crijeva.

#### 1.2.2.1. Prehrana, debljina i životne navike

Prehrana i posljedično tome debljina već se dugo povezuju s mnogim bolestima pa tako i zloćudnima, što ne iznenađuje s obzirom na pandemiju pretilosti u svijetu. Visok indeks tjelesne mase (BMI), kao najčešće korištena mjera za debljinu, prema istraživanjima je u većoj ili manjoj mjeri rizični čimbenik za razvoj zloćudnih bolesti. Najsnažnije se povezuje s

karcinomom jednjaka u oba spola dok se za ostala sijela povezanost razlikuje među spolom i etničkim grupama. Kod muškaraca je BMI snažno povezan s rakom jednjaka, štitnjače, bubrega i debelog crijeva. Kod žena se povezuje s rakom jednjaka, endometrija, bubrega, žučnjaka, dojke kod žena u menopauzi, a u manjoj mjeri povećava i rizik od raka debelog crijeva, ali ne i rektuma. Međutim, utjecaj dobivanja na težini i vremenskog razdoblja na povećanje rizika od raka debelog crijeva nisu u potpunosti jasni, a nema ni jasnih dokaza da redukcija tjelesne mase smanjuje rizik od oboljevanja. U konačnici se može reći da postoji povezanost između debljine i raka debelog crijeva, osobito kod muškaraca (27,28). I dok crveno meso, mast, mesne prerađevine te način pripreme mesa moguće povećavaju rizik od raka debelog crijeva, a osobito rektuma, smatra se da hrana bogata vlaknima, voćem i povrćem te mliječni proizvodi djeluju zaštitno. Za većinu prehrambenih namirnica ipak nema jasnih dokaza o zaštitnom ili štetnom učinku, ali se zaštitni učinak voća i povrća na pojavu raka debelog crijeva smatra istinitim. Moguće objašnjenje leži u prisutnosti antioksidansa i folata (29–32). U posljednje vrijeme mediteranska prehrana, kao primjer zdrave prehrane, sve se više istražuje u prevenciji bolesti te se nedavno pokazalo da kod žena smanjuje rizik od raka debelog crijeva za 8 -11 posto (33).

Sve više se istražuje i utjecaj vitamina i minerala kao zaštitnih čimbenika, a najviše je istraživanja usmjereno na kalcij, magnezij i vitamin D. Prijašnja istraživanja o mogućem zaštitnom učinku kalcija temeljila su se na njegovu staničnom mehanizmu djelovanja dok jasnih dokaza o protektivnom učinku kalcija u populacijskim studijama za sada nema (34). Mogući zaštitni mehanizam povezuje se s unosom kalcija mlijekom i mliječnim proizvodima u kojima je zastupljen u visokim koncentracijama, ali treba uzeti u obzir i mogući doprinos ostalih sastojaka u mlijeku, osobito vitamina D koji također na razini stanica pokazuje

antiproliferativni učinak. Osim prijašnjih istraživanja usmjerenih na stanični mehanizam djelovanja kalcija, provedene su i opservacijske studije na ljudima koje potkrepljuju prijašnje dokaze, ali metaanaliza provedenih opservacijskih studija nije potvrdila prijašnje dokaze (35). Iako recentno provedena metaanaliza prospektivnih opservacijskih studija upućuje na zaštitni učinak kalcija na pojavu raka debelog crijeva, potrebne su randomizirane kliničke studije s dugim praćenjem koje bi mogle razjasniti ulogu primjene visokih doza preparata kalcija na pojavu raka debelog crijeva (36). Stoga se kalcij ne smatra jasnim zaštitnim čimbenikom kod prevencije raka debelog crijeva (37). Osim kalcija, u manjoj mjeri, kao protektivni čimbenik raka debelog crijeva smatra se i magnezij, međutim nema mnogo dokaza. Moguće je da unos visokih doza magnezija skromno smanjuje rizik od raka debelog crijeva (38). Najviše istraživanja ipak je usmjereno na ulogu nedostatka vitamina D kao rizičnog čimbenika za mnoge bolesti, a osobito se istražuje povezanost koncentracije 25-hidroksikolekalciferola (25(OH)D) s pojavom malignih bolesti. Najjasnija inverzna povezanost s rizikom za rak pokazala se upravo u raku debelog crijeva (39). Uzimajući u obzir antiproliferativni mehanizam djelovanja vitamina D *in vitro*, navedeni dokazi nisu neočekivani, međutim osim za prevenciju osteoporoze nema preporuka za primjenu vitamina D u svrhu prevencije malignih bolesti (40). Uz prehranu i debljinu vezane su i životne navike čiji se utjecaj na pojavu bolesti vrlo često istražuje u epidemiologiji. Razlog tome je što ih se može voljno mijenjati, iako se to vrlo rijetko čini. Razina fizičke aktivnosti, alkohol i pušenje smatraju se rizičnim čimbenicima za rak debelog crijeva. Dok je pušenje otprije poznati rizični čimbenik za većinu malignih bolesti, pa tako i za rak debelog crijeva, konzumacija alkohola i nedovoljna fizička aktivnost smatraju se potencijalnim rizičnim čimbenikom (29). Prema provedenim metaanalizama, pušenje povećava rizik od raka debelog crijeva kod aktivnih i bivših pušača u odnosu na nepušače (41,42). Nakon prestanka pušenja rizik dugo vremena ostaje visok, a

pitanje je i smanjuje li se ikad na razinu nepušača. Utjecaj vremena na smanjenje rizika još nije jasan, ali se smatra da se rizik od oboljevanja od raka proksimalnog dijela debelog crijeva te rektuma smanjuje neposredno nakon prestanka pušenja dok se rizik za rak distalnog dijela debelog crijeva smanjuje nakon više od dvadeset godina od prestanka pušenja (43).

#### 1.2.2.2. Lijekovi

Analizom studija prevencije kardiovaskularnog rizika uočeno je da primjena aspirina i ostalih NSAR-a smanjuje rizik od raka debelog crijeva. Takve su studije brojne i jednoznačno upućuju na kemopreventivni učinak aspirina i NSAR-a u razvoju raka debelog crijeva te su potaknule daljnja istraživanja primjene aspirina i NSAR-a u kemoprevenciji i sporadičnog i nasljednog raka debelog crijeva (3,44). U bolesnika sa sindromom Lynch primjena ovih lijekova pokazala je koristan učinak u randomiziranoj kliničkoj studiji uz prihvatljive nuspojave (45,46).

Druga često propisivana skupina lijekova čija se učinkovitost istražuje i u malignim bolestima su bisfosfonati. Iako vrlo učinkoviti u liječenju osteoporoze te s jasnim učinkom na malignu hiperkalcemiju i prevenciju skeletnih događaja kod bolesnika s koštanim metastazama, njihov učinak u prevenciji i liječenju malignih bolesti nije dokazan. Njihova potencijalna preventivna uloga u razvoju raka debelog crijeva temelji se na prekliničkim istraživanjima koja su pokazala njihovu antiproliferativnu, antiangiogenu i proapoptotičku aktivnost, odnosno povoljni učinak na ključne mehanizme važne za razvoj i metastaziranje karcinoma. S obzirom na mehanizam djelovanja i bisfosfonati bi se kao i acetilsalicilna kiselina i NSAR mogli koristiti u kemoprevenciji raka debelog crijeva. Tome u prilog govori i metaanaliza koja je pokazala

smanjenje incidencije raka debelog crijeva za 17 % kod ljudi koji su uzimali bisfosfonate (47). Naravno, potrebne su randomizirane kliničke studije kako bi se potvrdila ova hipoteza. Treća skupina lijekova koja je pokazala kemopreventivni učinak u žena u postmenopauzi su preparati estrogena i progestina koji se koriste kao hormonsko nadomjesno liječenje. Brojne epidemiološke studije te dvije metaanalize pokazale su znatno smanjenje rizika za razvoj raka debelog crijeva, čak do 20 %, kod postmenopauzalnih žena koje su koristile HNL (48–50). Ovaj učinak pripisuje se progestinu dok sam estrogen, čini se, nema protektivni učinak. Smatra se da spolni hormoni, osobito estrogen, igraju ulogu u razvoju raka debelog crijeva. Sam mehanizam djelovanja estrogena i progestina u karcinogenezi raka debelog crijeva nije razjašnjen (48,51).

### 1.3. Terapija metastatskog raka debelog crijeva

U zadnjih dvadeset godina preživljenje bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva se udvostručilo i iznosi oko 30 mjeseci. Nije poznato što je glavni razlog ovako velikom pomaku, ali poznati su neki čimbenici ovog napretka. U današnje vrijeme promijenile su se osobine bolesnika prije početka terapije, moguće zbog pozornijeg praćenja nakon liječenja primarnog tumora te ranijeg otkrivanja metastatske bolesti.

Također, primjenjuje se učinkovitija sistemska terapija, sekvencijski, dostupan je veći broj linija te je terapija individualizirana na temelju biomarkera. Bolja prognoza je i odraz multidisciplinarnog pristupa liječenju ovih bolesnika, kirurškog liječenja metastaza te primjene lokalne terapije. Prvi korak u liječenju je definiranje operabilnosti metastatske bolesti i primarnog tumora te odluka o neoadjuvantnoj primjeni terapije.

Perioperativno liječenje treba trajati oko šest mjeseci. Iako se primjena

kirurških i lokalnih ablativnih metoda sve više koristi u liječenju metastatske bolesti, osobito jetrenih metastaza, 80-90 % bolesnika se inicijalno prezentira s inoperabilnom metastatskom bolesti (8,10). Određeni dio njih se primjenom sistemske terapije može konvertirati u operabilnu bolest, no za većinu bolesnika sistemska terapija je jedini primjenjivi način liječenja. Prije početka liječenja važno je definirati cilj i strategiju liječenja koji ovise o obilježjima tumora, odnosno mutacijskom statusu *RAS* gena stanju bolesnika te učinkovitosti i toksičnosti terapije (52). ESMO smjernice u prvoj liniji liječenja metastatskog kolorektalnog karcinoma predlažu kemoterapijske protokole koji se baziraju na 5-fluorouracilu (5-FU) u kombinaciji s irinotekanom ili oksaliplatinom (10). Kombinacija 5-FU s jednim od ovih lijekova pokazala je veću učinkovitost u smislu boljeg odgovora na terapiju, vremena do progresije bolesti te dijelom i ukupnog preživljenja u odnosu na sam 5-FU (53,54). Dodatak monoklonskih anti-VEGF i anti-EGFR protutijela u prvoj liniji postiže se još bolji ishod u ovih bolesnika (55–57). Dakle, preporučeni kemoterapijski protokoli u prvoj liniji liječenja su FOLFOX, CAPOX, FOLFIRI te u dobro odabranih bolesnika FOLFOXIRI ili terapija fluoropirimidinom u onih koji nisu kandidati za kombinacijsku terapiju. Uz to se u većine primjenjuje i biološka terapija. U današnje vrijeme cilj liječenja je da 70-80 posto bolesnika dobrog općeg stanja primi drugu liniju liječenja, a njih 50-60 posto i treću liniju liječenja. Zbog znatne kumulativne toksičnosti terapije u novije vrijeme razvijen je koncept terapije održavanja s ciljem smanjenja toksičnosti uz održan onkološki učinak te nastavak terapije s pojavom progresije bolesti. U drugoj liniji liječenja, koja je rezervirana za bolesnike dobrog općeg stanja, preporučuje se promijeniti citotoksični lijek na koji je došlo do progresije bolesti, odnosno bolesnici koji su liječeni irinotekanom u prvoj liniji trebali bi biti liječeni oksaliplatinom i obrnuto (10). Treća linija liječenja je također rezervirana za bolesnike dobrog općeg stanja, a izbor terapije ovisi o terapiji primijenjenoj u



drugoј liniji. Ako je u drugoj liniji liječenja primijenjena kombinacija irinotekana s anti-EGFR terapijom, preporučuje se primjena kemoterapije temeljena na oksaliplatini ako je ista u prvoj liniji imala dobar učinak te prihvatljivu toksičnost. Nakon druge linije kemoterapije temeljene na oksaliplatini primjenjuje se irinotekan uz anti-EGFR terapiju ako dosad nije primjenjivana i ako ne postoji RAS mutacija. U trećoj liniji opcija liječenja je i antiEGFR terapija, ovisno o mutacijskom statusu te ranije primjenjivanoj biološkoj terapiji. Kod bolesnika u kojih je bolest progredirala na svu dostupnu terapiju u trećoj liniji preostaje trifluridin/tipiracil (58).

#### 1.4. Vitamin D

Vitamin D je vitamin topljiv u mastima koji se sintetizira endogeno pod utjecajem ultraljubičastog zračenja te se u manjoj mjeri unosi u organizam putem hrane i suplemenata. U hrani se nalazi vrlo malo vitamina D, apsorbira se u tankom crijevu te putem limfe i krvi dopijeva u jetru. U koži se iz 7-dehidrokolesterola pod utjecajem ultraljubičastih B zraka (valne duljine 280-320 nm) stvara previtamin D<sub>3</sub>, a potom provitamin D<sub>3</sub>. Tako dobiven vitamin D je inertan te se aktivira u organizmu dvostrukom hidroksilacijom. Prvi korak u metaboličkoj aktivaciji vitamina D je hidroksilacija C 25 i događa se u jetri. Nekoliko enzima iz obitelji citokroma P450 (CYP) u jetri ima sposobnost 25-hidroksilacije vitamina D, a kao ključni enzim u ovom procesu navodi se CYP2R1. Prisutan je uglavnom u jetri i testisu, ima sposobnost hidroksilacije i vitamina D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>, a mutacije *cyp2R1* gena opisane su u bolesnika s niskim koncentracijama 25(OH)D i rahitisom. 25-hidroksilacija vitamina D je slabo regulirana. Koncentracije 25(OH)D rastu proporcionalno unosu vitamina D i zato je 25(OH)D najbolji pokazatelj statusa vitamina (59).

Drugi korak u bioaktivaciji, stvaranje aktivnog oblika  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  s pomoću 25-hidroksivitamin D3  $1\alpha$ -hidroksilaze (produkta *CYP27B1* gena), zbiva se u bubregu u fiziološkim uvjetima (60). U određenim situacijama (trudnoća, kronično bubrežno zatajenje, itd.) i ostale stanice u organizmu stvaraju cirkulirajući aktivni oblik vitamina D. Ekstrarenalno proizveden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  djeluje autokrino i parakrino na stanice.  $1\alpha$ -hidroksilaza nalazi se u mnogim tkivima, što će kasnije biti detaljnije opisano, kao što su prostata, debelo crijevo, pluća, beta stanice gušterače, monociti, paratiroidna žlijezda (59).

Aktivnost bubrežne  $1\alpha$ -hidroksilaze je strogo regulirana kako bi kontrolirala aktivnost  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , a sve s ciljem održavanja homeostaze kalcija. Kalcij iz prehrane pak izravno regulira aktivnost enzima promjenom koncentracije kalcija u serumu te neizravno putem PTH. Zbog toga je nakon paratiroidnektomije stimulacija  $1\alpha$ -hidroksilaze hipokalcemijom otupljena, ali nije u potpunosti uklonjena. U stanicama proksimalnog tubula kalcij izravno suprimira aktivnosti  $1\alpha$ -hidroksilaze, moguće putem CaSR (61,62).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$  je pleotropni hormon. Njegova glavna uloga je održavanje homeostaze kalcija i fosfata te metabolizma kostiju. Potiče apsorpciju kalcija iz probavnog sustava i održava adekvatnu koncentraciju kalcija i fosfata u serumu. Za optimalnu apsorpciju kalcija u crijevu potrebni su  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  i VDR (63). Unos kalcija je limitirajući čimbenik u apsorpciji kalcija iz crijeva i ovisan je o vitaminu D.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  povećava aktivni transport fosfata putem ekspresije Na-Pi kotransportera i promjenom sastava membrane enterocita, što dovodi do pojačanog ulaska fosfata (64).

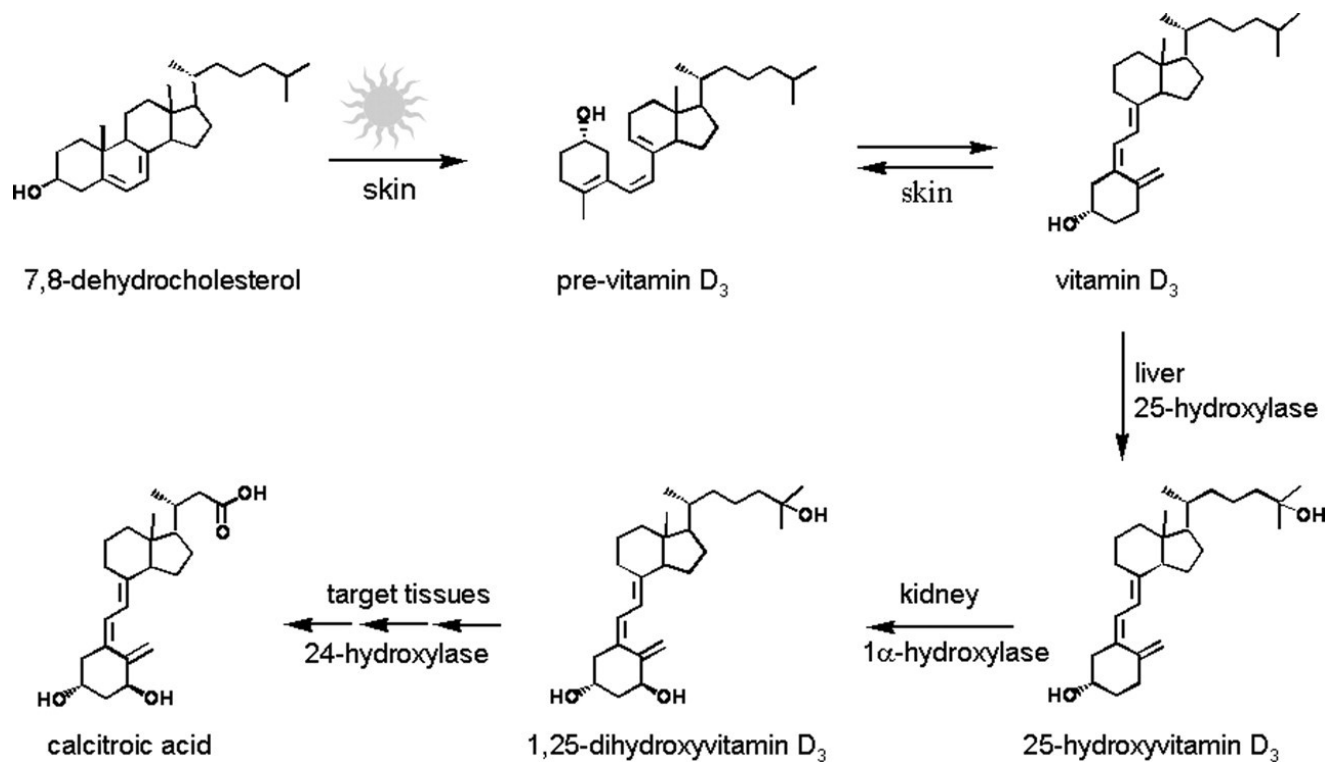
Vitamin D je esencijalan za razvoj i održavanje mineralizacije skeleta. Vitamin D potreban je i za normalnu funkciju osteoblasta i osteoklasta u rastu i remodeliranju kostiju (65). Manjak vitamina D u djece dovodi do rahitisa, a u odraslih do osteomalacije.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  vezanjem na VDR u osteoblastima stimulira ekspresiju vezne molekule receptora Nf $\kappa$ B što dovodi do

interakcije s navedenim receptorom te potiče pretvorbu nezrelih monocita u zrele osteoklaste koji razgrađuju matriks te mobiliziraju kalcij i ostale minerale iz skeleta (66). U bubregu 1,25(OH)<sub>2</sub>D stimulira apsorpciju kalcija iz glomerularnog filtrata (59). Najvažnija endokrina funkcija 1,25(OH)<sub>2</sub>D u bubregu je održavanje vlastite homeostaze simultanom supresijom 1 $\alpha$ -hidroksilaze i stimulacijom 24-hidroksilaze.

Vitamin D modulira i funkciju paratiroidne žlijezde. Deficijencija vitamina D dovodi do paratiroidne hiperplazije, pojačane sinteze PTH i sekrecije, primjena 1,25(OH)<sub>2</sub>D koči sintezu PTH i povećanje žlijezda, što čini 1,25(OH)<sub>2</sub>D učinkovitim u liječenju sekundarnog hiperparatiroidizma u kroničnom bubrežnom zatajenju. Osim toga 1,25(OH)<sub>2</sub>D regulira i razinu VDR-a u paratiroidnim žlijezdama te odgovor na kalcij (67).

Uz navedeni klasični učinak vitamina D postoje dokazi temeljeni na brojnim genetskim i epidemiološkim istraživanjima koji povezuju poremećaje endokrinog sustava vitamina D s brojnim bolestima nevezanima uz homeostazu kalcija kao što su: hipertenzija, mišićne bolesti, infekcije, autoimune bolesti te maligne bolesti. Povezanost deficijencije vitamina D s malignim bolestima te neklasični učinci vitamina D bit će opisani u nastavku.

Vitamin D utječe na rast stanica, neuromuskularne i imunološke funkcije te djeluje protuupalno (68,69). Vitamin D modulira gene odgovorne za sintezu proteina koji reguliraju stanični rast, diferencijaciju i apoptozu stanica (70). Svoju funkciju 1,25(OH)<sub>2</sub>D ostvaruje vezanjem za nuklearni receptor (VDR) putem složenih genomskih (transkripcijskih i posttranskripcijskih) i negenomskih mehanizama (71). Vitamin D veže se za receptor koji je prisutan u većini stanica ljudskog organizma, a prisutan je i u tumorskim stanicama većine solidnih tumora (72–74).



Slika 1. Sinteza, aktivacija i katabolizam vitamina D

Vitamin D stvara se u koži cijepanjem 7-dehidrokolesterola nakon čega slijedi termalna izomerizacija. Potom se prenosi u jetru vezan za serumski protein koji veže vitamin D gdje se konvertira u 25-hidroksivitamin D, glavni cirkulirajući oblik vitamina D. Posljednji korak u aktivaciji 1,25-hidroksilacija događa se primarno iako ne isključivo u bubregu te nastaje 1,25-hidroksivitamin D, hormonski oblik vitamina. Inaktivacija je posredovana 24-hidroksilazom koja katalizira slijed oksidacijskih procesa rezultirajući u cijepanju postraničnog lanca.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28

#### 1.4.1. Procjena statusa D vitamina u organizmu

Mjerenje koncentracije 25-hidroksivitamina D u krvi je najbolji pokazatelj statusa vitamina D. 25-hidroksivitamin D je odraz vitamina D sintetiziranog u koži te dobivenog iz hrane i suplemenata, a ima i relativno dugo vrijeme poluživota od oko 2-3 tjedna (75,76). 25(OH)D je biomarker izloženosti vitaminu D, ali nije pokazatelj zaliha vitamina D pohranjenih u tkivima (70,77). Vrijeme poluživota 1,25(OH)2D je oko 4 sata i u krvi se nalazi u 1000 puta manjoj koncentraciji od 25(OH)D vitamin te mu je razina u krvi pod utjecajem paratiroidnog hormona, kalcija i fosfata. Koncentracija 1,25(OH)2D ne odražava zaliha vitamina D u organizmu te nije koristan pokazatelj statusa vitamina D u bolesnika. Vrlo često su u hipovitaminozi D koncentracije 1,25(OH)2D u krvi normalne ili povišene zbog sekundarnog hiperparatiroidizma (59).

Postoji nekoliko standardiziranih i preporučenih metoda za određivanje koncentracije 25(OH)D u krvi, uključujući tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) te tekućinsku kromatografiju-tandemnu spektrometriju masa (LC-MS-MS) (78). Iako postoji određena varijabilnost između rezultata, sve su metode primjerene za upotrebu u svakodnevnoj praksi. S obzirom na to da se u posljednje vrijeme sve više istražuje utjecaj hipovitaminoze D na razvoj mnogih kroničnih bolesti, široka je primjena automatiziranih metoda s ligandima za određivanje 25(OH)D. Jedna od takvih često korištenih metoda određuje koncentraciju 25(OH)D tehnologijom kemoimunoluminiscencije (79).

#### 1.4.2. Insuficijencija, deficijencija i toksičnost vitamina D

Da bi se definiralo deficijenciju i insuficijenciju vitamina D potrebno je definirati normalni raspon. Iako je teško definirati adekvatnu koncentraciju 25-hidroksivitamina D prema

konsenzusu optimalan raspon za većinu populacija je iznad 75-80 nmol/L (30-32 ng/ml) (80–83). Istraživanja su pokazala da ljudi koji žive blizu ekvatora i izloženi su sunčevoj svjetlosti čitavu godinu, a ne koriste zaštitu od sunca imaju koncentraciju 25(OH)D u krvi iznad 75 nmol/l (84). S obzirom da je UV zračenje glavni izvor vitamina D proizlazi da je glavni uzrok hipovitaminoze D nedovoljna izloženost suncu (82). Upotreba zaštitnih krema s faktorom 30 smanjuje sintezu vitamina D za 95% (85). Osobe tamnije puti i crne i žute rase imaju prirodnu zaštitu od UV zračenja te im je potrebna duža izloženost UV zračenju za sintezu iste količine vitamina D nego osobama svjetle puti i bijele rase. Osim nedovoljne izloženosti UV zračenju postoji još nekoliko uzroka hipovitaminoze D kao što su malapsorpcijski sindrom, određene kronične bolesti te upotreba određenih lijekova (86,87). Zamijećena je i inverzna povezanost serumskog 25(OH)D s BMI većim od 30 kg/m<sup>2</sup> (88). Prema smjernicama Endokrinološkog društva iz 2011. godine hipovitaminoza D definirana je serumskom koncentracijom 25(OH)D < 75 nmol/L (89). Hrvatske smjernice za prevenciju, prepoznavanje i liječenje nedostatka vitamina D u odraslih dalje definiraju, ovisno o koncentraciji 25(OH)D u serumu: deficijenciju <50 nmol/L, suficijenciju 75-150 nmol/L, insuficijenciju 50-75 nmol/L i toksičnost >250 nmol/L (90). U skladu s navedenim preporukama prevalencija deficijencije vitamina D u svijetu je visoka. Iako nedostaju podaci za pojedine zemlje i dobne skupine, prema dostupnoj literaturi u Europi, Kanadi i SAD-u među starijom populacijom prevalencija deficijencije vitamina D iznosi 20-100 posto (66,89,91–93). Deficijencija je također česta u Australiji, na Bliskom istoku, u Indiji, Africi i Južnoj Americi unatoč broju sunčanih dana u tim područjima (66,94,95). Toksičnost vitamina D je za razliku od deficijencije i insuficijencije vrlo rijetka. Primjena kolekalciferola u odraslih u dozi 10 000 ij tijekom barem pet mjeseci nije uzrokovala toksičnost (96). Ni u trudnica koje su uzimale 4000 ij tijekom čitave trudnoće te podignule koncentraciju 25(OH)D na 150 nmol/L

nije zabilježena toksičnost (97). Toksičnost vitamina D u vidu hiperkalcemije, hiperkalcijurije, hipofosfatemije, kalcifikacije mekih tkiva te nefroklacinoze zabilježena je samo kod dugotrajnih koncentracija 25(OH)D u krvi iznad 750 nmol/L.

Podaci o prevalenciji deficijencije vitamina D za zdravu populaciju u Hrvatskoj nisu poznati, no postoje mala epidemiološka istraživanja koja su pokazala visoku prevalenciju deficijencije vitamina D u postmenopauzi te u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (98,99).

#### 1.4.3. Preporuke o dnevnom unosu vitamina D u odrasloj populaciji

Prema važećim smjernicama odrasli stariji od 19 godina zahtijevaju unos od barem 600 ij vitamina D dnevno za optimalno koštano zdravlje. Nije poznato jeli doza od 600 ij. dovoljna za ostale potencijalne korisne učinke vitamina D (npr. prevencija zloćudnih bolesti, pozitivan imunološki učinak). Da bi se koncentracija 25(OH)D u krvi trajno održavala u optimalnom rasponu pretpostavlja se da bi dnevne potrebe mogle biti i do 2000 ij dnevno (89). Pretile odrasle osobe bi trebale dnevno unositi dva do tri puta veće doze vitamina D od onih preporučenih za njihovu dobnu skupinu. Najviša podnošljiva doza održavanja u osoba starijih od osam godina ne bi smjela iznositi više od 4000 ij. dnevno. Preporuča se liječenje deficijencije vitamina D u odraslih s 50000 ij vitamina D2 ili D3 jednom tjedno kroz osam tjedana ili 6000 ij dnevno s ciljem postizanja koncentracije 25(OH)D iznad 75 nmol/L nakon čega slijedi doza održavanja s 1500 do 2000 ij dnevno .

#### 1.4.4. Vitamin D i rak debelog crijeva

Hoffman je još 1916.g. objavio da život na većoj zemljopisnoj širini nosi povećani rizik za oboljevanje od raka. Uspoređujući mortalitet od raka u periodu od 1908.g. do 1912.g. zaključio je da mortalitet raste s udaljenosti od ekvatora. Dva desetljeća kasnije Peller i Stephenson su objavili da članovi mornarice SAD-a koji svoj posao obavljaju uglavnom na otvorenom imaju 60 % manju vjerojatnost da će umrijeti od raka od civila koji rade u zatvorenom. 1941.g. Apperly je uspoređujući smrtnost od raka u američkih i kanadskih poljoprivrednika, koji su zbog toga izloženi sunčevoj svjetlosti, zapazio manji mortalitet u onih koji su na jugu u odnosu na one na sjeveroistoku. Ovi autori su primijetili i da ljudi najizloženiji sunčevoj svjetlosti imaju do osam puta veći rizik za oboljevanje od raka kože (ne-melanoma) za koji su primijetili da se lako otkrije i liječi. Smatrali su da oboljevanje od ovih tipova raka kože utječe na stvaranje imuniteta za ostale tipove karcinoma, uključujući i one najsmrtonosnije kao što su debelo crijevo, dojka i prostata (100).

Sve do 1980. ova su pronicljiva opažanja bila zanemarena. Tada su Garland i sur. postavili hipotezu da je vitamin D odgovoran za inverznu povezanost između UVB zračenja te raka debelog crijeva. Hipoteza je postavljena na temelju zemljopisne distribucije smrtnosti od raka debelog crijeva u SAD-u. Najveći mortalitet od raka debelog crijeva uočen je u područjima u kojima je stanovništvo bilo izloženo najmanjoj količini sunčeve svjetlosti, a to je bilo u velikim gradovima te u poljoprivrednim regijama na visokoj nadmorskoj visini (101). To je potaknulo prvo prospektivno istraživanje studije parova iz područja okruga Washington koje je povezalo status vitamina D, odnosno koncentraciju 25(OH)D s rizikom za razvoj raka debelog crijeva. Primijetili su da ispitanici s koncentracijom 25(OH)D većom od 50 nmol/L imaju trostruko manji rizik za rak debelog crijeva (102). Od tada su provedena brojna epidemiološka i



eksperimentalna istraživanja o mogućem kemopreventivnom učinku vitamina D na pojavu raka debelog crijeva od kojih većina pokazuje inverznu povezanost.

#### 1.4.4.1. Protutumorsko djelovanje vitamina D

Potkraj 20. stoljeća objavljene su brojne studije o 1,25(OH)<sub>2</sub>D kao snažnom inhibitoru zloćudnih stanica u kulturama stanica raka debelog crijeva, dojke i prostate (103,104).

Opaženo je i da je 1,25(OH)<sub>2</sub>D učinkovit u liječenju psorijaze, benigne hiperproliferativne bolesti, odnosno da posjeduje snažna antiproliferativna i prodiferencijacijska svojstva koja bi se mogla primijeniti i u drugim bolestima (105). Na temelju tih brojnih zapažanja zaključeno je da je bolji status vitamina D u organizmu, kao odraz viših koncentracija 25(OH)D koje se u bubregu pretvaraju u aktivni oblik 1,25(OH)<sub>2</sub>D koji se potom vraća u cirkulaciju i ostvaruje svoj protutumorski učinak, razlog smanjenog rizika razvoja maligne bolesti. Budući da je 1,25(OH)<sub>2</sub>D ključan u regulaciji homeostaze kalcija, visoke koncentracije ovog hormona u krvi u konačnosti bi dovele do neizlječive toksičnosti. Stoga je i proizvodnja 1,25(OH)<sub>2</sub>D u bubregu strogo regulirana mnogim čimbenicima kao što su PTH, kalcij i fosfati (105).

Iz toga proizlazi da visoke koncentracije 25(OH)D u krvi ne dovode do pojačanog stvaranja 1,25(OH)<sub>2</sub>D u krvi te se time ne može objasniti anitumorski učinak vitamina D. Odgovor na ovo pitanje proizašao je iz studije Schwartz i sur. koji su otkrili da stanice prostate također imaju sposobnost pretvorbe 25(OH)D u 1,25(OH)<sub>2</sub>D, što je kasnije potvrđeno i u različitim zdravim i zloćudnim stanicama kao što su one raka debelog crijeva i dojke (104,106).

Iz toga proizlazi da cirkulirajući 25(OH)D ulazi u stanice gdje se konvertira u aktivni oblik koji ostvaruje svoj učinak djelovanjem na različite gene uključujući i one koji smanjuju mogućnost maligne transformacije.

Učinak 1,25(OH)<sub>2</sub>D jednak je onom steroidnih hormona. Vežanjem 1,25(OH)<sub>2</sub>D za nuklearni receptor vitamina D (VDR) dolazi do dimerizacije s X-receptorom retinoične kiseline (RXR) te vežanja novonastalog spoja s akceptorskim mjestom DNK smještenom u promotorskim i regulacijskim područjima ciljnih gena čime se potiče transkripcija gena i sinteza nove mRNK. To su genomski učinci aktivnog oblika vitamina D i javljaju se unutar nekoliko sati do nekoliko dana. 1,25(OH)<sub>2</sub>D ostvaruje učinak i putem brzih negenomskih mehanizama koji se događaju unutar minuta do sati i uključuju promjenu aktivnosti određenih enzima.

1,25(OH)<sub>2</sub>D **inhibira proliferaciju** zloćudnih stanica inducirajući prekid staničnog ciklusa te nakupljanje stanica u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi kao posljedice pojačane ekspresije inhibitora ciklin-ovisne kinaze (CDK) p21WAF1/CIP1 i p27KIP1 (25). Promotor gena p21WAF1/CIP1 posjeduje element koji reagira na vitamin D (VDRE) i 1,25(OH)<sub>2</sub>D inducira njegovu ekspresiju u različitim vrstama stanica (25,71). Indukcija p27KIP1 gena kojem nedostaje VDRE posredovana je transkripcijskim čimbenicima NF- $\kappa$ B i Sp1 kao i stabilizacijom proteina (107,108). 1,25(OH)<sub>2</sub>D inducira ekspresiju GADD45 proteina koji je uključen u prekid staničnog ciklusa nakon oštećenja DNK, što ga čini potrebnim za održavanje genomske stabilnosti (71,109). Usto, 1,25(OH)<sub>2</sub>D regulira i ostale gene važne za proliferaciju stanica kao što su c-MYC, c-FOS and c-JUN (25). Svoju antiproliferativnu aktivnost 1,25(OH)<sub>2</sub>D ostvaruje i djelovanjem na određene signalne puteve koji kontroliraju rast epitelnih stanica. Od navedenih signalnih puteve prvi je opisan onaj epitelnog čimbenika rasta (EGF) koji potiče proliferaciju epitelnih stanica kolona. U primarnoj kulturi stanica ljudskog adenokarcinoma te u staničnim linijama raka debelog crijeva (CaCo-2) 1,25(OH)<sub>2</sub>D smanjuje ekspresiju EGFR te količinu membranskog EGFR potičući njegovu internalizaciju vezivanjem liganda (25,110).

EGF djeluje tako da koči ekspresiju VDR u CaCo-2 stanicama, što znači da aktivacija EGF signalnog puta u malignim stanicama karcinoma kolona može nadvladati protutumorski učinak 1,25(OH)<sub>2</sub>D (111).

Wnt proteini su obitelj signalnih čimbenika s višestrukim funkcijama tijekom razvoja i održavanja homeostaze. Neki od njih djeluju putem kanonskog Wnt/ $\beta$ -kateninskog signalnog puta (112). Wnt signalni put uključen je u proliferaciju progenitornih epitelnih stanica crijeva koje se nalaze na dnu crijevnih kripti te akumuliraju nuklearni  $\beta$ -katenin, vjerojatno zahvaljujući Wnt signalima iz okolne strome koji održavaju proliferativni status (113).

Kretanjem tih stanica prema lumenu dolazi do diferencijacije stanice te se  $\beta$ -katenin više ne uočava u jezgri. Iz toga proizlazi ključna uloga aktivnoga kanonskog Wnt puta, a to je da se osigura proliferacija progenitorskih stanica s obzirom na to da mutacija u *tcf-4* genu koji pripada obitelji *tcf/lef* gena dovodi do gubitka proliferativnih odjeljaka u tankom crijevu (114).

Ekspresija topljivog Wnt inhibitora Dickkopf-1 smanjuje proliferaciju epitela, što se podudara s gubitkom kripta (115).

Konstitutivna aktivacija Wnt/ $\beta$ -kateninskog signalnog puta događa se u gotovo svim kolorektalnim tumorima, najčešće zbog mutacije *APC* gena te rjeđe *CTNNB1*/ $\beta$ -katenina ili *AXIN2*. Aktivacija ovog puta je rani događaj u tumorigenezi raka debelog crijeva, ako ne i početni. Zbog toga bi aktivacija ovog puta mogla biti glavni pokretač tumora crijeva (25,116).

Studije su pokazale da 1,25(OH)<sub>2</sub>D i analozi djeluju antagonistički na Wnt signalni put u stanicama ljudskog kolorektalnog karcinoma (25,109). Tako 1,25(OH)<sub>2</sub>D inhibira transkripcijsku aktivnost  $\beta$ -katenina s pomoću dva mehanizma. Prvo, 1,25(OH)<sub>2</sub>D brzo povećava broj VDR vezanih na  $\beta$ -katenin čime smanjuje interakciju između kateina i TCF4. Iz toga proizlazi da 1,25(OH)<sub>2</sub>D modulira ciljne gene TCF/LEF sustava na suprotan način od  $\beta$ -katenina. Drugo, redukcija transkripcijske aktivnosti  $\beta$ -katenina uzrokovane 1,25(OH)<sub>2</sub>D je

popraćena izlaskom  $\beta$ -katenina iz jezgre i relokalizacijom na membranu, konkomitantno s ekspresijom E-kadherina. U nekim stanicama ovaj je mehanizam neovisan o ekspresiji E-kadherina (25).

To upućuje da 1,25(OH)<sub>2</sub>D koči Wnt/ $\beta$ -kateninski put koji moguće kontrolira fenotip epitelnih stanica i stoga bi mogao biti učinkovit u prevenciji kolorektalnog karcinoma. Nakon stabilizacije  $\beta$ -katenina u stanicama kolorektalnog karcinoma, bilo zbog vlastite mutacije ili mutacije APC-a, vezivanje  $\beta$ -katenina na VDR moglo bi puferirati njegov stimulatívni učinak na TCF4 ciljne gene. To je još jedan zaštitni učinak koji se gubi tijekom progresije bolesti zajedno s gubitkom ekspresije VDR-a.  $\beta$ -katenin u jezgri mogao bi prolazno potaknuti transkripcijsku aktivnost VDR-a prije izlaska  $\beta$ -katenina iz jezgre te gubitka VDR-a (25).

1,25(OH)<sub>2</sub>D inhibira rast stanica kolorektalnog adenokarcinoma **potičući diferencijaciju** stanica (117). U kulturi stanica bolesnika s FAP-om 1,25(OH)<sub>2</sub>D inhibira proliferaciju stanica rektalnih adenoma (118). 1,25(OH)<sub>2</sub>D inducira enterocitičnu diferencijaciju CaCo-2 stanica. U staničnim linijama kolorektalnog karcinoma 1,25(OH)<sub>2</sub>D potiče pojačanu aktivnost alkalne fosfataze koja se smatra markerom diferencijacije u stanicama kolona (119).

1,25(OH)<sub>2</sub>D i njegovi analozi **induciraju apoptozu** u stanicama raka debelog crijeva. Apoptoza se odvija putem regulacije gena odgovornih za staničnu smrt. Ovi spojevi upreguliraju proapoptotičke proteine BAK i potiču otpuštanje antiapoptotičkog proteina BAG-1 iz jezgre (119,120). 1,25(OH)<sub>2</sub>D inducira apoptozu i putem pojačanja ekspresije proapoptotičkih proteina BAK1 i BAX i putem smanjenja ekspresije antiapoptotičkih proteina BAG1, BIRC5 i BCL2 (119,121). Učinak 1,25(OH)<sub>2</sub>D na ekspresiju ostalih proapoptotičkih i antiapoptotičkih gena razlikuje se među staničnim linijama. Zanimljivo je da za apoptozu koju potiču 1,25(OH)<sub>2</sub>D i njegovi analozi nije potreban intaktni *tp53* tumor supresorski gen, što opravdava primjenu vitamina D i analoga u terapiji karcinoma neovisno o statusu navedenog gena.

Ovakva spoznaja je osobito važna za kolorektalni karcinom u kojem je *tp53* često promijenjen (119).

Godine 1996. su Alini i sur. pokazali da metaboliti vitamina D igraju važnu ulogu u angiogenezi tijekom normalnog razvoja skeleta, a navedeni rezultati potaknuli su daljnja istraživanja o utjecaju vitamina D na angiogenezu (122). Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz postojećih i ključan je korak za rast, progresiju i metastaziranje tumora (123,124). Pretpostavlja se da bi se **inhibicijom angiogeneze** vitaminom D spriječio rast tumora i nastajanje tumora. VEGF je najpotentniji stimulator angiogeneze, a prostaglandini su također važni proangiogenetski čimbenici. Angiogeneza počinje u uvjetima lokalne hipoksije koja inducira sintezu proangiogeničkih čimbenika koji aktiviraju signalne puteve koji uzrokuju strukturnu reorganizaciju endotelnih stanica u smislu stvaranja novih kapilara (125). Na to upućuje i studija koja je pokazala da produljena primjena metabolita vitamina D dovodi do značajno smanjenog imunohistokemijskog izražaja VEGF-a, odnosno smanjuje broj krvnih žila u stanicama tumora (126). Stimulacija angiogeneze u uvjetima hipoksije posredovana je čimbenikom HIF-1 koji izravno povećava ekspresiju nekoliko proangiogeničkih čimbenika uključujući VEGF (127). Studije na eksperimentalnim modelima pokazale su da je 1,25(OH)<sub>2</sub>D snažan inhibitor angiogeneze u tumorima (128). 1,25(OH)<sub>2</sub>D inhibira formaciju novih žila *in vitro* i smanjuje vaskularizaciju *in vivo*. Kao što je i prije navedeno, 1,25(OH)<sub>2</sub>D i njegovi analozi izravno inhibiraju proliferaciju endotelnih stanica, što pak inhibira angiogenezu (129). Također, antiproliferativno djelovanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D na endotelne stanice u mikrookolišu tumora može inhibirati angiogenezu kao i već spomenuto djelovanje na regulacijske mehanizme koji kontroliraju angiogenezu (123). U stanicama karcinoma prostate 1,25(OH)<sub>2</sub>D smanjuje ekspresiju VEGF-a putem transkripcijske represije već spomenutog HIF-1

čimbenika (130). Suprimira i ekspresiju proangiogeničkih čimbenika IL-8 putem aktivacije NfκB.

Studije su pokazale da je u kolorektalnom karcinomu ekspresija COX2 povezana s ekspresijom VEGF-a, angiogenezom i mortalitetom (131). COX2 ubrzava proizvodnju PGE<sub>2</sub>, a u kolorektalnom karcinomu su veće količine PGE<sub>2</sub> nađene u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo. Način na koji ovako nastao PGE<sub>2</sub> stimulira angiogenezu, a time i potiče progresiju tumora mogao bi biti pojačanom sintezom HIF-1α proteina u tumorskim stanicama (132). Budući da 1,25(OH)<sub>2</sub>D potiskuje ekspresiju COX2, uz izravan supresivni učinak na proangiogenične čimbenike djeluje i neizravno.

1,25(OH)<sub>2</sub>D  **smanjuje invazivnost i metastatski potencijal**  mnogih zloćudnih stanica.

Jedan od mehanizama kojim to postiže je inhibicijom angiogeneze, što je već detaljno objašnjeno. Drugi je način regulacijom ekspresije ključnih molekula odgovornih za invazivnost i metastaziranje kao što su komponente sustava aktivatora plazminogena (PA) i matriks metaloproteinaza (MMPs), smanjenom ekspresijom tenascina-C, proteina koji potiče rast, invazivnost i angiogenezu, kočenjem ekspresije α6 i β4 integrina i pojačanom ekspresijom *E-kadherina*, tumor-supresorskog gena čija je ekspresija inverzno povezana s metastatskim potencijalom (25,123,133–137).

1,25(OH)<sub>2</sub>D utječe na  **urođenu i stečenu imunost**  u crijevima (68,121). Svoj učinak ostvaruje poticanjem ekspresije CAMP-a, glavne komponente urođenog imuniteta (68).

Litokolična kiselina, analog vitamina D, smanjuje aktivnost NFκB putem VDR-a. NfκB obuhvaća obitelj ubikvitarnih inducibilnih transkripcijskih faktora koji su važni regulatori urođenog imunološkog odgovora i upale. U uvjetima mirovanja većina NFκB dimera je vezana na specifične inhibitorne proteine IκB. Proupalni signali aktiviraju NFκB fosforilacijom i degradacijom inhibitornih IκB proteina, a zatim dolazi do translokacije slobodnog NfκB u

jezgru, što dovodi do aktivacije transkripcije proupalnih citokina, kemokina i antiapoptotičkih čimbenika. Zanimljivo je da za razliku od normalnih stanica zloćudne stanice imaju povećane razine aktiviranog NfκB-a (123,138–142). 1,25(OH)<sub>2</sub>D izravno modulira aktivnost NFκB-a u mnogim stanicama (123).

Istraživanja su pokazala da u miševa kojima nedostaje VDR smanjena je i razina proteina IκB koji inhibira NFκB. Primjena antagonista VDR-a u stanicama kolorektalnog karcinoma dovodi do *up-regulacije* aktivnosti NFκB smanjenjem razine IκB-a, što govori u prilog tome da ligandi VDR-a suprimiraju aktivaciju NfκB-a (143,144).

#### 1.4.4.2. VDR i rak debelog crijeva

Kao što je već spomenuto, istraživanja su otkrila prisutnost 1α-hidroksilaze i VDR receptora u većini stanica ljudskog organizma te u stanicama nekih tumora, kao što su stanice kolorektalnog karcinoma (51,75). VDR receptor regulira ciljne gene koji induciraju diferencijaciju i apoptozu te inhibiraju proliferaciju, angiogenezu i metastaziranje, odnosno regulira ključne mehanizme odgovorne za tumorski rast (119,126,145–149). Ekspresija VDR receptora je varijabilna. U normalnom tkivu crijeva slabo je eksprimiran i to uglavnom u dobro diferenciranim stanicama kripti (150). U tkivu kolorektalnog karcinoma je pak jače eksprimiran nego u normalnom tkivu, ali samo u tkivima tumora niskog gradusa. U slabo diferenciranim tumorima ekspresija VDR-a je niska ili je nema (74,109,151–154). Da bi 1,25(OH)<sub>2</sub>D ostvario svoj učinak, potrebna je prisutnost funkcionalnog VDR receptora. Istraživanja su pokazala povezanost između izražaja VDR receptora i inhibicije rasta kolorektalnog karcinoma (155). Nedostatak VDR-a povezan je s hiperproliferacijom stanica kolorektalnog karcinoma (151). Promjena ekspresije VDR-a je važan mehanizam koji regulira učinak 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Ovaj mehanizam mogao bi biti i klinički važan u liječenju kolorektalnog karcinoma jer je u

uznapredovalom kolorektalnom karcinomu smanjena ekspresija VDR receptora, što bi moglo utjecati na učinak primjene kalcitrola i njegovih analoga (25). Smanjenja ekspresija VDR-a zamijećena u uznapredovalim stadijima kolorektalnog karcinoma može se objasniti djelovanjem SNAI 1 i 2 transkripcijskih čimbenika koji sudjeluju u procesima tijekom embrionalnog razvoja te tumorskim procesima. Visoka ekspresija navedenih čimbenika, koja je uočena u kolorektalnim tumorima, dovodi do razvoja EMT-a (epitelno-mezenhimalna tranzicija), što rezultira dediferencijacijom tumora i stvara preduvjet za metastaziranje (109). Glavni događaj u ovom procesu je represija E-kadherina, važnog supresor gena. Osim toga, SNAI čimbenici inhibiraju proliferaciju stanica te stvaraju rezistenciju na apoptozu.

Vidljivo je da 1,25(OH)<sub>2</sub>D svoj biološki učinak ostvaruje putem VDR-a pa se pretpostavlja da bi polimorfizmi *VDR* gena mogli imati važnu ulogu u pojavi mnogih bolesti pa i karcinoma.

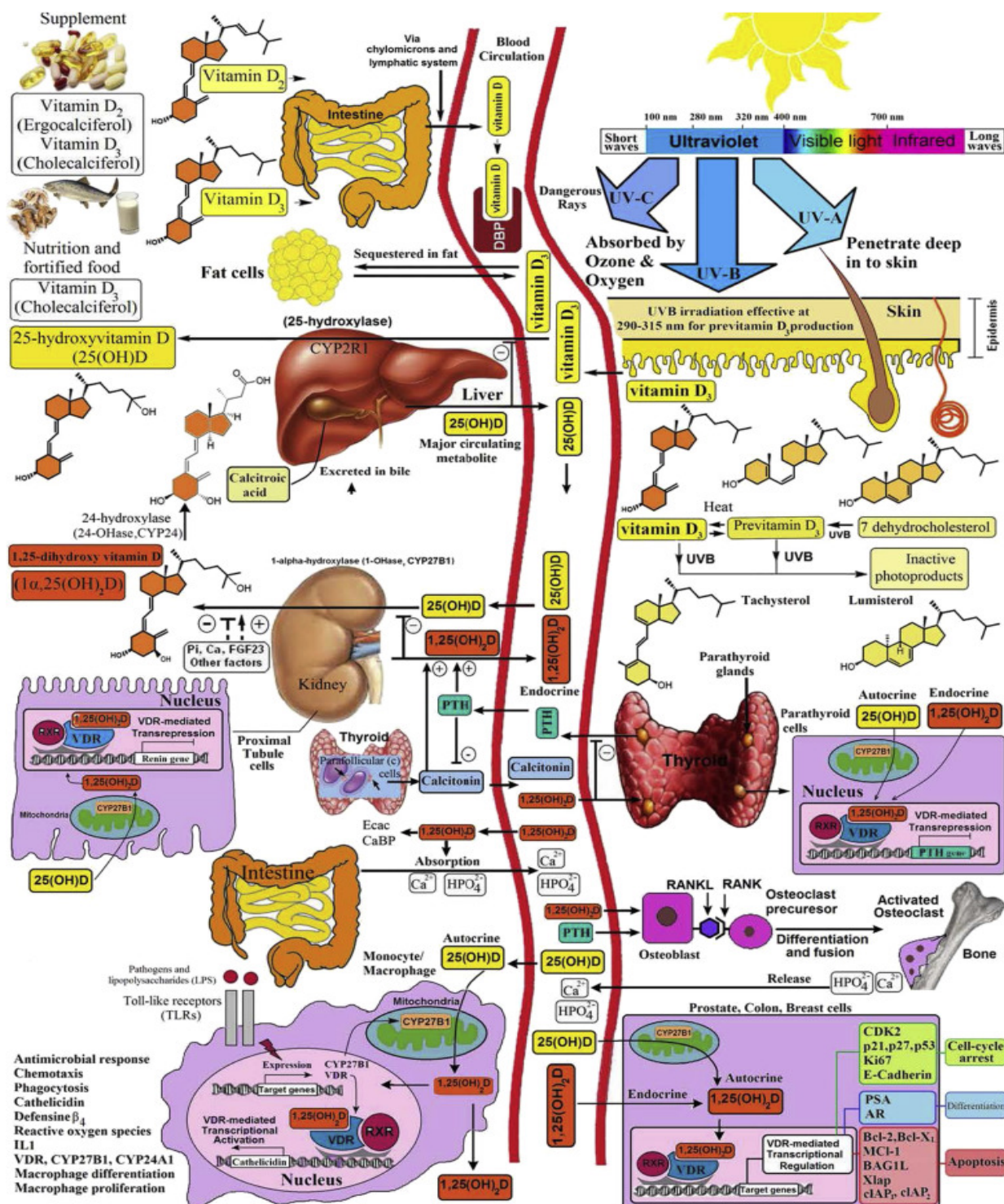
Provedena su brojna epidemiološka istraživanja o povezanosti polimorfizama *VDR* gena i malignih bolesti (156).

Najekstenzivnije su istraživani polimorfizmi gena koji utječu na afinitet za vitamin D (*FokI*, *BsmI*, *TaqI*, *Apal* i *Cdx2*) (157). Dok su neki od navedenih polimorfizama nefunkcionalni, polimorfizam gena *FokI* dovodi do stvaranja VDR proteina kraće strukture i promijenjene funkcije zbog čega je velik broj istraživanja usmjeren upravo na ovaj polimorfizam (158).

Međutim, rezultati istraživanja o povezanosti polimorfizama gena *FokI* i rizika za rak crijeva su inkonzistentni, pokazuju pozitivnu, negativnu ili pak ne nalaze povezanosti između tog polimorfizma i raka debelog crijeva (159,160). Nije nađena povezanost ni između VDR polimorfizama *FokI*, *Cdx2*, *TaqI* i *VDR-5132* i mortaliteta od raka debelog crijeva (161).



Slika 2. Sinteza, metabolizam i mehanizmi djelovanja vitamina D



Holick MF. Cancer, sunlight and vitamin D *J Clin Transl Endocrinol.* 2014 Oct 5;1(4):179-186.

#### 1.4.4.3. Analози vitamina D

Budući da su brojna eksperimentalna istraživanja pokazala kako vitamin D posjeduje značajna antitumorska svojstva, razvijeni su brojni analози kolekalciferola s namjerom da se pojačaju pozitivna svojstva kolekalciferola te reducira toksičnost, odnosno smanji mogućnost nastanka hiperkalcemije, jedine nuspojave kolekalciferola (162–165). Analози vitamina D nastali su manjim strukturnim modifikacijama postraničnog lanca kalцитriola na poziciji C17. Ipak većina kliničkih ispitivanja analoga vitamina D provedena je s kalцитriolom jer je dostupan i u oralnom obliku i u injekcijama. Najveća prepreka u provođenju studija s analogima vitamina D bila je zabrinutost zbog moguće toksičnosti ovih lijekova u oboljelih od malignih bolesti. Studije su pokazale da se kalцитriol može primjenjivati i u visokim dozama ako se primjenjuje intermitentno. Neki od analoga vitamina D su seokalcitol, inekalcitol i parikalcitol i najviše su ispitivani u bolesnika s rakom prostate i dojke (164,166). U prekliničkim istraživanjima pokazali su protutumorski učinak te je manja vjerojatnost da uzrokuju hiperkalcemiju od kalцитriola. Pokazali su i sinergistički učinak kad je 1998. provedena faza istraživanja seokalcitola u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva i dojke. Nije uočen antitumorski učinak (166). Iako su analози vitamina D pokazali učinkovitost na staničnim modelima, u kliničkim istraživanjima nisu pokazali značajan antitumorski učinak (123). Kao glavni razlog navodi se primjena analoga vitamina D u malim dozama s kojima se potencijalni antitumorski učinak ne može očekivati. Takve doze korištene su da bi se smanjila vjerojatnost pojave hiperkalcemije. Da bi se mogle provesti adekvatne kliničke studije o učinku analoga vitamina D u malignim bolestima, potrebno je definirati i zadovoljiti nekoliko uvjeta: definirati maksimalnu podnošljivu dozu kalцитriola, dozu koja će se koristiti u kliničkim istraživanjima faze II, te optimalnu biološku dozu. To je neophodno za provođenje

randomiziranih studija faze II s kalcitriolom i kemoterapijom, a potom i studija faze III (123,163).

#### 1.4.4.4. Vitamin D i kemoterapija

Istraživanja su pokazala da vitamin D ima sličnu biološku aktivnost kao CaSR, G-proteinski receptor koji kontrolira proliferaciju i diferencijaciju u epitelnim stanicama kolona te u stanicama raka debelog crijeva (115–119).

Timidilat sintetaza (TS) je ključni enzim za *de novo* sintezu DNK te je također ciljno mjesto djelovanja antimetabolita 5-fluorouracila (5-FU) koji je temeljni lijek u liječenju raka debelog crijeva sam i u kombinaciji. 5-FU blokira aktivnost TS-a, ometa sintezu DNK i potiče staničnu smrt. Mnoge vrste tumora pojačanom ekspresijom TS-a smanjuju djelovanje 5-FU i time stvaraju rezistenciju na ovaj lijek. Taj mehanizam rezistencije izražen je i u raku debelog crijeva (167,168). Aktivacija CaSR u stanicama raka debelog crijeva dovodi do smanjene ekspresije TS-a i time pojačane osjetljivosti na 5-FU .

CaSR gen ima dva promotora (P1 i P2) od kojih svaki ima vezno mjesto za vitamin D(167). U stanicama kolorektalnog karcinoma vitamin D potiče transkripcijsku aktivnost promotora i ekspresiju CaSR proteina (116).

Aktivacija CaSR ekstracelularnim  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicama kolorektalnog karcinoma potiče osjetljivost na 5-FU te smanjuje ekspresiju TS-a (167). Da vitamin D ostvaruje svoju aktivnost putem CaSR dokazuje i istraživanje na kulturama stanica sa smanjenom ekspresijom CaSR u kojima primjena vitamina D nije dovela do očekivanog učinka (119), odnosno time se nije uspjela povezati biološka aktivnost vitamina D s funkcijom CaSR.

Sinergistički učinak  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  i njegovih analoga s različitim citostaticima, uključujući preparate platine, taksane i interkalirajuće agense, je istraživani je na staničnim modelima.

Takve kombinacije su pokazale pojačanu antitumorsku aktivnost. Kombinacija s preparatima platine pokazala se učinkovita na staničnim linijama raka dojke, prostate i karcinoma pločastih stanica, no molekularni mehanizmi takva sinergističkog učinka nisu razjašnjeni (169–172). Pojačani učinak je najizraženiji ako se vitamin D primjenjuje prije ili istodobno s primjenom citostatika.

#### 1.4.4.5. Djelovanje vitamina D *in vivo*

Uz brojna istraživanja na staničnim i životinjskim modelima provedena su istraživanja i o učinku vitamina D na tkivo crijeva u ljudi. U dvostruko slijepom randomiziranom istraživanju ispitivan je učinak primjene 2 g kalcija s 800 ij vitamina D ili bez njega u odnosu na placebo tijekom šest mjeseci u bolesnika sa sporadičnim adenomina debelog crijeva. Biopsijom normalne sluznice rektuma imunohistokemijski su određivani biomarkeri za koje se smatra da utječu na rizik oboljevanja od raka debelog crijeva. Rezultati su pokazali pozitivan učinak vitamina D i kalcija na navedene biomarkere u zdravom tkivu (173).

#### 1.4.5. Epidemiološka i klinička istraživanja

Objavljeno je više od 3000 studija koje su istraživale povezanost vitamina D s incidencijom zloćudnih bolesti te s njihovom prognozom (174). Većina od njih upućuje na inverznu povezanost vitamina D te incidencije i mortaliteta od zloćudnih bolesti. Ta povezanost je najjača za 25(OH)D, najbolji pokazatelj statusa vitamina D u organizmu, dok je puno slabija za dnevni unos i nadoknadu vitamina D. Najjača povezanost između vitamina D i zloćudnih bolesti postoji upravo za rak debelog crijeva.

#### 1.4.5.1. Vitamin D i incidencija raka debelog crijeva

Najuvjerljiviji dokazi o inverznoj povezanosti serumske koncentracije 25(OH)D i incidencije malignih bolesti postoje upravo za rak debelog crijeva. Godine 2011. objavljene su čak četiri metaanalize koje su obuhvatile istih sedam do deset objavljenih prospektivnih studija (39,175–177).

Lee i sur. u svoju metaanalizu uključili su po sedam prospektivnih studija za rak debelog crijeva te rektuma i rezultate vlastite studije *Physicians' Health Study*. Sve navedene studije određivale su 25(OH)D prospektivno, odnosno prije dijagnoze kolorektalnog karcinoma.

Rezultati *Physicians' Health Study* bili su u skladu s ostalih sedam prospektivnih studija koje su pokazale snažnu inverznu povezanost 25(OH)D i karcinoma rektuma iako u ovoj studiji ta povezanost nije dosegla statističku značajnost. Metaanaliza ovih osam studija svakako ide u prilog snažnoj inverznoj povezanosti s karcinomom rektuma dok je povezanost s rakom debelog crijeva znatno slabija (175).

Ma i sur. proveli su metaanalizu devet prospektivnih studija iz različitih zemalja koje su u svojim rezultatima objavile procjenu relativnog rizika za povezanost unosa vitamina D i koncentracije 25(OH)D te kolorektalnog karcinoma. Rezultati su pokazali snažnu inverznu povezanost kolorektalnog karcinoma s koncentracijom 25(OH)D i unosom vitamina D.

Touvier i sur. u svoju metaanalizu uključili su prospektivne studije koje su objavile izvorne podatke o povezanosti incidencije kolorektalnog karcinoma s unosom vitamina D (prehranom i suplementima), koncentracijom 25(OH)D, a uključili su i studije o polimorfizmima *VDR-a*. Rezultati su slični prethodnoj metaanalizi, što i ne iznenađuje jer su obje metaanalize uključile iste studije (176).

Do sličnog zaključka došli su i Gandini i sur. u svojoj metaanalizi devet prospektivnih studija o inverznoj povezanosti 25(OH)D i kolorektalnog karcinoma. Ova grupa autora analizirala je i

povezanost 25(OH)D s rakom dojke i prostate, ali na temelju analiziranih studija takva povezanost nije identificirana (177).

Uzimajući u obzir prethodne studije, na prvi pogled iznenađuje da su istraživanja o primjeni vitamina D u svrhu prevencije kolorektalnog karcinoma negativna. Postojeći dokazi o protektivnom učinku primjene vitamina D u svrhu prevencije raka debelog crijeva su nedostatni i inkonzistentni. Ni provedene kliničke studije, a ni metaanaliza intervencijskih studija o protektivnom učinku vitamina D nisu pokazale korist od nadoknade vitamina D u prevenciji raka debelog crijeva (177–181). U studiji *Women's Health Initiative (WHI)*, 36 282 postmenopausalne žene primale su u prosjeku 400 ij vitamina D i 1000 mg kalcija na dan ili placebo tijekom sedam godina, no nije bilo razlike u incidenciji kolorektalnog karcinoma u ove dvije skupine (182). Osim male doze vitamina D i kalcija, uzimanje suplemenata vitamina D i kalcija u placebo skupini, kratko vrijeme praćenja i određivanje koncentracije 25(OH)D kod malog broja ispitanika glavna su ograničenja istraživanja (121).

Metaanalizom je obuhvaćeno 18 kliničkih studija koje su uspoređivale primjenu vitamina D ili placeba, no nije utvrđena razlika u incidenciji zloćudnih bolesti ukupno, kao ni prema sijelima, uključujući i rak debelog crijeva (183).

Ako pak bolje analiziramo ove studije, takvi rezultati ne iznenađuju jer je primarni cilj ovih istraživanja bio učinak vitamina D na zdravlje kostiju, a ne na incidenciju pojedinih zloćudnih bolesti. Usto, većina ispitanika bile su žene starije dobi s deficijencijom vitamina D (157,183). U siječnju 2019. objavljeni su rezultati studije VITAL koja je obuhvatila 25 871 ispitanika. Ovo multicentrično, randomizirano, placebo-kontrolirano istraživanje je uz vitamin D u dozi od 2000 ij na dan primjenjivalo i omega-3 masne kiseline. Primarni cilj istraživanja bilo je smanjenje incidencije zloćudnih bolesti i kardiovaskularnih bolesti. Sekundarni ciljevi bili su smanjenje incidencije malignih bolesti po sijelima i mortaliteta od raka. Studija nije pokazala

korist od primjene vitamina D u dozi od 2000 ij u odnosu na primarni cilj i sekundarne ishode (184).

Iz navedenog je vidljivo da nedostaju prava prospektivna istraživanja o primjeni vitamina D u svrhu primarne prevencije raka debelog crijeva. Osim što je za takva istraživanja potreban velik broj ispitanika, ona zahtijevaju i dugo razdoblje praćenja da bi se zamijetila razlika u incidenciji, a ostaje i otvoreno pitanje optimalne doze vitamina D koja bi se primjenjivala.

#### 1.4.5.2. Vitamin D i mortalitet od raka debelog crijeva

Mnogobrojne različito dizajnirane studije analizirale su povezanost serumske koncentracije 25(OH)D s mortalitetom od malignih bolesti ukupno te s mortalitetom određenog sijela karcinoma. Velik broj tih studija kasnije je analiziran u metaanalizama.

Rezultati većine njih pokazuju da više koncentracije serumskog 25(OH)D upućuju na bolju prognozu raka debelog crijeva. Provedene studije razlikuju se prema razdoblju u kojem je određivana koncentracija 25(OH)D, odnosno u znatnom dijelu studija mjerenje je provedeno pri dijagnozi raka debelog crijeva zbog čega nije moguće isključiti da je hipovitaminoza D posljedica narušenog zdravlja (185,186). No i studije u kojima je 25(OH)D određivan predijagnostički pokazale su bolju prognozu raka debelog crijeva uz više koncentracije 25(OH)D (102,179,187,188). U nastavku će detaljnije biti opisane najvažnije metaanalize te studije s velikim brojem ispitanika.

Prva velika metaanaliza objavljena 2011. obuhvatila je 25 dotad objavljenih prospektivnih istraživanja koja su ispitivala prognostičku ulogu vitamina D u zloćudnim bolestima.

Niske koncentracije 25(OH)D u serumu imale su negativnu prognostičku ulogu u pet kohorti koje su uključile bolesnike s rakom dojke (jedna studija), rakom debelog crijeva (dvije studije), rakom prostate i melanomom (189).

Metaanaliza koju su proveli Maalmi i sur. objavljena je 2014. i uključila je pet studija s ukupno 2330 ispitanika oboljelih od raka debelog crijeva, Studija je analizirala smrtnost od raka debelog crijeva ovisno o koncentraciji 25(OH)D. Vrijednost 25(OH)D bile su razvrstane u pet kategorija. Ispitanici s koncentracijom 25(OH)D u najvišoj kategoriji imali su manji mortalitet od onih u najnižoj kategoriji (190).

Danska studija koja je obuhvatila tri velike kohorte analizirala je povezanost genetski uvjetovane niske koncentracije 25(OH)D s ukupnim mortalitetom te specifičnim uzrocima smrtnosti. Studija je obuhvatila gotovo sto tisuća ljudi s genskim varijantama *DHCR7* za *CYP2R1* za koje se zna da utječu na koncentraciju 25(OH)D, a za trećinu ispitanika bila je poznata i koncentracija 25(OH)D. Niske vrijednosti 25(OH)D bile su povezane s višim ukupnim mortalitetom te mortalitetom od raka. Analizom ovih rezultata smanjila bi se ukupna smrtnost od raka za 30 posto kad bi vrijednosti 25(OH)D bile 20 nmol/L više, ali gledajući pojedina sijela karcinoma, takva povezanost nije uočena za rak debelog crijeva (191).

Retrospektivna studija provedena na uzorcima krvi 250 bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva evaluirala je utjecaj koncentracije 25(OH)D, određivane unutar mjesec dana od dijagnoze s preživljenjem. Koncentracije 25(OH)D bile su podijeljene u dvije kategorije, suficijentne iznad 75 nmol/L te deficijentne ispod 75 nmol/L. Više koncentracije 25(OH)D pri dijagnozi bile su povezane sa statistički značajnim boljim preživljenjem (192).

Istraživanje Zgaga i sur. prospektivno je pratilo 1598 bolesnika s rakom debelog crijeva I.-III. stadija. Ispitivali su povezanost 25(OH)D, određenog postoperativno, s preživljenjem prema



stadiju bolesti te interakciju 25(OH)D s polimorfizmima *VDR*. U ovoj studiji postoperativna koncentracija 25(OH)D bila je povezana s klinički značajnim boljim preživljenjem (186).

Mali je broj opservacijskih studija o učinku primjene vitamina D u bolesnika s rakom debelog crijeva te nije uočeno povoljno prognostičko djelovanje u bolesnika koji su uzimali vitamin D u obliku suplemenata. Takvi su rezultati i očekivani jer je riječ o opservacijskim studijama, a ne prospektivnim kliničkim istraživanjima u kojima su podaci o primjeni suplemenata dobiveni anamnestički nakon utvrđene dijagnoze (96,193,194).

Tri randomizirane studije pokazale su statistički neznačajno niži mortalitet od raka uz primjenu vitamina D. Jedna od njih nije pokazala nikakvu razliku u odnosu na mortalitet od raka debelog crijeva, međutim ove studije nisu imale dovoljnu snagu da dokažu pozitivan učinak vitamina D na smanjenje mortaliteta (96,193–195).

Potkraj 20. stoljeća Trivedi i sur. proveli su randomiziranu kliničku studiju u Velikoj Britaniji na gotovo tri tisuće ispitanika, žena i muškaraca starijih od 65 godina. Cilj istraživanja bio je ispitati učinak primjene 100 000 ij kolekalciferola svaka četiri mjeseca tijekom pet godina na incidenciju prijeloma i ukupni mortalitet po uzrocima. Studija je pokazala učinak vitamina D u prevenciji prijeloma, no nije pokazala statistički značajnu korist u smanjenju mortaliteta od zloćudnih bolesti kao ni od raka debelog crijeva (96).

Studija Avenella i sur. pratila je 5292 ispitanika, starijih od 70 godina, s ranijim prijelomima, koji su bili randomizirani u skupinu koja je primala kolekalciferol 800 ij dnevno s kalcijem ili bez njega te placebo tijekom najviše pet godina. Praćenje je trajalo do tri godine nakon završetka intervencije. Cilj istraživanja bio je ispitati učinak vitamina D i kalcija na opću smrtnost, smrtnost od raka i kardiovaskularnih bolesti. Rezultati nisu pokazali pozitivan učinak vitamina D na navedene ishode (193).

Metaanaliza koja je uključivala i ove navedene studije pokazala je da je primjena vitamina D povezana sa smanjenim mortalitetom od raka, no mišljenje je da bi navedeno moglo biti posljedica slučajnosti (183,184,196).

Još jedno istraživanje provedeno u Velikoj Britaniji u bolesnica starijih od 55 godina s rakom dojke, crijeva, pluća, jajnika i maternice, a koje su uzimale supleme vitamina D, ustanovilo je da je korištenje suplemenata vitamina D propisanih prije dijagnoze karcinoma povezano s neznačajno manjim mortalitetom od raka dojke, debelog crijeva, jajnika i maternice (197).

Godine 2012. objavljeni su i rezultati istraživanja provedenog na 50 bolesnika s novootkrivenim rakom debelog crijeva stadija II.-IV. Ispitanici su primali 2000 ij kolekalciferola tijekom šest mjeseci te im je određivana koncentracija 25(OH)D nakon 3 i 6 mjeseci.

Prosječna početna koncentracija 25(OH)D iznosila je 43,6 nmol/L. Iako je nakon šest mjeseci prosječna koncentracija 25(OH)D iznosila 84,4 nmol/L, porast 25(OH)D u krvi > 25 nmol/L nakon 3 mjeseca zabilježen je kod samo 39 posto bolesnika na kemoterapiji, ali u 92 posto onih koji nisu primali kemoterapiju. Slični rezultati dobiveni su i nakon šest mjeseci. Rezultati ovog istraživanja upućuju na smanjeni odgovor na supleme vitamina D u bolesnika na kemoterapiji, odnosno u skupini bolesnika nije došlo do očekivanog porasta koncentracije 25(OH)D (198). Ni ova studija kao cilj istraživanja nije imala preživljenje bolesnika te nam ne pruža nikakve informacije o kliničkoj koristi primjene vitamina D. Osim toga bolesnici nisu bili grupirani prema stadiju bolesti, a i ograničena je izrazito malim uzorkom.

U sklopu velike studije Intergroup N9741 provedena je i analiza koncentracije 25(OH)D u više od 500 bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva. Osim visoke prevalencije hipovitaminoze D u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva, istraživanje je pokazalo da su bolesnici koji su u prvoj liniji liječenja primali FOLFOX protokol imali bolje preživljenje uz više koncentracije 25(OH)D, dok su oni koji su primali protokol IFL protokol imali lošije

preživljenje uz više koncentracije 25(OH)D. Zbog malog broja ispitanika autori ostavljaju mogućnost da je ovaj nalaz slučajan (185).

Godine 2016. objavljeni su rezultati studije koja je uključivala 453 bolesnika s novodijagnosticiranim rakom debelog crijeva stadija II. Cilj je bio ispitati povezanost upotrebe suplemenata vitamina D na kvalitetu života, povrat bolesti i mortalitet tijekom dvije godine. Iako su preživjeli ispitanici koji su uzimali suplemente vitamina D nakon dvije godine imali bolju kvalitetu života, upotreba suplemenata nije imala nikakav učinak na preživljenje ili povrat bolesti (195).

U tijeku je multicentrična, randomizirana studija faze II NCT01516216 u bolesnika s mCRC-om koji će primati standardnu kemoterapiju uz 400 iJ vitamina D, odnosno 4000 iJ. Primarni cilj je vrijeme do progresije bolesti, a planira se uključiti 120 bolesnika (199). Iako je uzorak mali, u sklopu istraživanja određivat će se koncentracija 25(OH)D u krvi, što je svakako prednost ovakvog istraživanja. Prvi rezultati ovog istraživanja (SUNSHINE), prezentirani na ASCO-u 2017. godine pokazali su dulji PFS u skupini bolesnika koji su primali visoku dozu vitamina D (200).

## 1.5. Svrha rada

Eksperimentalni i epidemiološki dokazi o protektivnom učinku vitamina D na rak debelog crijeva su brojni, no zbog nedostatka jasnih dokaza o pozitivnom učinku vitamina D u ljudi, liječenje deficijencije vitamina D te primjena suplemenata u oboljelih od raka debelog crijeva nije uključena u standardne preporuke. Nema jasnih dokaza u primarnoj i sekundarnoj prevenciji raka debelog crijeva, a također nema pouzdanih dokaza o primjeni vitamina D u svrhu poboljšanja prognoze u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva. Postojanje

takvih dokaza opravdalo bi primjenu vitamina D, dostupnog, jeftinog i netoksičnog vitamina u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva, odnosno moglo bi se bolesnicima produžiti život uz održanje kvalitete života, što bi bilo od velike kliničke važnosti. Iako se u posljednjih 20-ak godina medijan preživljenja oboljelih od metastatskog raka debelog crijeva udvostručio, bolest i dalje ostaje neizlječiva, a i bolesnici sve češće posežu za dodatnim metodama liječenja. Upravo u bolesnika s mCRC-om je korist od viših serumskih koncentracija 25(OH)D najveća, a prevalencija deficijencije najviša, neovisno o tome je li ona odraz lošeg općeg stanja organizma. Stoga bi samo dobro dizajnirane, velike, policentrične, ekonomizirane kliničke studije mogle opravdati liječenje deficijencije vitamina D u svrhu poboljšanja ishoda bolesti. Takve su studije teško provedive, što je vidljivo iz činjenice da nema velikih intervencijskih studija u ovoj populaciji. Jedan od razloga mogao bi biti i nedostatak interesa farmaceutske industrije za ovakva istraživanja.

Svrha ovog istraživanja je pokušati procijeniti učinak primjene vitamina D u dozi 2000 ij na prognozu metastatskog raka debelog crijeva te odrediti učinak navedene doze vitamina D na razinu hipovitaminoze u bolesnika na kemoterapiji. Rezultati randomiziranog prospektivnog kliničkog istraživanja mogli bi opravdati primjenu vitamina D u svrhu poboljšanja prognoze. Budući da pojedina istraživanja upućuju na slabiji odgovor na kolekalciferol u bolesnika na kemoterapiji, potrebno je objektivno procijeniti učinak primjene kolekalciferola u dozi od 2000 ij na serumsku koncentraciju 25(OH)D, što je također svrha ovog istraživanja.

## **2. HIPOTEZA**

Primjenom kolekalciferola u dozi od 2000 ij dnevno u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva povećat će se ukupno preživljenje, vrijeme do progresije bolesti te će se povećati koncentracija 25(OH)D vitamina u krvi.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Opći cilj

Primarni cilj ovog istraživanja je analizirati povezanost primjene kolekalciferola 2000 ij dnevno uz standardno liječenje s ukupnim preživljenjem u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva.

#### 3.2. Specifični ciljevi

1. odrediti koncentraciju 25(OH)D vitamina, ukupnog kalcija i aktivnost alkalne fosfataze u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva,
2. odrediti utjecaj terapije kolekalciferolom na vrijeme do progresije bolesti uz standardno liječenje bolesnika s IV. stadijem metastatskog raka debelog crijeva,
3. odrediti utjecaj terapije kolekalciferolom na koncentraciju 25(OH)D.

## 4. MATERIJALI I METODE

Ispitivanje je provedeno u Klinici za onkologiju, KBC-a Zagreb u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: Molekularni biljezi u solidnim tumorima – Prediktivni i prognostički značaj; MZOŠ 108-1080058-0047, voditelj projekta je prof. dr. sc. Stjepko Pleština, specijalist interne medicine, uži specijalist internističke onkologije.

### 4.1. Ispitanici

Ovim prospektivnim, randomiziranim, otvorenim istraživanjem obuhvaćena su 72 ambulantna i hospitalizirana bolesnika s novodijagnosticiranim rakom debelog crijeva stadija IV. Bolesnici su uključivani redom kako su dolazili u Kliniku za onkologiju u razdoblju od studenog 2010. do srpnja 2013. Potpisali su informirani pristanak. Protokol istraživanja sukladan je etičkim smjernicama objavljenima 1975. u Helsinškoj deklaraciji. Istraživanje su odobrili Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Svim je ispitanicima na prvom pregledu, a prije početka specifičnog onkološkog liječenja, u sklopu rutinske obrade iz uzorka venske krvi (uzeto je 5 ml venske krvi) određena koncentracija 25(OH)D vitamina, ukupnog kalcija, fosfata te aktivnost alkalne fosfataze. O kemoterapijskom protokolu koji će se primjenjivati odlučivao je nadležni onkolog. Vrijednosti navedenih parametara mjerene su svaka tri mjeseca tijekom prve godine, a svakih šest mjeseci u drugoj godini. Bolesnici su praćeni tijekom razdoblja od pet godina ili do smrti. Prikupljeni su detaljni anamnestički podaci uključujući podatke o prebivalištu, terapiji i korištenju lijekova koji se izdaju bez recepta, a sadrže vitamin D. Ispitanicima je izmjerena

visina i težina te izračunat indeks tjelesne mase. Kao graničnu koncentraciju 25(OH)D vitamina u našem istraživanju odabrali smo 75 nmol/L u skladu s trenutnim stajalištima o preporučenoj vrijednosti vitamina D (81). Bolesnici s koncentracijom manjom od granične randomizirani su u dvije skupine: prva je dobivala 2000 ij dnevno (do kraja praćenja) uz odgovarajuću onkološku terapiju, a druga skupina samo odgovarajuću onkološku terapiju. Randomizacija je provedena s pomoću računalnog programa Urbaniak, G. C., & Plous, S. (2013) Research Randomizer (Version 4.0). Vrijeme do progresije bolesti definirano je vremenom od randomizacije do progresije bolesti ili smrti. Radiološku progresiju odredili smo prema RECIST 1.1. kriterijima.

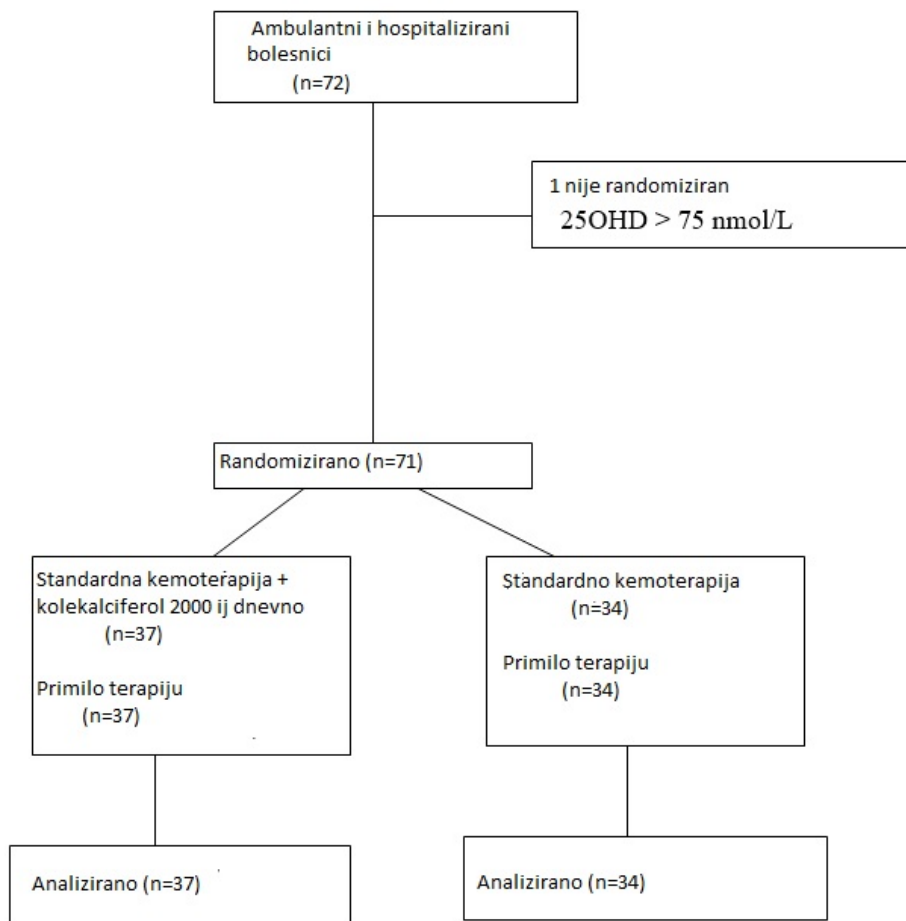
## 4.2. Materijali i metode

### 4.2.1. Mjerenje serumske koncentracije 25(OH)D

Za određivanje koncentracije 25(OH)D u ovom ispitivanju korištena je metoda kompetitivne elektroluminiscencije uređajem Cobas 6000cee (Roche). Određivanje koncentracije 25(OH)D provedeno je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.



Slika 2. Protokol uključivanja ispitanika u istraživanje



### 4.3. Statistička analiza

Veličina uzorka izračunata je pretpostavljajući  $\alpha=0,05$ ;  $1-\beta=0,8$  i relativno smanjenje rizika od 60 posto. Za procjenu razlike između skupina korišten je Mann-Whitneyjev test za kontinuirane varijable te  $\chi$ -kvadrat test za kategoričke varijable.

Za određivanje razlike u preživljenju između skupina korištene su Kaplan Meierove krivulje te njihov Log Rank test.

Kontinuirane varijable prikazane su kao srednje vrijednosti uz standardnu devijaciju (SD) ili medijani sa 25-75 % interkvartilnim rasponom, ovisno o distribuciji. Kategorijske varijable prikazane su u svojim apsolutnim frekvencijama te u relativnom udjelu. Razlike između grupa (prema registriranim varijablama) testirane su s pomoću Mann–Whitneyjeva testa koji nije ovisan o distribuciji (za kontinuirane varijable) te s pomoću Hi-kvadrat testa (za diskretne varijable). Normalnost distribucija varijabli ispitana je s pomoću Shapiro-Wilkova testa. Vrijednost P manja od 0,05 (obostrano) smatra se statistički značajnom. Za proračune i analizu korišten je Microsoft Excel 2010.

## 5.REZULTATI

Tablica 1. prikazuje obilježja ispitanika uključenih u studiju. Srednja dob ispitanika je bila 69 godina, bilo je 37 muškaraca i 35 žena. 52 bolesnika (72 %) su imala metastaze u jetri, od toga ih je 23 (32%) imalo samo jetrene metastaze. 90 % ih je primalo u prvoj liniji liječenja FOLFIRI protokol, 6% bolesnika je primalo sLV5FU, protokol, a protokol temeljen na oksaliplatinu je primalo 4 % bolesnika. U 30 bolesnika (42 %) tumor je bio smješten u sigmi, potom slijede rektum 18 %, poprečno debelo crijevo 15 %, cekum 11 %, uzlazno 8 % pa silazno debelo crijevo 6 %. Aritmetička sredina BMI iznosila je 25.8 kg/m<sup>2</sup>. Većina bolesnika dolazi iz Središnje Hrvatske ( 79 %), potom iz Istočne ( 14 % ), Južne (4 % ) te Gorske Hrvatske (3 %).

Tablica 1. Obilježja ispitanika

Dob (medijan, g.)	69 (24-79)
Spol	
M	37
Ž	35
Lokalizacija tumora	N
rektum	13 (18 %)
sigma	30 (42 %)
silazno debelo crijevo	4 (6 %)
poprečno debelo crijevo	11 (15 %)
uzlazno debelo crijevo	6 (8 %)

cekum	8 (11 %)
Sijelo metastaza	N (%)
jetra	52 (72 %)
samo jetra	23 (32 %)
pluća	27 (38 %)
ostalo	33 (46 %)
protokol	N
FOLFIRI	65 (90 %)
oksalipatina	3 (4 %)
sLV5FU	4 (6 %)
BMI (medijan, kg/m <sup>2</sup> )	25,8
25 (OH) D (nmol/l)	33,1
Prebivalište	N
Središnja Hrvatska	57 (79 %)
Istočna Hrvatska	10 (14 %)
Sjeverno hrvatsko primorje	0 (0 %)
Gorska Hrvatska	2 (3 %)
Južna Hrvatska	3 (4 %)

Tablica 2. prikazuje da nije bilo značajnih razlika prema dobi, spolu i lokalizaciji tumora između ispitivane i kontrolne skupine što je jedan od pokazatelja kvalitete ovog istraživanja. Također, nije bilo statistički značajne razlike između prosječne koncentracije 25(OH)D vitamina prilikom uključivanja u studiju (tablica 3).

Tablica 2. Obilježja bolesnika po skupinama ( podaci su prikazani medijanom i rasponom, odnosno postotkom od ukupnog broja ispitanika)

Varijabla	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina	značajnost (p)
n	34	37	
Dob (godine)	62 (56-65)	64 (56-71)	0,144
Spol (muški %)	21 (61,8 %)	15 (40,5 %)	0,074
Operacija			0,082
Da	31	28	
Ne	3	9	
Lokalizacija tumora			0,601
rektum	4 (12 %)	9 (24 %)	
sigma	14 (41 %)	16 (43 %)	
silazno debelo crijevo	3 (9 %)	1 (4 %)	
poprečno debelo crijevo	5 (14 %)	6 (16 %)	
uzlazno debelo crijevo	4 (12 %)	2 (5 %)	
cekum	4 (12 %)	3 (8 %)	
Sijelo metastaza			0,225
Jetra	26 (76 %)	26 (70 %)	
Samo jetra	15 (44 %)	8 (22 %)	
Pluća	11 (32 %)	16 (43 %)	
Ostalo	13 (38 %)	20 (54 %)	

Broj sjela metastaza			
1	19 (56 %)	17 (46 %)	
2	12 (35 %)	13 (35 %)	
> 2	3 ( 9 %)	7 (19 %)	
Bolesnici s jednim sijelom metastaza			
1 . JETRA (zahvaćenost i veličina promjena)	15 ( 44 %)	8 (22 % )	
oba režnja	9 ( 60 %)	4 (50 %)	
jedan režanj	6 (40 %)	4 (50 %)	
< 5 cm	9 (60 %)	4 (50 %)	
> 5 cm	6 (40 %)	4 (50 %)	
2. PLUĆA	3 (9 % )	2 (5 %)	
3. MEDIJASTINALNI L.Č.	1 (3 %)	0 (0 %)	
Bolesnici s ≥ 2 sjela			
jetra	26 (76 %)	26 (70 %)	
pluća	11 (32 %)	16 (43 %)	
l.č. abdomena	8 (24 %)	7 (19 %)	
peritoneum	3 (9%)	2 (5 %)	
gušterača	1 ( 3%)	0 (0 %)	
nadbubrežna žlijezda	1 (3 %)	0 (0 %)	
l.č. medijastinuma	0 (0 %)	1 (3 %)	
jajnik	1 (3 %)	1 (3 %)	
slezena	0 (0 %)	1 (3 %)	

			0,553
Protokol			
FOLFIRI	30 (88 %)	35 (94 %)	
oksaliplatina	2 (6 %)	1 (3 %)	
sLV5FU	2 (6 %)	1 (3 %)	
CEA	29,12 (9,04-89,89)	16,33 (4,83-171,93)	0,849

Samo jedan ispitanik je imao vrijednost koncentracije 25(OH)D veću od 75 nmol/L. 71 bolesnik (98.6 % ) je imao hipovitaminozu D različitog stupnja. Prema aktualnim preporukama 42 bolesnika (58 %) su imala insuficijenciju vitamina D, a njih 29 (40 %) deficijenciju (tablica 4., slika 4.). Srednja koncentracija 25(OH)D je bila 33.1 nmol/L (tablica 1) za obje skupine, u kontrolnoj skupini je bila 35 nmol/L, a u ispitivanoj 27 nmol/L (tablica 3). Slika 3 prikazuje kretanje prosječne koncentracije 25(OH)D u skupinama. U skupini bolesnika koji su primali kolekalciferol nakon 3 mjeseca je došlo do porasta 25(OH)D u krvi te je prosječna koncentracija iznosila 41 nmol/L, nakon 6 mjeseci prosječna koncentracija je iznosila 37 nmol L, nakon 9 mjeseci 35 nmol/L, a nakon 12 mjeseci 54 nmol/L. Maksimalna prosječna koncentracija 25(OH)D u krvi dosegnuta je nakon 18 mjeseci, a iznosila je 54 nmol/L, a minimalna nakon 24 mjeseca te je iznosila 17 nmol/L. U kontrolnoj skupini nakon 3 mjeseca se bilježi pad 25(OH)D u krvi te je prosječna koncentracija bila 25 nmol/L, nakon 6 mjeseci 22 nmol/L , nakon 9 mjeseci 25 nmol/L te nakon 12 mjeseci 31 nmol/L. Maksimalna prosječna koncentracija je i u kontrolnoj skupini dosegnuta nakon 18 mjeseci, a iznosila je 43 nmol/L te je potom došlo do pada koncentracije 25(OH)D te je nakon iznosila 26 nmol/L.

U tablici 4. prikazane su koncentracije fosfata i kalcija te aktivnost AP u obje skupine. U 10 (14%) bolesnika zabilježena je hiperkalcemija. Nakon tri mjeseca u 4 (6%) bolesnika je registrirana hiperkalcemija, nakon šest mjeseci u 2 (3%) bolesnika, a nakon devet mjeseci nije registrirana hiperkalcemija. Maksimalna koncentracija kalcija koja je izmjerena tijekom istraživanja je 3,37 mmol/L. Koncentracije fosfata su bile unutar referentnih vrijednosti, 16 (22%) bolesnika je imalo povišenu aktivnost AP.

PFS u obje skupine je iznosio 10.5 mjeseci (tablica 3). Nije bilo statistički značajne razlike u mortalitetu između skupina u periodu praćenja od 5 godina: HR 1.0064, 95% CI 0.3882–2.609, i P 0.9895. Medijan preživljenja je u ispitivanoj skupini bio 39 mjeseci, a u kontrolnoj 40 mjeseci (slika 5.).

Tablica 3. Prikaz vremena bez progresije bolesti po skupinama te prosječne koncentracije 25(OH)D u krvi (PFS je prikazan medijanom i rasponom, a 25(OH)D prosječnom koncentracijom i rasponom)

Varijabla	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina	p
PFS	10,5 (4-14)	10,5 (3-17)	1,000
25(OH)D (nmol/L)	35 (19,5-46,8)	27 (17-42)	0,313

*PFS- vrijeme bez progresije bolesti*

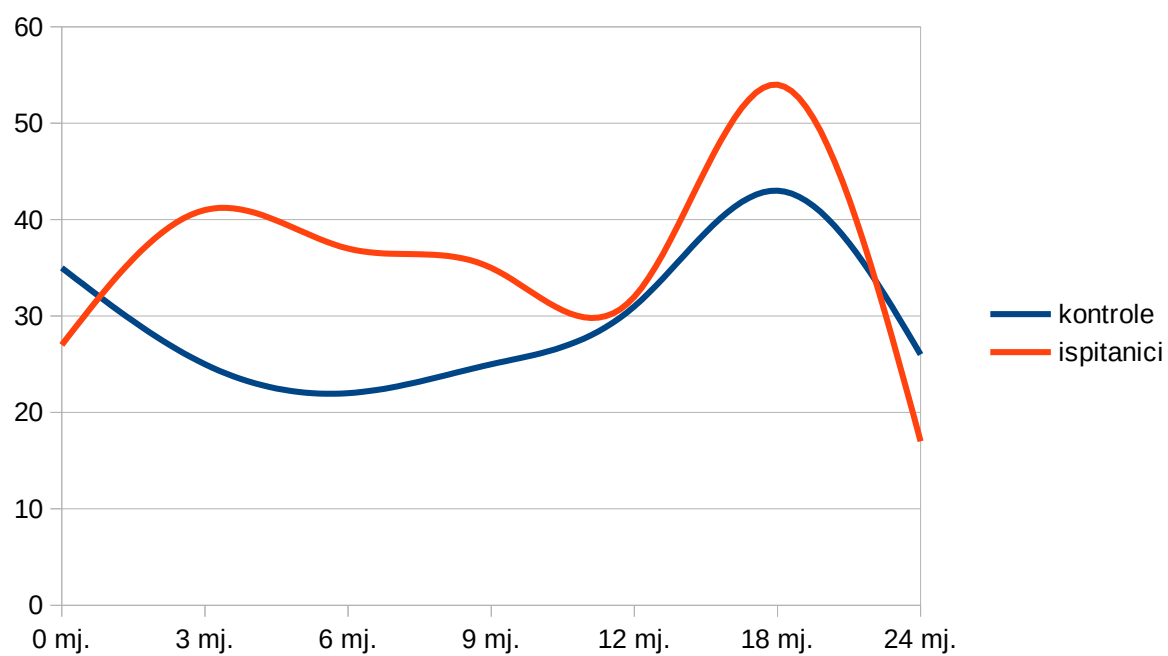
Tablica 4. Koncentracije vitamina D, kalcija, fosfata te aktivnost alkalne fosfataze,

<b>koncentracija 25(OH) D (nmol/L)</b>	<b>N</b>
> 75	1 (2 %)
25-75	42 (58 %)
<25	29 (40 %)
<b>Ca (mmol/L)</b>	<b>N</b>
2,14-2,53	62 (86 %)
> 2,53	10 (14 %)
< 2,14	0 (0 %)

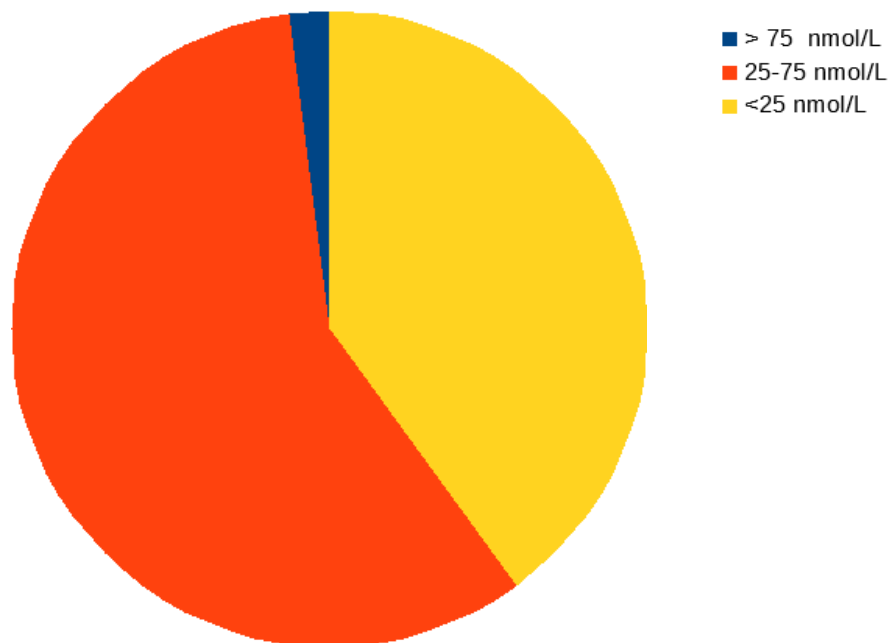


<b>PO4 (mmol/L)</b>	<b>N</b>
0,79-1,42	72 (100 %)
<b>AP (U/L)</b>	<b>N</b>
60-142	44 (61 %)
> 142	16 (22 %)
< 60	12 (17 %)

Slika 3. Promjene serumske koncentracije 25(OH)D

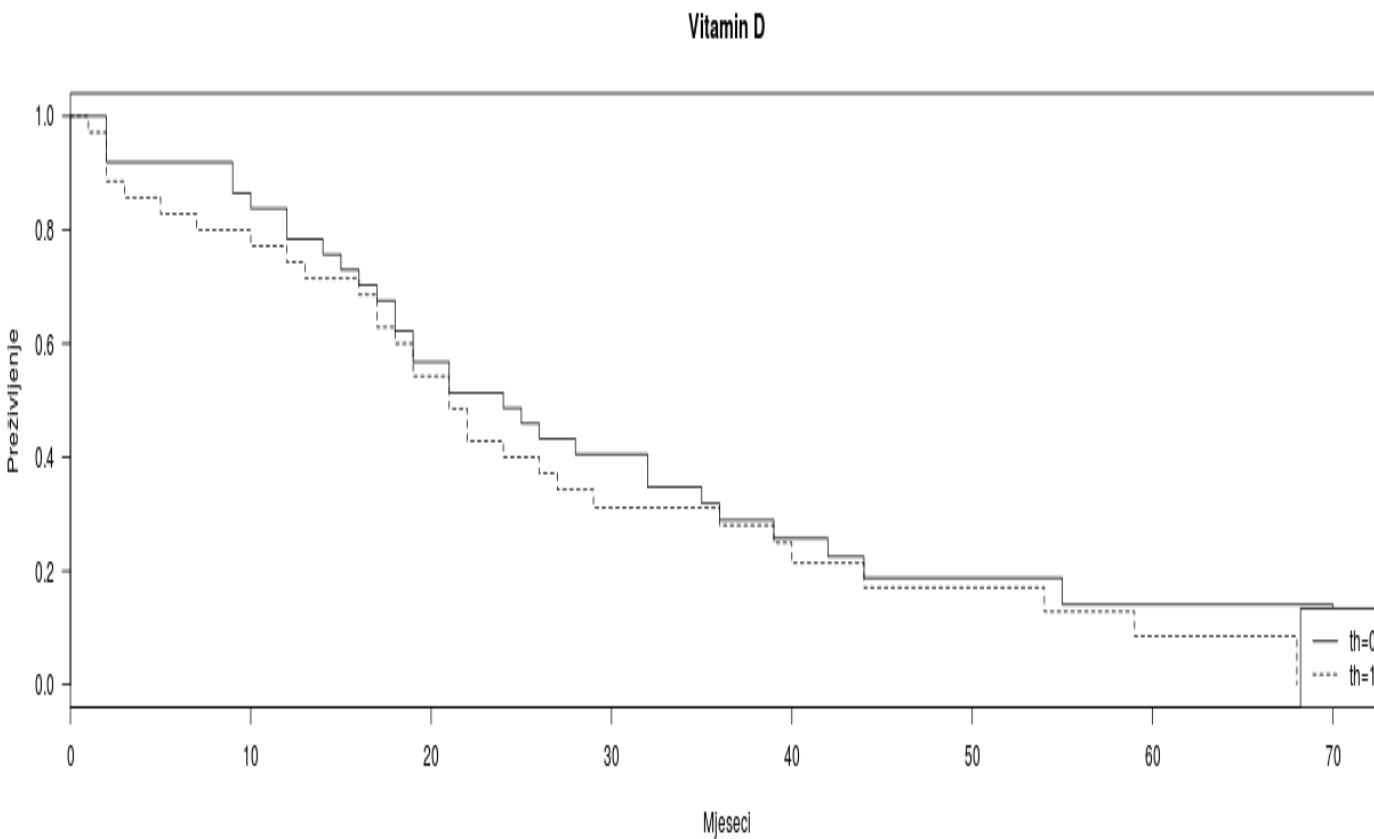


Slika 4. Raspodjela bolesnika prema koncentraciji 25(OH)D u krvi



*42 bolesnika (58 %) imaju insuficijenciju, 29 (40 %) deficijenciju, 1 bolesnik (2 %) ima uredan status 25(OH)D*

Slika 5. Kaplan - Meierova krivulja preživljenja



*Isprekidana crta označava ispitivanu skupinu, a puna crta kontrolnu. Nije bilo statistički značajne razlike u mortalitetu između skupina u petogodišnjem razdoblju praćenja: HR 1,0064, 95 % CI 0,3882– 2,609, i P 0,9895. Medijan preživljenja je u ispitivanoj skupini bio 39 mjeseci, a u kontrolnoj 40 mjeseci.*

## 6. RASPRAVA

Rezultati ovog prospektivnog, randomiziranog istraživanja su pokazali da nema razlike u ukupnom preživljenju u bolesnika s metastatskim rakom debeloga crijeva liječenima kemoterapijom uz dodatak kolekalciferola 2000 ij kroz dvije godine u odnosu na one liječene samo kemoterapijom. Također, nije bilo niti razlike u vremenu do progresije bolesti u kontrolnoj i ispitivanoj skupini.

Uzimajući u obzir postojeće dokaze o potencijalnom učinku vitamina D na prognozu raka debeloga crijeva prospektivne i randomizirane studije su ne samo opravdane nego i nužne (121,157) što je i glavna prednost ovog istraživanja. Istraživanje je bilo otvoreno, nije bilo placebo kontrolirano te je uključilo mali broj ispitanika iz samo jednog centra što je moglo utjecati na reprezentativnost uzorka, a to su ujedno i glavni nedostaci ovog istraživanja.

Na negativne rezultate mogla je svakako utjecati veličina uzorka, nedovoljna ustrajnost bolesnika te neadekvatna procjena pridržavanja terapije. Podatak o uzimanju preporučene terapije kolekalciferolom je dobiven isključivo na temelju anamnestičkih podataka, a ne upotrebom indirektnih metoda procjene ustrajnosti bolesnika koji se često koriste u kliničkim studijama (201).

Rezultati našeg istraživanja se razlikuju od rezultata studije SUNSHINE koja je pokazala bolji PFS u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva koji su uz FOLFOX kemoterapiju primali visoke doze vitamina D (4000 ij dnevno) u odnosu na one koji su primali standardne doze vitamina D (200). Ta studija u koju je bilo uključeno 120 bolesnika je kao primarni cilj imala upravo PFS te ne može odgovoriti na pitanje hoće li primjena vitamina D rezultirati u boljem ukupnom preživljenju.

Osim razlike u dozi kolekalciferola između ove dvije studije, studije se razlikuju i prema kemoterapijskom protokolu što je moglo utjecati na rezultat.

I u studiji Intergroup N9741 bolesnici koji su u prvoj liniji liječenja primali FOLFOX protokol imali su bolje preživljenje uz više koncentracije 25(OH)D, a oni koji su primali IFL protokol (baziran na irinotekanu) imali su lošije preživljenje uz više koncentracije 25(OH)D (185). U našem istraživanju 90 % bolesnika je primalo FOLFIRI protokol (baziran na irinotekanu) u prvoj liniji liječenja. Rezultati ovih studija se ne mogu izravno uspoređivati jer je riječ o različitim protokolima. Iako su oba temeljena na irinotekanu, IFL protokol je znatno toksičniji od FOLFIRI protokola što je moglo utjecati na loše preživljenje bolesnika u Intergroup N9741 studiji (185).

Svega 4 % bolesnika je u našem istraživanju primalo protokol temeljen na oksaliplatini te nije moguće analizirati eventualnu korist od primjene vitamina D uz FOLFOX protokol. Dosadašnji nam rezultati ukazuju na eventualnu korist od primjene kolekalciferola i viših serumskih koncentracija 25(OH)D uz FOLFOX protokol koji je u našem ispitivanju bio nedovoljno zastupljen. Tome u prilog govore i istraživanja na staničnim modelima koja su pokazala pojačan antitumorski učinak 1,25(OH)<sub>2</sub>D s preparatima platine (169).

Kao što je vidljivo iz rezultata primjenom 2000 ij kolekalciferola nije dosegnuta vrijednost 25(OH)D 75 nmol/L koja se smatra suficijentnom što je moguće utjecalo na negativan rezultat. Studija *Fakiha i sur.* je pokazala smanjen odgovor na terapiju kolekalciferolom u dozi 2000 ij u bolesnika na kemoterapiji, samo 39 % bolesnika u ovoj studiji je nakon 3 i 6 mjeseci postiglo porast serumske koncentracije 25(OH)D veći od 25 nmol/L u odnosu na 92 % bolesnika koji nisu primali kemoterapiju (198). Rezultati su u skladu s našim rezultatima.

Nakon 3 i 6 mjeseci primjene kolekalciferola u skupini ispitanika koja je primala kolekalciferol

prosječna koncentracija je sa 27 nmol/L porasla na 41 nmol/L , odnosno 37 nmol/L. Tek nakon 18 mjeseci terapije kolekalciferolom bilježi se porast veći od 25 nmol/L kad je postignuta maksimalna prosječna koncentracija od 54 nmol/L. Stoga je moguće da dnevna doza kolekalciferola od 2000 ij nije dovoljna da bi se postigao povoljan prognostički učinak u bolesnika na kemoterapiji.

Ipak, smatramo da je odabir doze od 2000 ij dnevno u našem istraživanju opravdan iz nekoliko razloga. Kao prvo, da bi se koncentracija 25(OH)D u krvi trajno održavala u optimalnom rasponu prema preporuci Endokrinološkog društva doza od 2000 ij se smatra dovoljnom (89). Studija *Fakiha i sur.* je uključila svega 50 bolesnika, vitamin D se primjenjivao kroz samo šest mjeseci, a rezultati su objavljeni u tijeku našeg istraživanja (198).

I u nedavno objavljenoj VITAL studiji je primjenjivana dnevna doza kolekalciferola iznosila 2000 ij izabrana na temelju ekstrapolacije ranijih podataka o potrebnoj dnevnoj dozi da bi se postigla optimalna serumska koncentracija 25(OH)D u zdravoj odrasloj populaciji (184).

Za razliku od navedenih istraživanja, studija SUNSHINE je u ispitivanoj skupini primjenjivala dozu od 4000 ij što je dvostruko više nego u navedenim ispitivanjima. Za sada nam podatci o utjecaju doze kolekalciferola 4000 ij na koncentraciju 25(OH)D nisu dostupni.

Važno je napomenuti da je tijekom studije periodično mjerena koncentracija 25(OH)D što nam je omogućilo analizirati povezanost primjene vitamina D, koncentracije 25(OH)D i prognoze.

Nije zamijećena razlika u promjeni koncentracije 25(OH)D između dviju skupina tijekom perioda od 24 mjeseca. Važno je istaknuti da je najviša prosječna koncentracija 25(OH)D zabilježena nakon 18 mjeseci od uključivanja u studiju u obje skupine, dakle i u onoj koja nije primala kolekalciferol. Moguće objašnjenje bi bila sezonska varijacija u koncentraciji 25(OH)D u organizmu. Naime, u 64 % bolesnika je koncentracija 25(OH)D nakon 18 mjeseci

određivana u ljetnim mjesecima kada je i očekivana koncentracija najviša. Izrazita insuficijencija, odnosno deficijencija vitamina D nakon 24 mjeseca terapije se može objasniti malim uzorkom kao posljedicom gubitka bolesnika iz praćenja zbog lošeg općeg stanja ili smrti.

Uz periodično mjerenje 25(OH)D mjerene su i koncentracije kalcija, fosfora te aktivnost AP. Tijekom istraživanja kao niti u VITAL studiji nije zabilježena hiperkalcemija kao posljedica primjene vitamina D (184). Tijekom vremena došlo je do normalizacije inicijalno povišene koncentracije kalcija u 10 bolesnika.

U istraživanju je prevalencija hipovitaminoze D iznosila 98.1 %, više nego u dosadašnjim istraživanjima u kojima se prevalencija hipovitaminoze D kreće oko 80 % (175,202,203). Također su i izmjerene i koncentracije 25(OH)D u naših ispitanika bile niže nego u ostalim studijama. Ovakav rezultat svakako zahtijeva potvrdu na većem i reprezentativnijem uzorku. Uzmemo li u obzir da nemamo podatke o prevalenciji hipovitaminoze D u Hrvatskoj, visoka prevalencija hipovitaminoze D u istraživanoj populaciji može biti i odraz stanja u općoj populaciji. Pojedina istraživanja su pokazala da upravo bolesnici u uznapredovaloj fazi raka debelog crijeva imaju bolje preživljenje uz više koncentracije 25(OH)D (204).

U bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva bi i mala prednost u preživljenju uz više koncentracije 25(OH)D i primjenom vitamina D bila klinički značajna. Uz dokaze koji upućuju na bolju prognozu ovih bolesnika uz više koncentracije 25(OH)D smjernice ipak ne preporučuju primjena vitamina D u svrhu poboljšanja prognoze raka debelog crijeva jer nedostaju velike randomizirane kliničke studije (205). Iako je vitamin D dostupan, netoksičan i financijski prihvatljiv takve kliničke studije su teško provedive iz više razloga. Jedan od razlog je i manjak interesa farmaceutske industrije (192).

Ovo istraživanje razlikuje se od dosadašnjih u nekoliko segmenata. Ovo je prvo prospektivno, randomizirano istraživanje koje je ispitalo: povezanost primjene vitamina D uz standardnu kemoterapiju, serumske koncentracije 25(OH)D te prognoze, što do sada nije učinjeno.

Nekoliko je razloga zašto još nemamo jasan odgovor o učinku vitamina D kod zloćudnih bolesti. Smatra se da dosadašnja randomizirana klinička istraživanja nisu na pravi način ispitala ovu hipotezu iz nekoliko razloga: neodgovarajući odabir učinkovite doze vitamina D, velika razlika u serumskim koncentracijama 25(OH)D pri randomizaciji, upitna suradljivost bolesnika s intervencijom, uzimanje suplemenata vitamina D u placebo skupini te vremenski odmak između početka bolesti i početka intervencije (206).

U budućnosti će svakako biti nužna multicentrična, randomizirana istraživanja na velikom broju ispitanika koja će ove rezultate potvrditi ili opovrgnuti.

Ostaje nerazjašnjeno i pitanje o potencijalnom utjecaju kemoterapije na odgovor na vitamin D. Zanimljivo bi bilo istražiti: razlikuje li se odgovor na vitamin D u bolesnika na kemoterapiji ovisno o stadiju bolesti te koja je optimalna dnevna doza vitamina D u bolesnika s rakom debelog crijeva na kemoterapiji.

Iako dosadašnja istraživanja upućuju na najveću korist od viših koncentracija 25(OH)D u bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti, postoje i dokazi koji upućuju na povoljan prognostički učinak vitamina D i u ranijim stadijima bolesti (186). Objavljeni su rezultati samo jedne studije u bolesnika s rakom debelog crijeva stadija II s pitanjem utjecaja primjene



vitamina D na povrat bolesti i mortalitet (195). I u ovoj skupini bolesnika potrebne su velike randomizirane kliničke studije.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Primjena 2000 ij kolekalciferola dnevno uz kemoterapiju kroz dvije godine u bolesnika s metastatskim rakom debeloga crijeva ne poboljšava ukupno preživljenje.
2. Primjena 2000 ij kolekalciferola dnevno uz kemoterapiju kroz dvije godine u bolesnika s metastatskim rakom debeloga crijeva ne poboljšava vrijeme bez progresije bolesti.
3. Primjenom 2000 ij kolekalciferola nije došlo do očekivanog porasta serumske koncentracije 25(OH)D.
4. U bolesnika s metastatskim rakom debeloga crijeva zabilježena je visoka prevalencija hipovitaminoze D.

## 8. SAŽETAK

Uvod: Istraživanja su pokazala da više koncentracije 25(OH)D u krvi smanjuju rizik za pojavu raka debelog crijeva. Bolesnici s metastatskim rakom debelog crijeva imaju često insuficijenciju D vitamina, ali utjecaj vitamina D na prognozu bolesti je još uvijek nerazjašnjen. U našem istraživanju smo analizirali povezanost primjene kolekalciferola u dozi od 2000 ij s preživljenjem bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom.

Ciljevi i metode istraživanja: U istraživanje je uključeno 72 bolesnika. Bolesnici s koncentracijom 25(OH)D < 75 nmol/L su randomizirani u dvije skupine : prva skupina je dobivala 2000 ij dnevno (do kraja praćenja) uz odgovarajuću onkološku terapiju, a druga samo odgovarajuću onkološku terapiju. Glavni cilj istraživanja bilo je ukupno preživljenje, a specifični ciljevi bili su vrijeme do progresije bolesti, prevalencija hipovitaminoze D te utjecaj kolekalciferola na serumsku koncentraciju 25(OH)D.

Rezultati: 98,1 % bolesnika je imalo hipovitaminozu D. Nije bilo razlike u OS i PFS među skupinama. Primjenom kolekalciferola u dozi 2000 ij nije došlo do adekvatnog porasta koncentracije 25(OH)D u krvi.

Zaključak: Većina bolesnika imala je hipovitaminozu D. Dodavanjem kolekalciferola 2000 ij dnevno kemoterapiji nismo poboljšali OS ni PFS.

## 9. SUMMARY

### Predictive Significance of Vitamin D in Colorectal Cancer Patients

Zrna Antunac Golubić, 2019.

**Introduction:** Some studies have demonstrated that higher baseline plasma levels of 25(OH)D are associated with a significant reduction in colorectal cancer (CRC) incidence. Patients with mCRC tend to be vitamin D insufficient, but the effect of vitamin D on the survival of mCRC patients still remains uncertain. In this study, we evaluated the association between cholecalciferol 2,000 IU daily supplementation and survival of mCRC patients.

**Aims and methods:** Seventy-two patients with mCRC were included. Seventy-one patients with 25(OH)D levels <75 nmol/L were randomized to receive standard chemotherapy or standard chemotherapy with cholecalciferol 2,000 IU daily for six months. The primary endpoint was overall survival (OS), and the secondary endpoints were progression-free survival (PFS) and prevalence of vitamin D insufficiency.

**Results:** All but one patient (98.6%) was vitamin D insufficient. There was no statistically significant difference in OS or PFS between those who received vitamin D supplements and controls.

**Conclusions:** The majority of patients with mCRC are vitamin D insufficient at the time of diagnosis. In our study, adding 2,000 IU of cholecalciferol daily for 2 yr to standard chemotherapy did not show any benefit in OS or PFS.

## 10. LITERATURA

1. registar za rak [Internet]. Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba - epidemiologija - prevencija - nezaraznih - bolesti/odjel - za - maligne - bolesti/>
2. Martínez ME. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer*. 2005;166:177–211.
3. Rosenberg L, Louik C, Shapiro S. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma. *Cancer*. 1998 Jun 15;82(12):2326–33.
4. Amitay EL, Carr PR, Jansen L, Alwers E, Roth W, Herpel E, et al. Postmenopausal hormone replacement therapy and colorectal cancer risk by molecular subtypes and pathways. *Int J Cancer*. 2020 Jan 14;
5. Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, Yokochi LA, Church T, Laiyemo AO, et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med*. 2012 Jun 21;366(25):2345–57.
6. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet Lond Engl*. 2018 Mar 17;391(10125):1023–75.
7. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):919–32.
8. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne C-H, Pozzo C, Poston G, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2006 Sep;42(14):2212–21.
9. Muratore A, Zorzi D, Bouzari H, Amisano M, Massucco P, Sperti E, et al. Asymptomatic colorectal cancer with un-resectable liver metastases: immediate colorectal resection or up-front systemic chemotherapy? *Ann Surg Oncol*. 2007 Feb;14(2):766–70.
10. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(8):1386–422.
11. GLOBOCAN 2008 website: [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr). [Internet]. Available from: <https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/globocan2008.php>
12. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2010 Aug;19(8):1893–907.

13. Bailey CE, Hu C-Y, You YN, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg.* 2015 Jan;150(1):17–22.
14. Weinberg BA, Marshall JL, Salem ME. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. *Oncol Williston Park N.* 2017 15;31(5):381–9.
15. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol.* 2006 Feb;101(2):385–98.
16. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5783–8.
17. Quintero E, Carrillo M, Leoz M-L, Cubiella J, Gargallo C, Lanás A, et al. Risk of Advanced Neoplasia in First-Degree Relatives with Colorectal Cancer: A Large Multicenter Cross-Sectional Study. *PLoS Med.* 2016 May;13(5):e1002008.
18. Hemminki K, Chen B. Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2004 Jul;13(7):1253–6.
19. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, et al. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 1998 Jun 1;128(11):900–5.
20. Nielsen M, Hes FJ, Vasen HF, van den Hout WB. Cost-utility analysis of genetic screening in families of patients with germline MUTYH mutations. *BMC Med Genet.* 2007 Jul 2;8:42.
21. Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG. Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics.* 1998 Feb;8(1):27–31.
22. Welfare M, Monesola Adeokun A, Bassendine MF, Daly AK. Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 1999 Apr;8(4 Pt 1):289–92.
23. Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, Ma J, Willett WC, Spiegelman D, et al. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis.* 1998 Dec;19(12):2129–32.
24. Butler LM, Millikan RC, Sinha R, Keku TO, Winkel S, Harlan B, et al. Modification by N-acetyltransferase 1 genotype on the association between dietary heterocyclic amines and colon cancer in a multiethnic study. *Mutat Res.* 2008 Feb 1;638(1–2):162–74.
25. González-Sancho JM, Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Palmer HG, Muñoz A. Effects of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 in Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2006 Jul 1;26(4A):2669–81.

26. Hartz A, He T, Ross JJ. Risk factors for colon cancer in 150,912 postmenopausal women. *Cancer Causes Control CCC*. 2012 Oct;23(10):1599–605.
27. Renehan AG, Flood A, Adams KF, Olden M, Hollenbeck AR, Cross AJ, et al. Body Mass Index at Different Adult Ages, Weight Change, and Colorectal Cancer Risk in the National Institutes of Health-AARP Cohort. *Am J Epidemiol*. 2012 Dec 15;176(12):1130–40.
28. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet Lond Engl*. 2008 Feb 16;371(9612):569–78.
29. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):916–32.
30. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*. 1990 Dec 13;323(24):1664–72.
31. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. 1971. *Dis Colon Rectum*. 1993 Nov;36(11):1071–82.
32. Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med*. 2000 Apr 20;342(16):1156–62.
33. Bamia C, Lagiou P, Buckland G, Gioni S, Agnoli C, Taylor AJ, et al. Mediterranean diet and colorectal cancer risk: results from a European cohort. *Eur J Epidemiol*. 2013 Apr;28(4):317–28.
34. Bostick RM, Fosdick L, Wood JR, Grambsch P, Grandits GA, Lillemoe TJ, et al. Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in sporadic adenoma patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Sep 6;87(17):1307–15.
35. Bristow SM, Bolland MJ, MacLennan GS, Avenell A, Grey A, Gamble GD, et al. Calcium supplements and cancer risk: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*. 2013 Oct;110(8):1384–93.
36. Keum N, Aune D, Greenwood DC, Ju W, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer*. 2014 Oct 15;135(8):1940–8.
37. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of colorectal cancer. Continuous Update Project Report Summary. 2011.
38. Chen G-C, Pang Z, Liu Q-F. Magnesium intake and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Clin Nutr*. 2012 Nov;66(11):1182–6.

39. Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3775–82.
40. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D . Washington, DC: National Academies Press; 2011.
41. Liang PS, Chen T-Y, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009 May 15;124(10):2406–15.
42. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008 Dec 17;300(23):2765–78.
43. Gong J, Hutter C, Baron JA, Berndt S, Caan B, Campbell PT, et al. A pooled analysis of smoking and colorectal cancer: timing of exposure and interactions with environmental factors. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2012 Nov;21(11):1974–85.
44. Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet Lond Engl*. 2010 Nov 20;376(9754):1741–50.
45. Sheth H, Northwood E, Ulrich CM, Scherer D, Elliott F, Barrett JH, et al. Interaction between polymorphisms in aspirin metabolic pathways, regular aspirin use and colorectal cancer risk: A case-control study in unselected white European populations. *PloS One*. 2018;13(2):e0192223.
46. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F, Mecklin J-P, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2011 Dec 17;378(9809):2081–7.
47. Singh S, Singh AG, Murad MH, Limburg PJ. Bisphosphonates are associated with reduced risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2013 Mar;11(3):232-239.e1.
48. Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med*. 1999 May;106(5):574–82.
49. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321–33.
50. Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, Hubbell FA, Ascensao J, Rodabough RJ, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2004 Mar 4;350(10):991–1004.
51. Brändstedt J, Wangefjord S, Nodin B, Eberhard J, Jirstrom K, Manjer J. Associations of hormone replacement therapy and oral contraceptives with risk of colorectal cancer defined by



clinicopathological factors, beta-catenin alterations, expression of cyclin D1, p53, and microsatellite-instability. *BMC Cancer*. 2014 May 25;14:371.

52. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012 Oct;23(10):2479–516.
53. de Gramont A, Figier A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Aug;18(16):2938–47.
54. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouché O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1997 Feb;15(2):808–15.
55. Cao Y, Tan A, Gao F, Liu L, Liao C, Mo Z. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing chemotherapy plus bevacizumab with chemotherapy alone in metastatic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Jun;24(6):677–85.
56. Loupakis F, Bria E, Vaccaro V, Cuppone F, Milella M, Carlini P, et al. Magnitude of benefit of the addition of bevacizumab to first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: meta-analysis of randomized clinical trials. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2010 May 26;29:58.
57. Vale CL, Tierney JF, Fisher D, Adams RA, Kaplan R, Maughan TS, et al. Does anti-EGFR therapy improve outcome in advanced colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct;38(6):618–25.
58. CLINICAL GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT AND MONITORING PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER. Available from: <https://doi.org/10.26800/LV-140-9-10-31>
59. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jul;289(1):F8-28.
60. Kägi L, Bettoni C, Pastor-Arroyo EM, Schnitzbauer U, Hernando N, Wagner CA. Regulation of vitamin D metabolizing enzymes in murine renal and extrarenal tissues by dietary phosphate, FGF23, and 1,25(OH)2D3. *PLoS ONE [Internet]*. 2018 May 17 [cited 2020 Jun 27];13(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5957386/>
61. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):365–408.
62. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):30337–50.

63. Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem.* 2003 Feb 1;88(2):332–9.
64. Kurnik BR, Hruska KA. Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Jul 11;817(1):42–50.
65. Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem.* 2004 Apr 16;279(16):16754–66.
66. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266–81.
67. Dusso AS, Thadhani R, Slatopolsky E. Vitamin D receptor and analogs. *Semin Nephrol.* 2004 Jan;24(1):10–6.
68. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005 Jul;19(9):1067–77.
69. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic Concepts - PubMed [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16046118/>
70. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press, 2010.
71. Ordonez-Moran P, Larriba MJ, Pendas-Franco N, Aguilera O, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A. Vitamin D and cancer: an update of in vitro and in vivo data. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2005 Sep 1;10:2723–49.
72. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jul 1;523(1):123–33.
73. Meggouh F, Lointier P, Saez S. Sex steroid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human colorectal adenocarcinoma and normal mucosa. *Cancer Res.* 1991 Feb 15;51(4):1227–33.
74. Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues. *Cancer Lett.* 1994 Oct 28;86(1):67–73.
75. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
76. Vicchio D, Yergey A, O'Brien K, Allen L, Ray R, Holick M. Quantification and kinetics of 25-hydroxyvitamin D3 by isotope dilution liquid chromatography/thermospray mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom.* 1993 Jan;22(1):53–8.
77. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):582S-586S.

78. Rahme M, Al-Shaar L, Singh R, Baddoura R, Halaby G, Arabi A, et al. Limitations of platform assays to measure serum 25OHD level impact on guidelines and practice decision making. *Metabolism*. 2018;89:1–7.
79. Emmen JMA, Wienders JPM, Boer A-K, van den Ouweland JMW, Vader HL. The new Roche Vitamin D Total assay: fit for its purpose? *Clin Chem Lab Med*. 2012 Nov;50(11):1969–72.
80. Vieth R. Why the optimal requirement for Vitamin D3 is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89–90(1–5):575–9.
81. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 1997;7(5):439–43.
82. Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1706S–9S.
83. Alshahrani F, Aljohani N. Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity. *Nutrients*. 2013 Sep 13;5(9):3605–16.
84. Chareles S AH. Vitamin D Deficiency, Metabolism and Routine Measurement of its Metabolites [25(OH)D2 and 25(OH)D3]. *J Chromatogr Sep Tech [Internet]*. 2015 [cited 2018 Oct 14];06(04). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/vitamin-d-deficiency-metabolism-and-routine-measurement-of-itsmetabolites-25ohd2-and-25ohd3-2157-7064-1000276.php?aid=57522>
85. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Jun;64(6):1165–8.
86. Looker AC, Pfeiffer CM, Lacher DA, Schleicher RL, Picciano MF, Yetley EA. Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988–1994 compared with 2000–2004. *Am J Clin Nutr*. 2008 Dec;88(6):1519–27.
87. Zhou C, Assem M, Tay JC, Watkins PB, Blumberg B, Schuetz EG, et al. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*. 2006 Jun;116(6):1703–12.
88. Rafiq S, Jeppesen PB. Body Mass Index, Vitamin D, and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients [Internet]*. 2018 Aug 28 [cited 2018 Nov 7];10(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6164132/>
89. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1911–30.
90. Alen. SMJERNICE ZA PREVENCIJU, PREPOZNAVANJE I LIJEČENJE NEDOSTATKA VITAMINA D U ODRASLIH [Internet]. *Liječnički vjesnik*. [cited 2020 Jun 24]. Available from:

<https://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/lijecnicki-vjesnik/smjernice-za-prevenciju-prepoznavanje-i-lijecenje-nedostatka-vitamina-d-u-odraslih/>

91. Greene-Finestone LS, Berger C, de Groh M, Hanley DA, Hidiroglou N, Sarafin K, et al. 25-Hydroxyvitamin D in Canadian adults: biological, environmental, and behavioral correlates. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2011 May;22(5):1389–99.
92. Chapuy MC, Schott AM, Garnero P, Hans D, Delmas PD, Meunier PJ. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Mar;81(3):1129–33.
93. Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med*. 2006 Sep;260(3):245–54.
94. Thacher TD, Fischer PR, Strand MA, Pettifor JM. Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Ann Trop Paediatr*. 2006 Mar;26(1):1–16.
95. Marwaha RK, Tandon N, Reddy DRHK, Aggarwal R, Singh R, Sawhney RC, et al. Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. *Am J Clin Nutr*. 2005 Aug;82(2):477–82.
96. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ*. 2003 Mar 1;326(7387):469.
97. Hollis BW. Vitamin D requirement during pregnancy and lactation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2007 Dec;22 Suppl 2:V39-44.
98. 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 Aug;29(8):861–7.
99. Vitamin D levels in Croatian patients with acute coronary syndrome. Knezevic Pravecek M, Hadzibegovic I, Prvulovic D, Cvitkusic Lukenda K, Dundjer I, et al *Cardiol Croat* 8(9), 281, 2013.
100. Holick MF. Cancer, sunlight and vitamin D. *J Clin Transl Endocrinol*. 2014 Dec;1(4):179–86.
101. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol*. 1980 Sep;9(3):227–31.
102. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet Lond Engl*. 1989 Nov 18;2(8673):1176–8.

103. Bernardi RJ, Johnson CS, Modzelewski RA, Trump DL. Antiproliferative effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology*. 2002 Jul;143(7):2508–14.
104. Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 Jul;80(1):49–62.
105. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013 Jul;88(7):720–55.
106. Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 1998 May;7(5):391–5.
107. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996 Jan 15;10(2):142–53.
108. Inoue T, Kamiyama J, Sakai T. Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32309–17.
109. Pálmer HG, Larriba MJ, García JM, Ordóñez-Morán P, Peña C, Peiró S, et al. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):917–9.
110. Tong WM, Hofer H, Ellinger A, Peterlik M, Cross HS. Mechanism of antimitogenic action of vitamin D in human colon carcinoma cells: relevance for suppression of epidermal growth factor-stimulated cell growth. *Oncol Res*. 1999;11(2):77–84.
111. Tong WM, Kállay E, Hofer H, Hulla W, Manhardt T, Peterlik M, et al. Growth regulation of human colon cancer cells by epidermal growth factor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 is mediated by mutual modulation of receptor expression. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1998 Dec;34(13):2119–25.
112. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005 Jan;15(1):28–32.
113. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):311–20.
114. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):379–83.
115. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*. 2003 Jul 15;17(14):1709–13.

116. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:695–723.
117. Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Mar;285(2):261–9.
118. Thomas MG, Tebbutt S, Williamson RC. Vitamin D and its metabolites inhibit cell proliferation in human rectal mucosa and a colon cancer cell line. *Gut.* 1992 Dec;33(12):1660–3.
119. Díaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, Binderup L, Hague A. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D<sub>3</sub> and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.* 2000 Apr 15;60(8):2304–12.
120. Barnes JD, Arhel NJ, Lee SS, Sharp A, Al-Okail M, Packham G, et al. Nuclear BAG-1 expression inhibits apoptosis in colorectal adenoma-derived epithelial cells. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2005 Mar;10(2):301–11.
121. Dou R, Ng K, Giovannucci EL, Manson JE, Qian ZR, Ogino S. Vitamin D and Colorectal Cancer: Molecular, Epidemiological, and Clinical Evidence. *Br J Nutr.* 2016 May;115(9):1643–60.
122. Alini M, Marriott A, Chen T, Abe S, Poole AR. A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. *Dev Biol.* 1996 May 25;176(1):124–32.
123. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention and Treatment. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012 Feb;38(1):161–78.
124. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995 Jan;1(1):27–31.
125. Sakamoto S, Ryan AJ, Kyprianou N. Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. *J Cell Biochem.* 2008 Feb 15;103(3):691–708.
126. Iseki K, Tatsuta M, Uehara H, Iishi H, Yano H, Sakai N, et al. Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. *Int J Cancer.* 1999 May 31;81(5):730–3.
127. Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Oct;2(10):803–11.
128. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2000 Aug 4;87(3):214–20.
129. Majewski S, Skopinska M, Marczak M, Szmurlo A, Bollag W, Jablonska S. Vitamin D<sub>3</sub> is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1996 Apr;1(1):97–101.

130. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabjeesh NJ.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Apr 1;6(4):1433–9.
131. Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2001 Dec;121(6):1339–47.
132. Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003 May 1;63(9):2330–4.
133. Campbell MJ, Elstner E, Holden S, Uskokovic M, Koeffler HP. Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. *J Mol Endocrinol.* 1997 Aug;19(1):15–27.
134. Getzenberg RH, Light BW, Lapco PE, Konety BR, Nangia AK, Acierno JS, et al. Vitamin D inhibition of prostate adenocarcinoma growth and metastasis in the Dunning rat prostate model system. *Urology.* 1997 Dec;50(6):999–1006.
135. Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2005 Feb;26(2):429–40.
136. Koli K, Keski-Oja J.  $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 enhances the expression of transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein in cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1540–6.
137. Sung V, Feldman D.  $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 decreases human prostate cancer cell adhesion and migration. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Jun;164(1–2):133–43.
138. Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* 2008 May;99(5):836–42.
139. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):221–7.
140. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S81-96.
141. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene.* 1999 Dec 2;18(51):7389–94.
142. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):2952–60.

143. Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto FL, Liao A, Madara JL, et al. Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Aug;291(2):E315-322.
144. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Steinhilber D, Stein J, Schröder O. Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling. *Mol Immunol.* 2007 Jul;44(15):3625-32.
145. Vandewalle B, Watez N, Lefebvre J. Effects of vitamin D3 derivatives on growth, differentiation and apoptosis in tumoral colonic HT 29 cells: possible implication of intracellular calcium. *Cancer Lett.* 1995 Oct 20;97(1):99-106.
146. Scaglione-Sewell BA, Bissonnette M, Skarosi S, Abraham C, Brasitus TA. A vitamin D3 analog induces a G1-phase arrest in CaCo-2 cells by inhibiting cdk2 and cdk6: roles of cyclin E, p21Waf1, and p27Kip1. *Endocrinology.* 2000 Nov;141(11):3931-9.
147. Fernandez-Garcia NI, Palmer HG, Garcia M, Gonzalez-Martin A, del Rio M, Baretino D, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene.* 2005 Sep 29;24(43):6533-44.
148. Lamprecht SA, Lipkin M. Cellular mechanisms of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;952:73-87.
149. Evans SR, Shchepotin EI, Young H, Rochon J, Uskokovic M, Shchepotin IB. 1,25-dihydroxyvitamin D3 synthetic analogs inhibit spontaneous metastases in a 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis model. *Int J Oncol.* 2000 Jun;16(6):1249-54.
150. Sheinin Y, Kaserer K, Wrba F, Wenzl E, Kriwanek S, Peterlik M, et al. In situ mRNA hybridization analysis and immunolocalization of the vitamin D receptor in normal and carcinomatous human colonic mucosa: relation to epidermal growth factor receptor expression. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2000 Nov;437(5):501-7.
151. Kállay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, et al. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2002 Aug;40(8):1191-6.
152. Shabahang M, Buras RR, Davoodi F, Schumaker LM, Nauta RJ, Evans SR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Res.* 1993 Aug 15;53(16):3712-8.
153. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids.* 2001 May;66(3-5):287-92.
154. Cross HS, Bajna E, Bises G, Genser D, Kállay E, Pötzi R, et al. Vitamin D receptor and cytokeratin expression may be progression indicators in human colon cancer. *Anticancer Res.* 1996 Aug;16(4B):2333-7.



155. Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, Bajna E, Hahn P, Mazzucco K, et al. Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1429–35.
156. Cho YA, Lee J, Oh JH, Chang HJ, Sohn DK, Shin A, et al. Vitamin D receptor FokI polymorphism and the risks of colorectal cancer, inflammatory bowel disease, and colorectal adenoma. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Aug 27 [cited 2019 Feb 12];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6110797/>
157. Mondul AM, Weinstein SJ, Layne TM, Albanes D. Vitamin D and Cancer Risk and Mortality: State of the Science, Gaps, and Challenges. *Epidemiol Rev*. 2017 01;39(1):28–48.
158. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 Sep 1;338(2):143–56.
159. Murtaugh MA, Sweeney C, Ma K-N, Potter JD, Caan BJ, Wolff RK, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, dietary promotion of insulin resistance, and colon and rectal cancer. *Nutr Cancer*. 2006;55(1):35–43.
160. Ingles SA, Wang J, Coetzee GA, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. Vitamin D receptor polymorphisms and risk of colorectal adenomas (United States). *Cancer Causes Control CCC*. 2001 Sep;12(7):607–14.
161. Perna L, Hoffmeister M, Schöttker B, Arndt V, Haug U, Holleczer B, et al. Vitamin D receptor polymorphism and colorectal cancer-specific and all-cause mortality. *Cancer Epidemiol*. 2013 Dec;37(6):905–7.
162. Van Belle TL, Vanherwegen A-S, Feyaerts D, De Clercq P, Verstuyf A, Korf H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analog TX527 promote a stable regulatory T cell phenotype in T cells from type 1 diabetes patients. *PloS One*. 2014;9(10):e109194.
163. Trump DL. Calcitriol and cancer therapy: A missed opportunity. *Bone Rep*. 2018 Dec;9:110–9.
164. Duffy MJ, Murray A, Synnott NC, O'Donovan N, Crown J. Vitamin D analogues: Potential use in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Apr;112:190–7.
165. González-Pardo V, Verstuyf A, Boland R, Russo de Boland A. Vitamin D analogue TX 527 down-regulates the NF- $\kappa$ B pathway and controls the proliferation of endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma herpesvirus. *Br J Pharmacol*. 2013 Aug;169(7):1635–45.
166. Gulliford T, English J, Colston KW, Menday P, Moller S, Coombes RC. A phase I study of the vitamin D analogue EB 1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998 Jul;78(1):6–13.
167. Liu G, Hu X, Chakrabarty S. Vitamin D mediates its action in human colon carcinoma cells in a calcium-sensing receptor-dependent manner: downregulates malignant cell behavior and the expression of thymidylate synthase and survivin and promotes cellular sensitivity to 5-FU. *Int J Cancer*. 2010 Feb 1;126(3):631–9.

168. Milczarek M, Rossowska J, Klopotoska D, Stachowicz M, Kutner A, Wietrzyk J. Tacalcitol increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by downregulating the thymidylate synthase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;190:139–51.
169. Moffatt KA, Johannes WU, Miller GJ. 1Alpha,25dihydroxyvitamin D3 and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999 Mar;5(3):695–703.
170. Hershberger PA, McGuire TF, Yu W-D, Zuhowski EG, Schellens JHM, Egorin MJ, et al. Cisplatin Potentiates 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced Apoptosis in Association with Increased Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1 (MEKK-1) Expression 1 Supported by USPHS Grants CA85142 and CA67267 from the National Cancer Institute, National Cancer Institute Core Grant P30 CA47904, and a grant from CaPCURE.1. *Mol Cancer Ther.* 2002 Aug 1;1(10):821–9.
171. Koshizuka K, Koike M, Asou H, Cho SK, Stephen T, Rude RK, et al. Combined effect of vitamin D3 analogs and paclitaxel on the growth of MCF-7 breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Jan;53(2):113–20.
172. Light BW, Yu WD, McElwain MC, Russell DM, Trump DL, Johnson CS. Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res.* 1997 Sep 1;57(17):3759–64.
173. Bostick RM. Effects of Supplemental Vitamin D and Calcium on Normal Colon Tissue and Circulating Biomarkers of Risk for Colorectal Neoplasms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Apr;148:86–95.
174. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol.* 2009 Jul;19(7):468–83.
175. Lee JE, Li H, Chan AT, Hollis BW, Lee I-M, Stampfer MJ, et al. Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: the Physicians' Health Study and a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2011 May;4(5):735–43.
176. Touvier M, Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, et al. Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2011 May;20(5):1003–16.
177. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Cancer.* 2011 Mar 15;128(6):1414–24.
178. Ishihara J, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr.* 2008 Dec;88(6):1576–83.

179. Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, van Duijnhoven FJB, Norat T, Pischon T, et al. Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *BMJ*. 2010 Jan 21;340:b5500.
180. Park S-Y, Murphy SP, Wilkens LR, Nomura AMY, Henderson BE, Kolonel LN. Calcium and vitamin D intake and risk of colorectal cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2007 Apr 1;165(7):784–93.
181. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer*. 2009;61(1):47–69.
182. Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O’Sullivan MJ, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2006 Feb 16;354(7):684–96.
183. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Krstic G, Wetterslev J, et al. Vitamin D supplementation for prevention of cancer in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Jun 23; (6):CD007469.
184. Manson JE, Cook NR, Lee I-M, Christen W, Bassuk SS, Mora S, et al. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2019 Jan 3;380(1):33–44.
185. Ng K, Sargent DJ, Goldberg RM, Meyerhardt JA, Green EM, Pitot HC, et al. Vitamin D status in patients with stage IV colorectal cancer: findings from Intergroup trial N9741. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1599–606.
186. Zgaga L, Theodoratou E, Farrington SM, Din FVN, Ooi LY, Glodzik D, et al. Plasma vitamin D concentration influences survival outcome after a diagnosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Aug 10;32(23):2430–9.
187. Tangrea J, Helzlsouer K, Pietinen P, Taylor P, Hollis B, Virtamo J, et al. Serum levels of vitamin D metabolites and the subsequent risk of colon and rectal cancer in Finnish men. *Cancer Causes Control CCC*. 1997 Jul;8(4):615–25.
188. Wu K, Feskanich D, Fuchs CS, Willett WC, Hollis BW, Giovannucci EL. A nested case control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Jul 18;99(14):1120–9.
189. Buttigliero C, Monagheddu C, Petroni P, Saini A, Dogliotti L, Ciccone G, et al. Prognostic Role of Vitamin D Status and Efficacy of Vitamin D Supplementation in Cancer Patients: A Systematic Review. *The Oncologist*. 2011 Sep;16(9):1215–27.
190. Maalmi H, Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2014 May;50(8):1510–21.

191. Afzal S, Brøndum-Jacobsen P, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Genetically low vitamin D concentrations and increased mortality: Mendelian randomisation analysis in three large cohorts. *BMJ*. 2014 Nov 18;349:g6330.
192. Wesa KM, Segal NH, Cronin AM, Sjoberg DD, Jacobs GN, Coletton MI, et al. Serum 25-hydroxy vitamin D and survival in advanced colorectal cancer: a retrospective analysis. *Nutr Cancer*. 2015;67(3):424–30.
193. Avenell A, MacLennan GS, Jenkinson DJ, McPherson GC, McDonald AM, Pant PR, et al. Long-term follow-up for mortality and cancer in a randomized placebo-controlled trial of vitamin D(3) and/or calcium (RECORD trial). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Feb;97(2):614–22.
194. Brunner RL, Wactawski-Wende J, Caan BJ, Cochrane BB, Chlebowski RT, Gass MLS, et al. The effect of calcium plus vitamin D on risk for invasive cancer: results of the Women’s Health Initiative (WHI) calcium plus vitamin D randomized clinical trial. *Nutr Cancer*. 2011;63(6):827–41.
195. Lewis C, Xun P, He K. Vitamin D supplementation and quality of life following diagnosis in stage II colorectal cancer patients: a 24-month prospective study. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. 2016 Apr;24(4):1655–61.
196. Komulainen M, Kröger H, Tuppurainen MT, Heikkinen AM, Alhava E, Honkanen R, et al. Prevention of femoral and lumbar bone loss with hormone replacement therapy and vitamin D3 in early postmenopausal women: a population-based 5-year randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):546–52.
197. Jeffreys M, Redaniel MT, Martin RM. The effect of pre-diagnostic vitamin D supplementation on cancer survival in women: a cohort study within the UK Clinical Practice Research Datalink. *BMC Cancer*. 2015 Oct 12;15:670.
198. Fakhri MG, Andrews C, McMahan J, Muindi JR. A prospective clinical trial of cholecalciferol 2000 IU/day in colorectal cancer patients: evidence of a chemotherapy-response interaction. *Anticancer Res*. 2012 Apr;32(4):1333–8.
199. Search of: NCT01516216 - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2018 Oct 23]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=NCT01516216&cntry=&state=&city=&dist=>
200. Ng K, Nimeiri HS, McCleary NJ, Abrams TA, Yurgelun MB, Cleary JM, et al. SUNSHINE: Randomized double-blind phase II trial of vitamin D supplementation in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15\_suppl):3506–3506.
201. Warren SR, Raisch DW, Campbell HM, Guarino PD, Kaufman JS, Petrokaitis E, et al. Medication adherence assessment in a clinical trial with centralized follow-up and direct-to-patient drug shipments. *Clin Trials Lond Engl*. 2013;10(3):441–8.

202. Fakhri MG, Trump DL, Johnson CS, Tian L, Muindi J, Sunga AY. Chemotherapy is linked to severe vitamin D deficiency in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2009 Feb;24(2):219–24.
203. Ng K. Vitamin D for Prevention and Treatment of Colorectal Cancer: What is the Evidence? *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2014 Sep 1;10(3):339–45.
204. Ng K, Meyerhardt JA, Wu K, Feskanich D, Hollis BW, Giovannucci EL, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin d levels and survival in patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Jun 20;26(18):2984–91.
205. Benson AB, Hoffe S, Nurkin S, Overman MJ. NCCN Guidelines Index Table of Contents. 2018;183.
206. Lazzeroni M, Serrano D, Pilz S, Gandini S. Vitamin D supplementation and cancer: review of randomized controlled trials. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Jan;13(1):118–25.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. veljače 1982. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu, a potom Klasičnu gimnaziju. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 30. lipnja 2006. Nakon studija počela sam pripravnički staž u Kliničkoj bolnici „Sestre milosrdnice“ tijekom kojeg sam surađivala na Kliničkoj studiji o inhalacijskim inzulinima pri Centru za dijabetes. Godine 2007. položila sam državni ispit, a 2008. započela specijalizaciju iz interne medicine na Klinici za onkologiju KBC-a Zagreb. Godine 2009. upisala sam Doktorski poslijediplomski studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Godine 2013. položila sam specijalistički ispit iz interne medicine. U rujnu 2014. počela sam užu specijalizaciju iz internističke onkologije u KBC-u Zagreb. U studenom 2016. položila sam ispit iz uže specijalizacije. Radim kao odjelna liječnica na Odjelu za urogenitalne tumore na Klinici za onkologiju KBC-a Zagreb. Vanjska sam suradnica u Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta sveučilišta i Zagrebu. Autor sam i koautor nekoliko radova. Udana sam i majka troje djece.

## ETIČKO POVJERENSTVO

### Prilog T1: Obavijest za ispitanika

Poštovani/poštovana,

Pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju čiji je glavni cilj istražiti povezanost serumske koncentracije vitamina D u oboljelih od raka debelog crijeva i preživljenja odnosno recidiva bolesti.

Istraživanje se provodi u Klinici za onkologiju, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, a financirano je od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH.

Vaše sudjelovanje u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva istraživanja i načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za Vas kao ispitanika. Stoga Vas molimo da, prije donošenja odluke, pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest, a ako u njoj nađete na bilo kakve nejasnoće ili nepoznate riječi i izraze da o tome pitate istraživače i liječnike koji u istraživanju sudjeluju i dužni su Vam i spremni odgovoriti na svako pitanje.

#### OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA:

Rak debelog crijeva je drugo najčešće sjelo zloćudne bolesti i u muškaraca i u žena u Hrvatskoj, te predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Na rizik za pojavu raka debelog crijeva utječu nasljedni i okolišni čimbenici. Sve je više dokaza o antikancerogenom učinku D vitamina. Dosadašnja istraživanja ukazuju da su niske koncentracije 25-OHD vitamina, koji se smatra najboljim pokazateljem statusa vitamina D u organizmu, značajan rizični faktor za razvoj raka debelog crijeva te su povezane sa smrtnošću od karcinoma. Serumska koncentracija 25-hidroksi D u oboljelih od raka debelog crijeva vitamina povezana je s preživljenjem i recidivom bolesti. Prema našim saznanjima u Hrvatskoj do sada nije provedeno istraživanje o prognostičkoj i prediktivnoj ulozi određivanja 25OHD vitamina D u oboljelih od raka debelog crijeva. Smatramo da će naše istraživanje doprinjeti boljem razumijevanju problema u svrhu kvalitetnijeg liječenja.

#### CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja analizirati povezanost koncentracije serumskog 25-hidroksi D vitamina s dvogodišnjim preživljenjem, odnosno učestalošću pojave recidiva bolesti u bolesnika s rakom debelog crijeva nakon kirurškog liječenja.

#### ULOGA VAS KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Navedeno istraživanje provodit će se kao dodatak uobičajenoj obradi koja se vrši kod svih bolesnika s rakom debelog crijeva. Iz uzorka venske krvi (5 mL) određivat će se koncentracija 25-hidroksi D vitamina, kalcija i fosfora. Ako Vaša serumska koncentracija 25- hidroksi D vitamina bude niža od preporučene (75 nmol/L) bit ćete slučajnim odabirom raspoređeni u jednu od dvije skupine. Jedna skupina će dobivati 2000 ij vitamina D3 uz standardno onkološko liječenje, a druga će nastaviti s preporučenim onkološkim liječenjem. Imat ćete, kao i svi ispitanici, jednaku vjerojatnost da budete raspoređeni u pojedinu skupinu. Ako Vaša

serumska koncentracija 25- hidroksi D vitamina bude viša od preporučene, nastavit ćemo s uobičajenom obradom. Tijekom ispitivanja susretat ćete se s osobljem Klinike za onkologiju KBC Zagreb.

#### KOJE SU ZA VAS MOGUĆE PREDNOSTI I KORISTI OD SUDJELOVANJA?

Svim ispitanicima će se mjeriti koncentracija 25-hidroksi D vitamina u krvi kao najboljeg pokazatelja statusa D vitamina u organizmu, te će se prema rezultatima istraživanja svakom bolesniku ponuditi adekvatno liječenje.

#### KOJI SU ZA VAS MOGUĆI RIZICI SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

Ne očekujemo da ćete u ovom istraživanju biti izloženi dodatnom riziku budući da će uzimanje uzoraka krvi za navedeno istraživanje biti učinjeno prilikom rutinske obrade koja se vrši u bolesnika s rakom debelog crijeva. Određivanje serumske koncentracije vitamina D, kalcija i fosfora spada u rutinske pretrage, koje u navedenoj populaciji do sada nisu bile adekvatno zastupljene. U dosadašnjim istraživanjima dnevna doza od 2000 ij vitamina D3 nije imala nikakve štetne učinke na zdravlje, ali budući da ne postoje velika randomizirana klinička ispitivanja koja su pokazala pozitivan učinak vitamina D3 na dvogodišnje preživljenje odnosno recidiv bolesti ne možemo ju preporučiti kao standardno liječenje. Eventualna pojava tromboflebitisa površinskih vena ruku, ili pojava omaglica prilikom vađenja krvi, ne predstavljaju po život opasna stanja i prolazne su prirode ne ostavljajući posljedice po zdravlje ispitanika.

#### POSTOJE LI DRUGI LIJEKOVI, DRUGE DIJAGNOSTIČKE METODE ILI DRUGI OPERATIVNI PRISTUPI?

U slučaju da ne pristajete na sudjelovanje u studiji, to neće utjecati na tijek liječenja Vaše bolesti. Biti ćete liječeni standardnim metodama prema pravilima struke.

#### MORATE LI SUDJELOVATI U ISTRAŽIVANJU?

Vi ćete u potpunosti slobodno i samostalno odlučiti hoćete li u ovom istraživanju sudjelovati ili ne. Vaše sudjelovanje je dragovoljno i u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, imate se pravo bez ikakvih posljedica povući iz istraživanja. U tom slučaju ćete se nastaviti dalje liječiti na način koji je uobičajen za Vašu bolest. Ako odlučite prekinuti svoje sudjelovanje u istraživanju, lijepo Vas molimo da o tome na vrijeme obavijestite voditelja projekta i njegove suradnike.

#### POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi Vaši osobni podaci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj projekta i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. U naše baze podataka Vi ćete biti uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelj projekta i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva u ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) te predstavnici Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.



## ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podaci dobiveni u ovom znanstvenom istraživanju mogu biti korisni u kliničkoj praksi, ali i u svrhu daljnjeg razvoja i unapređenja znanosti. Stoga se očekuje da se ti podaci objave u odgovarajućim znanstvenim časopisima i publikacijama. Pri tome će Vaš identitet ostati u potpunosti anoniman i zaštićen.

## TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje organizira Klinika za onkologiju KBC-a Zagreb. Financijska sredstva za provedbu ovog istraživanja su dobivena od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, a dio podataka koji će biti korišteni u ovom istraživanju dio su standardne dijagnostičke obrade bolesnika s rakom debelog crijeva.

## TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje su odobrila Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC-a Zagreb, nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući «Osnove dobre kliničke prakse» i «Helsinšku deklaraciju».

## KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPITE?

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije, ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite voditelju projekta ili njegovim suradnicima, kako slijedi:

Ime i prezime voditelja projekta i istraživanja: prof. dr. sc. Stjepko Pleština

Adresa voditelja projekta i istraživanja: Klinika za onkologiju KBC Zagreb

Broj telefona voditelja projekta i istraživanja: 01/2388184

Ime i prezime suradnika: Zrna Antunac Golubić, dr. med.

Adresa suradnika: Zavod za internističku onkologiju

Klinika za onkologiju KBC Zagreb

Broj telefona suradnika: 01/2388154

## TKO ĆE JOŠ BITI OBAVIJEŠTEN O OVOM ISTRAŽIVANJU?

O Vašem sudjelovanju u ovom znanstvenom istraživanju biti će obaviješten i Vaš obiteljski liječnik.

## O VAŠOJ PISANOJ SUGLASNOSTI ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Preslik dokumenta (potpisne stranice) koji trebate potpisati ako pristajete sudjelovati u ovom istraživanju dobit ćete Vi i voditelj istraživanja. Izvorni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati voditelj istraživanja.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost Vašeg sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

KBC ZAGREB

ETIČKO POVJERENSTVO

**Prilog T2:  
Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika u istraživanju**

Potvrđujem da sam dana \_\_\_\_\_ u \_\_\_\_\_ pročitao/pročitala Obavijest za ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.

Razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za moje zdravstveno stanje ili pravni status.

Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja i Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.

Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.

Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika (upisati štampanim slovima):

Vlastoručni potpis:

Mjesto i datum:

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak Obavijesti za ispitanika i Suglasnosti za sudjelovanje:

Vlastoručni potpis:

Mjesto i datum: