

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Nauk o Zdrowiu

Agnieszka Radom

WPŁYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA STĘŻENIE 25(OH)D₃
W SUROWICY KRWI KOBIET, KTÓRE BYŁY LECZONE
Z POWODU RAKA SUTKA

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Przemysław Tomasik, prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej Instytut Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Krystyna Sztefko
oraz

Medycznym Laboratorium Diagnostycznym Niepublicznego Zakładu Opieki
Zdrowotnej Diagmed sp. z o.o. w Nowym Sączu

Kierownik jednostki: mgr Robert Królikowski

Kraków, 2020

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania oraz wyrazić głęboką wdzięczność Panu dr hab. Przemysławowi Tomasikowi, prof. UJ za nieocenioną pomoc udzieloną w czasie pisania pracy doktorskiej. Dziękuję za wyrozumiałość, cierpliwość oraz motywację do krytycznego i kreatywnego spojrzenia na badane zagadnienie.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam Pani Jolancie Gadzinie oraz Panu Robertowi Królikowskiemu za stworzenie warunków do powstania tej pracy, nieustające wsparcie i życzliwą atmosferę.

Niniejszą pracę pragnę dedykować mojemu Tacie, który od najmłodszych lat umożliwiał mi i motywował do zdobywania wiedzy.

SPIS TREŚCI

LISTA SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	9
1.1 WITAMINA D.....	9
1.1.1.Historia badań nad witaminą D	9
1.1.2 Witamina D, jej źródła i metabolizm	10
<i>1.1.2.1 Budowa i występowanie receptora jądrowego witaminy D</i>	<i>15</i>
1.1.3 Mechanizmy działania witaminy D	18
<i>1.1.3.1 Mechanizm genomowy</i>	<i>18</i>
<i>1.1.3.2 Mechanizm pozagenomowy</i>	<i>18</i>
1.2 DZIAŁANIE WITAMINY D	18
1.2.1 Działanie klasyczne	18
1.2.2 Nieklasyczne działanie witaminy D	19
<i>1.2.2.1 Działanie immunomodulujące witaminy D</i>	<i>19</i>
1.2.2.1.1 Wpływ witaminy D na odpowiedź pierwotną	20
1.2.2.1.2 Witamina D i nabyta odpowiedź immunologiczna.....	22
1.3.DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE WITAMINY D	24
1.3.1 Mechanizmy działania przeciwnowotworowego witaminy D	26
<i>1.3.1.1 Zapalenie.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.1.2 Proliferacja komórkowa</i>	<i>28</i>
<i>1.3.1.3 Apoptoza.....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.1.4 Dojrzewanie komórkowe.....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.1.5 Angiogeneza.....</i>	<i>31</i>
<i>1.3.1.6 Inwazyjność i tworzenie przerzutów nowotworowych.....</i>	<i>31</i>
1.4 RAK SUTKA.....	32

1.4.1 Epidemiologia i etiologia.....	33
1.4.2 Czynniki ryzyka raka sutka.....	33
1.4.3 Ocena ryzyka raka sutka.....	36
1.4.4 Profilaktyka raka sutka.....	36
1.4.5 Diagnostyka genetyczna w profilaktyce raka sutka.....	38
1.4.6 Leczenie raka sutka.....	38
1.4.7 Ryzyko wznowy.....	39
1.4.8 Opieka medyczna nad pacjentkami po leczeniu raka sutka.....	41
1.4.9 Oznaczanie stężenia witaminy D i suplementacja witaminą D ₃ u chorych na raka sutka.....	42
2. CEL PRACY.....	44
3. MATERIAŁ I METODY	46
3.1 PACJENCI.....	46
3.1.1 Badane grupy	46
3.1.2 Grupa kontrolna	47
3.2 METODY BADAWCZE.....	48
3.2.1 Ankieta.....	48
3.2.2 Badanie pilotażowe - walidacja ankiety.....	49
3.2.3 Badanie ankietowe pacjentek.....	51
3.3 OZNACZENIA LABORATORYJNE.....	51
3.3.1 Pobieranie krwi	51
3.3.2 Oznaczenie stężenia witaminy 25(OH)D	52
3.3.3 Laboratoryjna charakterystyka zestawów Elecsys	53
3.4 PROCEDURA BADANIA	54
3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA	56
4. WYNIKI BADAŃ	57
4.1 CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP.....	57
4.2 PODSTAWOWE DANE EPIDEMIOLOGICZNE ZWIĄZANE Z UKŁADEM ROZRODCZYM.....	58
4.3 PODSTAWOWE DANE KLINICZNE ZWIĄZANE Z CHOROBAŁĄ NOWOTWOROWAŁ.....	60
4.4 STĘŻENIE WITAMINY D U PACJENTEK BADANYCH GRUP.....	61

4.5 SUPLEMENTACJA WITAMINY D ₃ W BADANYCH GRUPACH.....	64
4.6 ZNAJOMOŚĆ REKOMENDACJI NA TEMAT SUPLEMENTACJI WITAMINY D ₃	68
4.7 EKSPozyCJA PACJENTEK NA PROMIENIOWANIE SŁONECZNE.....	71
4.8 NAWYKI ŻYWIENIOWE WPŁYWAJĄCE NA STĘŻENIE WITAMINY D	72
4.9 INFEKCJE.....	73
4.10 WPŁYW NOWOTWOROWEJ CHOROBY W RODZINIE NA SUPLEMENTACJĘ WITAMINY D ₃	73
4.11 KORELACJE.....	74
4.11.1 Korelacja stężenia witaminy D z wiekiem.....	74
4.11.2 Korelacja surowiczego stężenia witaminy D z dietą.....	74
4.11.3 Korelacja deklarowanego czasu opalania ze stężeniem witaminy D.....	75
4.11.4 Korelacja stężenia witaminy D z częstością infekcji	75
5. DYSKUSJA.....	76
5.1 STĘŻENIE WITAMINY D U PACJENTEK PO LECZONYM RAKU SUTKA.....	78
5.2 WPŁYW PÓR ROKU I EKSPozyCJI NA ŚWIATŁO SŁONECZNE NA STĘŻENIE WITAMINY D W SUROWICY W BADANYCH GRUPACH PACJENTEK	80
5.3 WPŁYW DIETY NA STĘŻENIE WITAMINY D.....	85
5.4 WPŁYW SUPLEMENTACJI NA STĘŻENIE WITAMINY D U KOBIET PO LECZONYM RAKU SUTKA	88
5.5 ZNAJOMOŚĆ REKOMENDACJI DOTYCZĄCYCH ZALECANYCH STĘŻEŃ WITAMINY D W SUROWICY I SUPLEMENTACJI WITAMINĄ D ₃ W POPULACJI KOBIET Z RAKIEM SUTKA.....	90
5.6 MONITOROWANIE STĘŻENIA WITAMINY D U PACJENTEK LECZONYCH Z POWODU RAKA SUTKA I WPŁYW BADANIA STĘŻENIA WITAMINY D NA STATUS WITAMINY D	95
6. WNIOSKI.....	99
7. SPIS TABEL I RYCIN.....	100
7.1 SPIS TABEL.....	100
7.2 SPIS RYCIN	100
8. STRESZCZENIE	103

9. SUMMARY.....	106
10. BIBLIOGRAFIA.....	109
11. ZAŁĄCZNIKI.....	131
11.1 ZAŁĄCZNIK nr 1. Opinia Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr 122.6120.18.2017 z dnia 20 stycznia 2017 roku.....	131
11.2 ZAŁĄCZNIK nr 2 Wzór ankiety.....	134

LISTA SKRÓTÓW

1,25(OH)₂D₃ - 1,25-dihydroksycholekalcyferol

13-HODE - (*13-hydroxyoctadecadienoic acid*) kwas 13-hydroksylinolowy

15-HPGDH - (*15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*) dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa

24,25(OH)₂D₃ - 24,25- dihydroksycholekalcyferol

25(OH)D₃ - 25-hydroksycholekalcyferol

7-DHC- 7- dehydrocholesterol

AACE - (*American Association of Clinical Endocrinologists*) Amerykańskie Stowarzyszenie Endokrynologii Klinicznej

ADCC- (*antibody-dependent cell cytotoxicity*) cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał

APCs - (*antigen-presenting cells*) komórki prezentujące antygen

BMI - (*body mass index*) wskaźnika masy ciała

BMP6 - (*bone morphogenetic protein 6*) morfogenetyczne białko kości 6

CaBP - (*Ca binding protein*) białko wiążące wapń

CAMP - (*cathelicidin antimicrobial peptide*) katelicydyny peptydów przeciwdrobnoustrojowych

CBC – (*contralateral breast cancer*) rak drugiej piersi

CDK - (*cyclin-dependent kinase*) kinaza zależna od cyklin

CIN - (*cervical intraepithelial neoplasia*) śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy

CIS - (*carcinoma in situ*) rak przedinwazyjny

CYP- cytochrom P450

D₂ - ergokalcyferol

D₃ - cholekalcyferol

DBP - (*vitamin D binding protein*) białko wiążące witaminę D

DCIS - (*ductal carcinoma in situ*) rak nieinwazyjny przewodowy sutka

DHA - (*docosahexaenoic acid*) kwas dokozaheksaenowy

DNA - (*deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy

DUSP10 - (*dual specificity phosphatase 10*) fosfataza białkowa o podwójnej specyficzności 10

EGF - (*epidermal growth factor*) nabłonkowy czynnik wzrostu

ESMO - (*European Society for Medical Oncology*) Europejskie Towarzystwo Onkologii Medycznej

EMT - (*epithelial-mesenchymal transition*) przejście komórek z fenotypu epithelialnego do mezenchymalnego

EPA - (*eicosapentaenoic acid*) kwas eikozapentaenowy

ER - (*estrogen receptor*) receptor estrogenowy

ESPEN - (*European Society for Clinical Nutrition and Metabolism*) Europejskie Towarzystwo Żywienia Pozajelitowego i Dojelitowego

FFTP - (*first full-term pregnancy*) późna pierwsza donoszona ciąża

HIF1A - (*hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*) indukowalny przez niedotlenienie czynnik 1-alfa

IGF-1 - (*insulin-like growth factor 1*) insulinopodobny czynnik wzrostu

IGFBP3 - (*insulin-like growth factor-binding protein 3*) białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 3

IL - (*interleukin*) interleukina

INF- γ - interferon- γ

IOM - (*Institute of Medicine*) Amerykańska Narodowa Akademia Medycyny

IBTR - (*Isolated Ipsilateral breast tumor recurrence*) izolowany nawrót raka po tej samej stronie

IU - (*international unit*) jednostka międzynarodowa

JUN-N - (*Jun N-terminal kinase*) N-terminalna kinaza c-JUN

MAP - (*mitogen-activated protein*) białko aktywowane mitogenami

MAPK - (*mitogen-activated protein kinase*) kinaza aktywowana mitogenami

RNA - (*ribonucleic acid*) kwas rybonukleinowy

MMG - (*mammography*) mammografia

MMP9 - (*matrix metalloproteinase 9*) metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9

NAM - (*National Academy of Medicine*) Amerykańska Narodowa Akademia Medycyny

NF- $\kappa\beta$ - (*nuclear factor NF- $\kappa\beta$*) czynnik jądrowy - $\kappa\beta$

OPG - (*osteoprotegerin*) osteoprotegryna

PET- politereftalan etylenu

PG - (*prostaglandin*) prostaglandyny

PGE₂ - (*prostaglandin E2*) prostaglandyna E₂

PIN - (*prostatic intraepithelial neoplasia*) śródnabłonkowa neoplazja gruczołu krokowego

POZ - podstawowa opieka zdrowotna

PSA - (*prostate specific antigen*) antygen specyficzny dla prostaty

PTOK - Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

RANKL - (*receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand*) ligand RANK

Rb - (*retinoblastoma*) białko retinoblastoma

RTH - (*radiotherapy*) radioterapia

RXR - (*retinoid X receptor*) receptor retinoidowy X

SACN - (*Scientific Advisory Committee on Nutrition*) Naukowy Komitet Doradczy ds. Zaleceń Żywnościowych

SCFA - (*short-chain fatty acids*) krótko-łańcuchowe kwasy tłuszczowe

SEOM - (*Sociedad Española de Oncología Médica*) Hiszpańskie Towarzystwo Medycyny Onkologicznej

SHGB – (*sex hormone binding globulin*) białko wiążące hormony płciowe

SRC-1 - (*steroid receptor coactivator*) koaktywator receptora steroidowego-1

STAT3 - (*signal transducer and activator of transcription 3*) przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji 3

TERT - (*telomerase reverse transcriptase*) odwrotna transkryptaza telomerazowa

TFIIB - (*transcription factor II B*) czynnik transkrypcyjny II B

TGF- β - (*transforming growth factor β 1*) transformujący czynnik wzrostu β

TIMP1 - (*metallopeptidase inhibitor 1*) inhibitor 1 metalopeptydazy TIMP

TIS - (*carcinoma in-situ*) rak in situ

TLR - (*toll-like receptors*) receptor toll-podobny

TNF- α - (*tumor necrosis factor α*) czynnik martwicy nowotworów

UE - (*European Union*) Unia Europejska

USA - (*United States of America*) Stany Zjednoczone Ameryki

UV- (*ultraviolet*) promieniowanie ultrafioletowe

UV-B - promieniowanie ultrafioletowe typu B

VDR - (*vitamin D receptor*) receptor jądrowy witaminy D

VDRE - (*vitamin D response element*) element odpowiedzi witaminy D

VEGF - (*vascular endothelial growth factor*) czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

1. WSTĘP

1.1 WITAMINA D

1.1.1 Historia badań nad witaminą D

Witamina D jest jednym z najstarszych filogenetycznie hormonów, gdyż była syntetyzowana już przez pierwsze formy życia ponad 750 ml lat temu.[1] Odkrycie i naukowe opisanie witaminy D powiązane jest z badaniami nad krzywicą. W 1650 roku Daniel Whistler opisał krzywicę, natomiast jej dokładny obraz kliniczny przedstawił pięć lat później Francis Glisson.[2] Jędrzej Śniadecki w 1822 roku po latach obserwacji prowadzonych na dzieciach chorujących na krzywicę, jako pierwszy opisał metodę leczenia tej choroby przy pomocy „kąpiele słonecznych”. [3] Do podobnych wniosków łączących występowanie krzywicy ze zbyt krótką ekspozycją na słońce, doszedł 43 lata później francuski lekarz - internista Armand Trousseau.[4]

Kolejnym krokiem do wyjaśnienia mechanizmów powstawania i działania witaminy D była analiza częstości występowania krzywicy na różnych szerokościach geograficznych w Anglii, w zależności od intensywności nasłonecznienia wykonana w 1890 roku przez Theobalda Palma. Również Jan Raczyński, pediatra, profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Uniwersytetu Lwowskiego, w roku 1913 wykazał związek pomiędzy ekspozycją na światło słoneczne, a gospodarką wapniową u ludzi.[4, 5, 6] W roku 1919 ukazała się praca wiedeńskiego lekarza Kurta Huldshinsky'ego opisująca zasady helioterapii z wykorzystaniem lampy kwarcowej jako sztucznego źródła promieniowania UV w leczeniu krzywicy.[4]

W roku 1912 angielski profesor farmakologii Edward Mellanby stwierdził, że zapadalność na krzywicę wiąże się z niedoborem substancji czynnej rozpuszczalnej w tłuszczach, dostarczanych w produktach spożywczych.[4, 7, 8] W tym samym roku po 8 latach

badania amerykański biochemik Elmer Mc Collum po serii eksperymentów na szczurach doprowadzanych do krzywicy na skutek żywienia dietą eliminacyjną, wykazał, że dodatek oleju rybnego cofa zmiany krzywiczne. Nazwał ową hipotetyczną substancję witaminą D. Litera „D” wynikała z faktu, iż była ona czwartą z kolei odkrytą witaminą.[2, 4] Dwa lata później brytyjscy uczeni Harry Goldblatt i Katharine Marjorie Soames powiązali rolę światła i żywienia w rozwoju krzywicy. Objaśnili mechanizm zachodzący w skórze, w którym pod wpływem promieniowania słonecznego prekursor witaminy D (7-dehydrocholesterol, 7-DHC) przekształcany jest w rozpuszczalną w tłuszczach witaminę D. Rok później dwa niezależne zespoły badawcze (prowadzone przez Alfreda F. Hessa i Mildred Weinstock oraz Harrego Steenbocka i Archiego Blacka) stwierdziły, że naświetlanie niektórych produktów spożywczych promieniami UV-B nadaje im właściwości przeciwno-krzywiczne.[9]

Z kolei badania nad chemiczną strukturą witaminy D prowadził zespół 55 chemików kierowanych przez profesora Adolfa Windausa w Uniwersytecie w Getyndze w Niemczech. Owocem tych prac była przyznana w 1928 roku Nagroda Nobla w dziedzinie chemii za badania nad zależnością pomiędzy sterolami a witaminami. Pełną budowę cząsteczki witaminy D opisano w roku 1930.[9, 10]

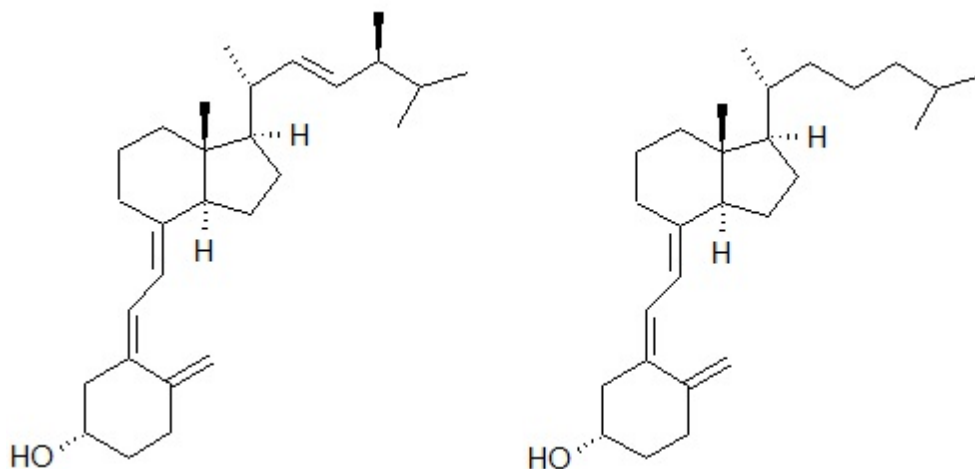
Ergokalcyferol czyli witamina D₂ z poddanych naświetlaniu produktów spożywczych została wyizolowana w 1931 roku przez Frederica Andertona w Anglii, a rok później powtórzyli to Windaus i wsp. w Niemczech. Grupa Windausa w roku 1936 uzyskała z 7-DHC witaminę D₃ czyli cholekalcyferol.[9] W latach 70-tych XX wieku wyizolowano aktywne metabolity witaminy D. Początkowo Mark Haussler i wsp. wyizolowali 25-hydroksycholekalcyferol, następnie w roku 1971 Michael Holick zidentyfikował aktywną hormonalnie postać 1,25-dihydroksycholekalcyferolu.[9]

Przełomowym momentem w badaniach nad witaminą D były wyniki badań Walettra Stumpfa i wsp., którzy w 1979 roku wykazali obecność receptorów dla witaminy D (Vitamin D Receptor - VDR) w tkankach i narządach niezwiązanych z gospodarką wapniowo-fosforanową.[11] Dało to początek badaniom nad tzw. „nieklasycznym” lub „niekalcemicznym” działaniem witaminy D.

1.1.2 Witamina D, jej źródła i metabolizm

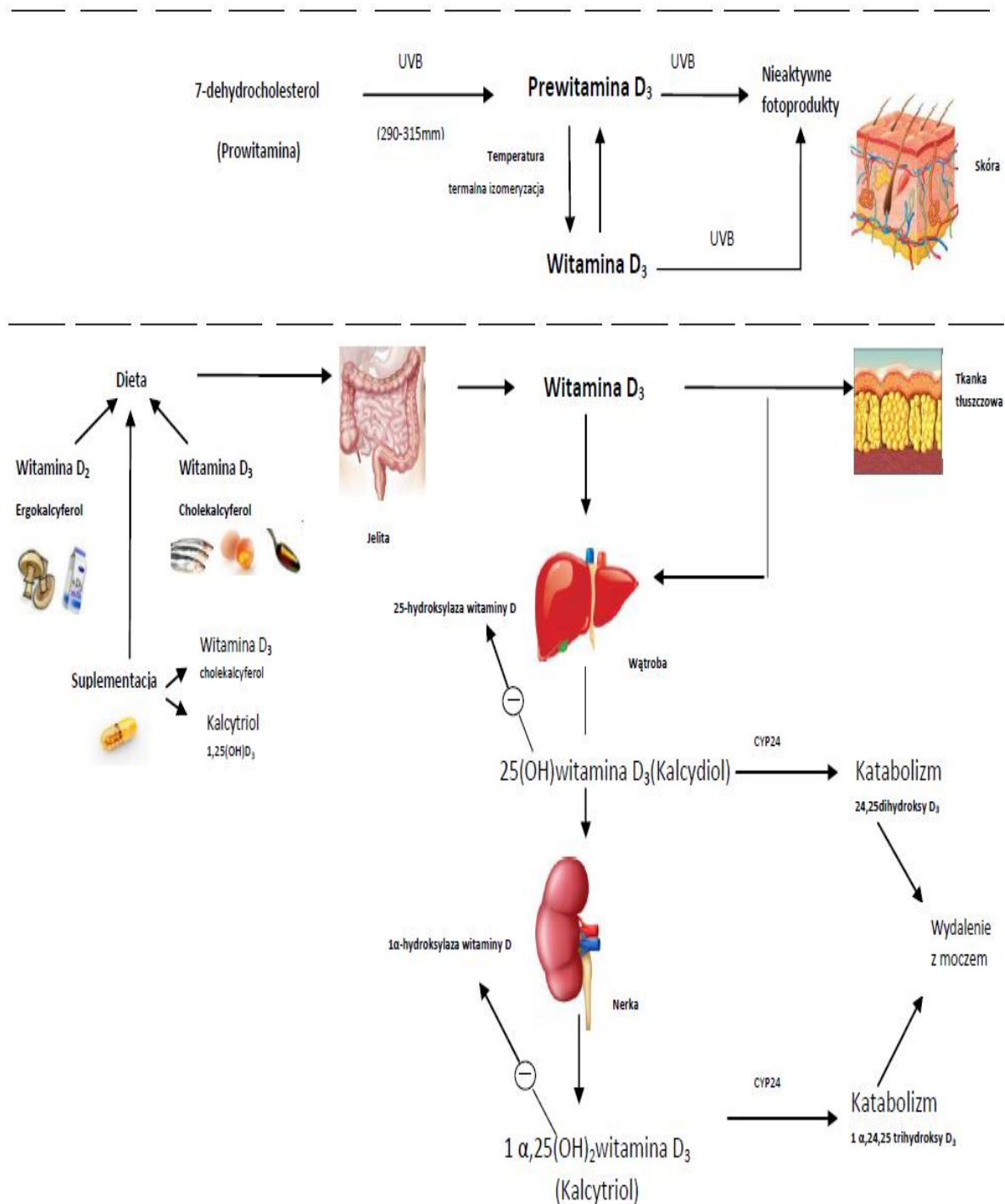
Termin witamina D odnosi się do grupy trzech, rozpuszczalnych w tłuszczach, organicznych związków chemicznych (9,10-sekosteroidów), z których dwa D₂ (ergokalcyferol) i D₃ (cholekalcyferol) są szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu

człowieka. Witamina D₂ i witamina D₃ różnią się jedynie budową łańcucha bocznego. W witaminie D₂ występuje dodatkowe wiązanie podwójne i grupa metylowa (Rycina 1).



Rycina 1. Wzór struktury witaminy D₂ (ergokalcyferolu), po lewej i witaminy D₃ (cholekalcyferolu), po prawej.

Badania wskazują, że u ludzi witamina D w większości (do 90%) uzyskiwana jest syntezą skórnej jako produkt transformacji 7-dehydrocholesterolu, indukowanej przez promieniowanie ultrafioletowe (UV), pozostała część pochodzi z pożywienia.[12, 13] Z dietą możliwe jest dostarczenie witaminy D₂, która jest fotochemicznie syntetyzowana przez rośliny i witaminy D₃ pochodzącej z produktów pochodzenia zwierzęcego m.in. takich jak ryby, jaja, pełne mleko, tłuste sery.[14, 15, 16] Źródła witaminy D u ludzi przedstawiono na rycinie 2.



Rycina 2. Źródła witaminy D.

Kluczowe różnice w pozyskiwaniu witaminy D na drodze endogennej syntezy i z diety przedstawiono w tabeli 1.

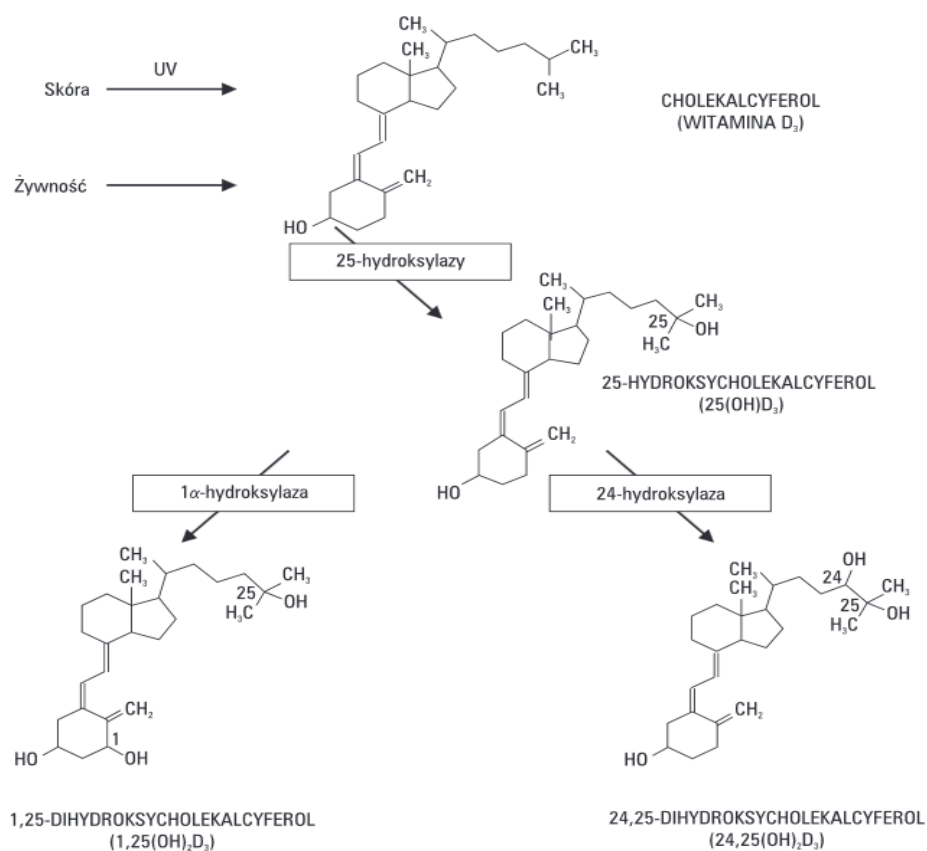
Tabela 1. Kluczowe różnice w pozyskiwaniu endo- i egzogennej witaminy D. Opracowano w oparciu o „25-Hydroxyvitamin D as a biomarker of vitamin D status and its modeling to inform strategies for prevention of vitamin D deficiency within the population”, Cashman KD i wsp. Adv Nutr. 2017.[17]

Witamina D pozyskiwana przy udziale światła słonecznego	Witamina D pozyskiwana z diety
UVB do syntezy witaminy D jest dostępne sezonowo przy wyższych szerokościach geograficznych	Dostępna w ciągu całego roku
Dla szerokości od 37-60 °N, UVB właściwe do syntezy witaminy D dostępne jest odpowiednio od 1 do 6 miesięcy w ciągu roku	Nieliczne produkty spożywcze są naturalnie bogate w witaminę D
W celu syntezy witaminy D osoba musi przebywać poza budynkami i eksponować skórę na promieniowanie UVB	Suplementy witaminy D wpływają znacząco na wzrost poziomu witaminy D w surowicy krwi
Osoba nie może przedawkować witaminy D pochodzącej z syntezy skórnej (jednakże wzrasta ryzyko raka skóry)	Pacjent może przedawkować witaminę D, jeżeli przyjmowana jest doustnie w dużych ilościach (wysokie dawki suplementów witaminy D, przez długi okres czasu)

Aktywna cząsteczka witaminy D - $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (znana również jako kalcytriol) syntetyzowana jest z nieaktywnej prowitaminy D_3 w ściśle kontrolowanym procesie, który przebiega w kilku etapach. Pierwszym etapem jest synteza witaminy D_3 z 7-dehydrocholesterolu (prowitaminy D_3) w skórze przy udziale promieniowania ultrafioletowego o długości fali 282-310 nm, które zmienia prowitaminę D_3 w prewitaminę D_3 . Zależna od temperatury izomeryzacja prewitaminy D_3 w warstwie podstawnej naskórka prowadzi do powstania witaminy D_3 (cholekalcyferolu). Prewitamina D_3 występuje w postaci izomerów cis i trans. Forma trans jest formą bardziej stabilną termodynamicznie przez co nie podlega procesowi izomeryzacji do witaminy D_3 . Mniej stabilna termodynamicznie forma cis prewitaminy D_3 ulega termicznej izomeryzacji do witaminy D_3 . Szybkość tej reakcji obniża się wraz ze spadkiem temperatury.[18] Kolejnym etapem jest wątrobowa hydroksylacja, w pozycji 25, prawdopodobnie katalizowana przez zespół 25-hydroksylaz witaminy D, tworzący białka cytochromowe (CYP, cytochrome protein): CYP27A1, CYP3A4 i CYP2R1. Wynikiem hydroksylacji jest powstanie 25-

hydroksycholekalcyferolu ($25(\text{OH})\text{D}_3$, kalcydiol) - głównego metabolitu witaminy D krążącego w organizmie człowieka, którego biologiczny czas półtrwania wynosi około 2 - 3 tygodnie. Pomiar stężenia $25(\text{OH})\text{D}_3$ w surowicy krwi jest powszechnie wykorzystywany w ocenie zasobów witaminy D w organizmie, zarówno pochodzącej z diety, jak i zsyntetyzowanej w skórze.

Kolejna hydroksylacja witaminy D zachodzi w pozycji 1 lub 24, wynikiem czego jest powstanie odpowiednio 1,25-dihydroksycholekalcyferolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) i 24,25-dihydroksycholekalcyferolu ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Enzymem kluczowym dla syntezy aktywnej biologicznie formy witaminy D jest 1α -hydroksylaza (CYP27B1), której najwyższą ekspresję odnotowuje się w komórkach kanalka proksymalnego nerki. Wykazano jej aktywność również m.in. w płucach, tkance kostnej, wątrobie, łożysku, skórze i makrofagach. Synteza 24,25-dihydroksycholekalcyferolu, katalizowana jest przez 24-hydroksylazę witaminy D (CYP24). Enzym ten jest obecny we wszystkich komórkach wrażliwych na działanie witaminy D. Biologiczne znaczenie $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nie zostało jeszcze zdefiniowane, wykazano jedynie, że $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ związana jest z regulacją wzrostu chrząstki i przebudową tkanki kostnej (Rycina 3).



Rycina 3. Uproszczony schemat przemian witaminy D.

Regulacja działania obu hydroksylaz (CYP27B1 i CYP24) odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hamuje aktywność CYP27B1, a aktywuje CYP24. Dodatkowo w regulację tego procesu zaangażowane są jony wapniowe, fosforanowe oraz hormony m.in. kalcytonina, parathormon, prolaktyna, glukokortykosteroidy, somatotropina i trijodotyronina.

Obie formy - $25(\text{OH})\text{D}_3$ jak i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ krążące we krwi są związane z białkami transportującymi. Większość, około 85%, związana jest przez specyficzny nośnik globulinowy - białko wiążące witaminę D (vitamin D - binding protein, DBP). DBP znacząco wydłuża okres półtrwania $25(\text{OH})\text{D}_3$ w surowicy. Obniża tempo nerkowej 1α -hydroksylacji $25(\text{OH})\text{D}_3$, jednocześnie ze względu na swoją wielkość, spowalnia bezpośrednią filtrację i wydalanie witaminy D z moczem. DBP moduluje stopień dostępności biologicznej witaminy D, aktywacji i działania na narządy docelowe. DBP chroni również organizm przed krótkotrwałymi niedoborami witaminy D. Pozostałą część, około 15%, wiąże niespecyficznie albumina. Jedynie 0,04% $25(\text{OH})\text{D}_3$ i 0,4% $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ krążących w krwioobiegu jest w stanie wolnym, niezwiązanym z białkami transportującymi.[14, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26]

Działanie kalcytriolu na komórki docelowe odbywa się za pośrednictwem receptorów jądrowych witaminy D (vitamin D receptor, VDR).[20] Witamina D po związaniu z receptorem witaminy D wpływa na ekspresję określonych genów poprzez regulację ich transkrypcji.[24]

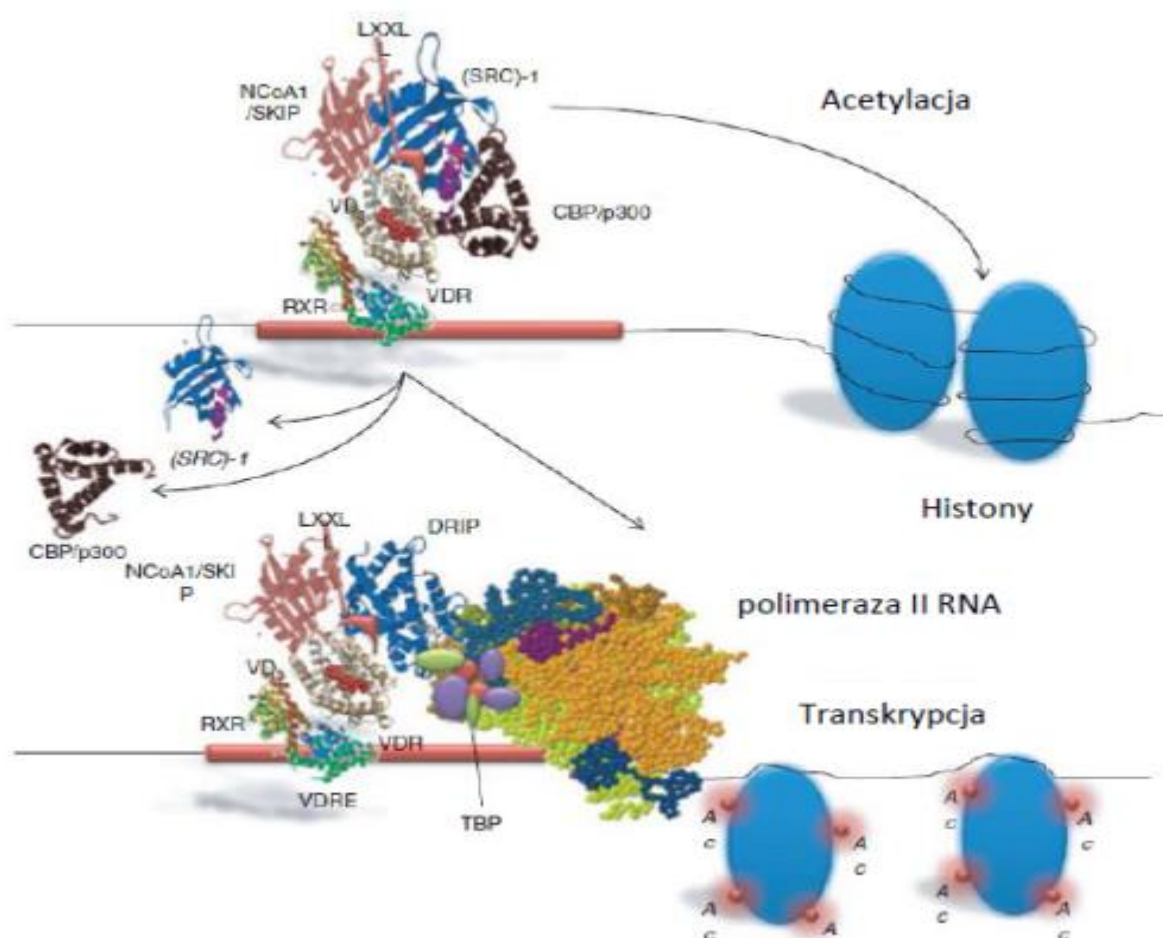
1.1.2.1 Budowa i występowanie receptora jądrowego witaminy D

Receptor jądrowy witaminy D ma masę cząsteczkową około 55 kDa i należy do II klasy receptorów jądrowych. Jest on zależnym od liganda czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję genów docelowych po związaniu odpowiednich sekwencji (vitamin D responsive elements, VDRE) w promotorach tychże genów. Ludzki receptor VDR jest białkiem składającym się z 427 aminokwasów i charakteryzuje się budową domenową.[27, 28] Postać wolna, niezwiązana z ligandem występuje jedynie w jądrze komórkowym. Za wiązanie z ligandem odpowiada zróżnicowana pod względem sekwencji aminokwasów, zlokalizowana w końcu karboksylowym receptora, domena E. Dzięki temu możliwa jest interakcja dystalnego fragmentu domeny wiążącej ligand (fragment AF-2) z czynnikami transkrypcyjnymi m.in. z białkiem koaktywatorowym SRC-1. Białko to wykazuje aktywność acetylazy histonowej. Acetylacja histonu prowadzi do transkrypcji genów odpowiedzialnych za kodowanie białek związanych z metabolizmem wapnia i fosforu tj. genów kodujących osteokalcynę (odpowiedzialną za wbudowywanie wapnia do kości), osteopontynę, 24-hydroksylazę (reguluje przemianę witaminy D), kalbidynę (CaBP; obecna w ścianie jelita umożliwia wchłanianie

wapnia). Regulacja innych genów zachodzi poprzez wiązanie się VDR do swoistej sekwencji DNA tzw. elementu odpowiedzi VDRE (vitamin D responsive element) w regionie promotorowym danego genu. Do genów regulowanych w tym mechanizmie należą np. gen amfireguliny- nabłonkowego czynnika wzrostu stymulującego rozwój raków głowy, szyi i sutka, białka bcl-2 (regulator apoptozy), geny białka p21 (inhibitor cyklu komórkowego), białka p53 (supresor onkogenów kontrolujących wzrost komórki takich jak np. c-fos).[28] Połączenie z DNA odbywa się dzięki dwóm „palcom cynkowym” konserwatywnej domeny C, odpowiedzialnym za rozpoznawanie odcinków regulatorowych genów. W aktywacji transkrypcji uczestniczy domena E wraz z N-kończową domeną A-B. Z kolei domena E wraz z domeną C bierze udział w dimeryzacji. Po połączeniu receptora z pochodnymi cholekalcyferolu dochodzi do heterodimeryzacji z receptorem dla retinoidu X (retinoid X receptor, RXR), związania z VDRE, przyłączenia innych białek koaktywujących (CBP/p300, p160, SRC-1, RAC3) i korepresorowych (NCoR), i utworzenia preinicjacyjnego kompleksu transkrypcyjnego. Aby kompleks VDR+RXR+1,25(OH)₂D₃ mógł wpłynąć na sekwencje DNA poprzez VDRE wymagane jest właściwe stężenie 1,25(OH)₂D₃. Acetylowane histony rozluźniają strukturę chromatyny, co pozwala na inicjację transkrypcji określonego genu (Rycina 4).[20, 24, 28]

Małe receptory do których należy VDR asocjują z TFIIB będącym podstawowym czynnikiem ograniczającym szybkość tworzenia się kompleksu przedinicjacyjnego. Interakcja ta jest konieczna do zależnej od ligandu aktywacji transkrypcji i w warunkach *in vivo* jest dodatkowo modulowana przez komórkowo swoiste czynniki towarzyszące. VDR oddziałuje fizycznie z TFIIB poprzez jego region C-końcowy. W interakcji VDR-TFIIB, ze strony receptora uczestniczy część proksymalna domeny wiążącej ligand E i prawdopodobnie domena wiążąca DNA.[28]

VDR występuje w klasycznych komórkach docelowych takich jak nabłonek jelit, kanaliki nerkowe, kości i przytarczyce, czyli narządach uczestniczących w regulacji gospodarki mineralnej, jak również w wielu innych narządach i tkankach m.in, jelicie grubym, prostaty, mięśniach szkieletowych, mózgu, komórkach nabłonkowych wątroby, nerek, tarczycy, skórze, trzustce, okrężnicy, macicy, jajniku, makrofagach i sutku. Colston i Feldman w roku 1980 byli pierwszymi badaczami, którzy zademonstrowali ekspresję receptora VDR i jego specyficzne wiązanie z 1,25(OH)₂D₃ w zdrowej tkance gruczołu piersiowego.[29] W kolejnych latach wykazano obecność tego receptora w komórkach większości typów raka sutka.



Rycina 4. Biologiczne działanie 1,25(OH)₂D₃.

Skróty: VDR - receptor jądrowy witaminy D, VDRE - element odpowiedzi witaminy D, RXR - receptor retinoidowego X, SRC-1 - koaktywator receptora steroidowego-1, TBP- Białko wiążące sekwencję TATA, DRIP- kompleks koaktywatora białek oddziałujących z receptorem witaminy D, LXXLL - koaktywator receptora jądrowego gdzie L to leucyna, X to każdy inny aminokwas, NCoA1- Koaktywator receptora jądrowego 1, CBP/p300 - rodzina białek koaktywujących transkrypcję. Opracowano w oparciu o „Vitamin D₃: a helpful immuno-modulator”. Di Rosa M. Immunology. 2011.[24]

1.1.3 Mechanizmy działania witaminy D

1.1.3.1. Mechanizm genomowy

Proces transkrypcji genu jest zapoczątkowany przyłączeniem kalcytriolu do heterodimeru VDR-RXR. Powstający kompleks po połączeniu z odpowiednią sekwencją DNA reguluje transkrypcję wielu genów. Odpowiedź na poziomie genomu wyrażona jest po kilku godzinach lub dniach. Ekspresja ponad 750 genów pozostaje pod kontrolą kalcytriolu.[19, 20]

1.1.3.2. Mechanizm pozagenomowy

Witamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ działa również na komórki docelowe w mechanizmie pozagenomowym, poprzez receptory błonowe. Działanie pozagenomowe witaminy D związane jest z aktywacją kinaz tyrozynowych z rodziny Src, co z kolei prowadzi do uruchomienia kaskady kinazy białkowej C lub kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (mitogen activated protein kinase, MAP). Odpowiedź pozagenomowa jest szybka, ujawnia się w ciągu kilku sekund do kilku minut. Wyraża się przez aktywację szlaków sygnałowych swoistych dla danej komórki.[11,20]

1.2 DZIAŁANIE WITAMINY D

1.2.1 Działanie klasyczne

Główną funkcją biologiczną aktywnej formy witaminy D jest utrzymanie homeostazy gospodarki wapniowo - fosforanowej oraz regulacja metabolizmu kostnego. Zapewnienie odpowiedniego stężenia jonów wapnia i fosforu w płynie pozakomórkowym jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji kości i zębów oraz prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Utrzymanie właściwego poziomu wapnia w organizmie polega głównie na regulacji jego wchłaniania w jelicie. Odbywa się to poprzez stymulujący wpływ witaminy D na syntezę białka wiążącego wapń, co zwiększa absorpcję wapnia w jelicie, ponadto wpływa na wzrost reabsorpcji Ca^{2+} w nerkach i uwalnianie Ca^{2+} z kości. Witamina D wpływa również na równowagę pomiędzy resorpcją kostną, a kościotworzeniem.[30] Witamina D pobudza specjalizację komórek tkanki kostnej, prowadząc do zwiększonego różnicowania szczególnie komórek odpowiedzialnych za wzmożone odkładanie wapnia w kościach.[28] Na poziomie genomowym ligand aktywatora receptora NF- κ B- RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) z udziałem kompleksu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ reguluje osteoklastogenezę. Kompleks ten wpływa również na osteoprotegrynę (OPG) hamując jej ekspresję. Glikoproteina ta poprzez

łączenie się z RANKL wpływa na aktywację i różnicowanie się osteoklastów. W warunkach fizjologicznych nadmierna stymulacja osteoklastogenezy jest hamowana przez OPG, która jest rozpuszczalnym receptorem dla RANKL. Związanie RANKL przez OPG hamuje proces stymulowanej resorpcji.[31] W zależności od dominacji jednego z opisanych procesów dochodzi do wzmożonego kościotworzenia i osteopetrozy w przypadku większej aktywności osteoprotegryny stymulującej aktywność osteoblastów, bądź dominacji procesów osteolitycznych i rozwoju osteopenii/osteoporozy przy zwiększonej aktywności RANKL. Ponadto, witamina D współdziałając z parathormonem zapewnia utrzymanie właściwego i ściśle określonego stężenia jonów Ca^{2+} w osoczu krwi.[28, 31]

Tak więc podstawowa fizjologiczna rola witaminy D związana jest z regulacją gospodarki wapniowo - fosforanowej i utrzymaniem prawidłowej budowy i funkcji kośćca poprzez bezpośredni wpływ na komórki kostne, jak i pośrednio przez jelito, nerki i przytarczycę.

W gruczole piersiowym klasyczna rola witaminy D sprowadza się do regulacji transportu wapnia do mleka (w czasie laktacji) i współdziałania z hormonami biorącymi udział w różnicowaniu komórek gruczołu mlekowego i produkcji białek wchodzących w skład mleka kobiecego.[32]

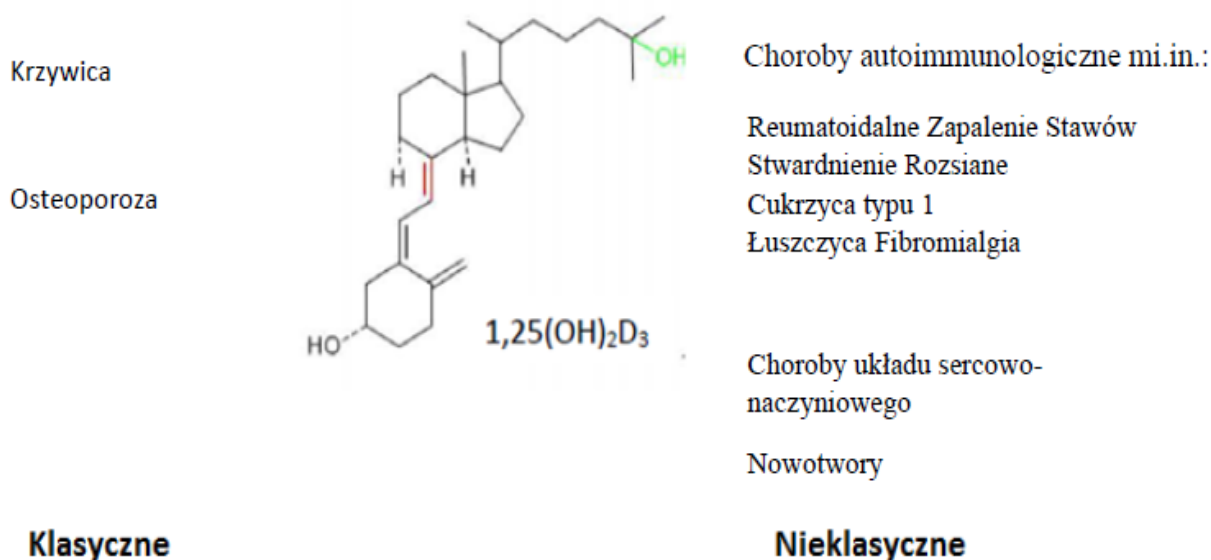
1.2.2 Nieklasyczne działanie witaminy D

Dość powszechne występowanie VDR zainicjowało badania nad tak zwanymi „nieklasycznymi” efektami działania witaminy D.[20, 28] Wyniki tych badań zmieniły pogląd na rolę witaminy D u ludzi. Udowodniono, że odgrywa ona rolę we właściwym funkcjonowaniu układu odpornościowego, sercowo-naczyniowego i rozrodczego.[14, 20] Dodatkowo niedobór witaminy D wiąże się zwiększoną zachorowalnością na cukrzycę typu 1 i 2, otyłość, astmę, choroby zapalne jelit oraz na nowotworzenie (Rycina 5). [27, 33]

1.2.2.1 Działanie immunomodulujące witaminy D

Witamina D jest czynnikiem regulującym odpowiedź immunologiczną - wpływa zarówno na pierwotną jak i wtórną odpowiedź immunologiczną, co związane jest z dwoma kluczowymi elementami. Pierwszym z nich jest obecność receptorów witaminy D w aktywowanych limfocytach T i B, monocytach, makrofagach, neutrofilach i komórkach dendrytycznych, drugim jest aktywny metabolizm witaminy D w komórkach układu immunologicznego, dzięki któremu mają one możliwość lokalnej konwersji $25(\text{OH})\text{D}_3$ do aktywnej formy $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Witamina D poprzez VDR ma hamujący wpływ na rozwój chorób autoimmunologicznych i działanie

przeciwzapalne na skutek promowania dojrzewania komórek dendrytycznych i regulatorowych limfocytów T, zahamowania odpowiedzi limfocytów pomocniczych Th17 i wydzielania cytokin.[34]

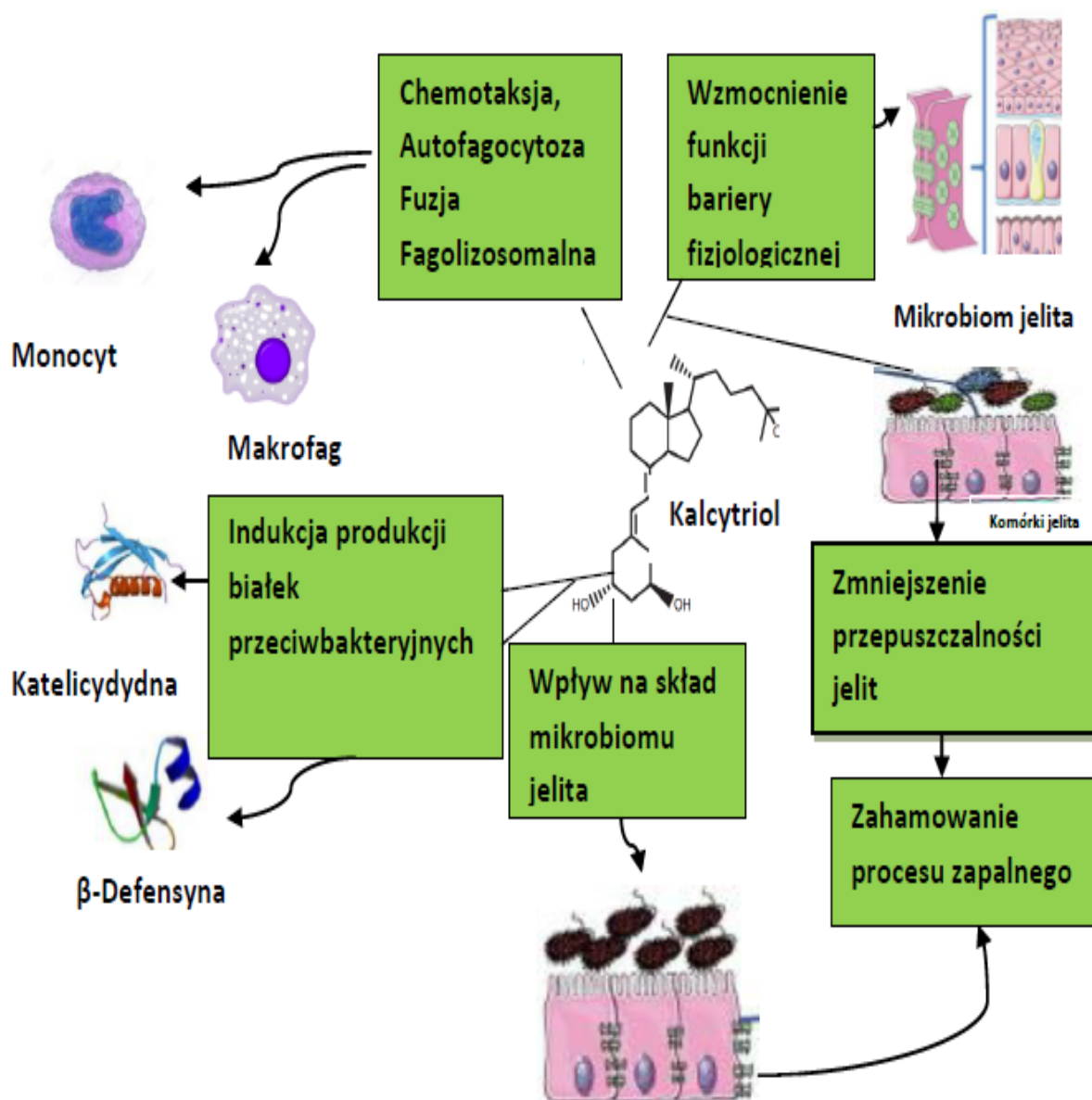


Rycina 5. Efekty niedoboru witaminy D w działaniu klasycznym i nieklasycznym. Opracowano w oparciu o „Role of vitamin D metabolism and activity on carcinogenesis”. Wu X, Oncol Res 2014, [27]

1.2.2.1.1. Wpływ witaminy D na odpowiedź pierwotną

Mechanizmy odpowiedzialne za wpływ witaminy D na pierwotną odpowiedź immunologiczną związane są ze zwiększeniem syntezy białek przeciwbakteryjnych: katelicyny (cathelicidin antimicrobial peptide CAMP) i $\beta 2$ defensyny. Geny kodujące te białka posiadają miejsca wiązania z receptorem witaminy D, a ich ekspresja jest zależna od witaminy D.[34, 35, 36] Szlak stymulacji katelicyny i defensyny zachodzi przez pobudzenie znajdujących się na powierzchni makrofagów i monocytów receptorów TLR (Toll Like Receptors), które wzmagają ekspresję genu CYP27B1 (1α -hydroksylazy). Wzmaga się dzięki temu proces przemiany kalcydiolu do kalcytriolu - aktywnej formy witaminy D.[35] Kalcytriol po utworzeniu kompleksu z receptorem VDR stanowi w tym układzie czynnik transkrypcyjny oddziałujący z miejscem wiązania w genach kodujących katelicynę i defensynę. Działanie to nasila przeciwbakteryjną aktywność monocytów i makrofagów.[35, 36, 37, 38, 39] Ponadto $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wzmacnia chemotaksję, autofagocytozę i fuzję lizosomów komórek fagocytujących.[40, 41] $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

zwiększa produkcję katelicydyn nie tylko przez monocyty/makrofagi, ale również poprzez inne komórki biorące udział w mechanizmach pierwotnej odpowiedzi immunologicznej należących do tzw. pierwszej linii obrony organizmu tj. keratynocyty, komórki nabłonkowe jelita cienkiego, płuc i jelita grubego oraz trofoblast łożyska.[42] (Rycina 6)



Rycina 6. Wpływ witaminy D na pierwotną odpowiedź immunologiczną i mikrobiom jelitowy. Opracowano w oparciu o „Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator.” Sassi F., Nutrients 2018 [34]

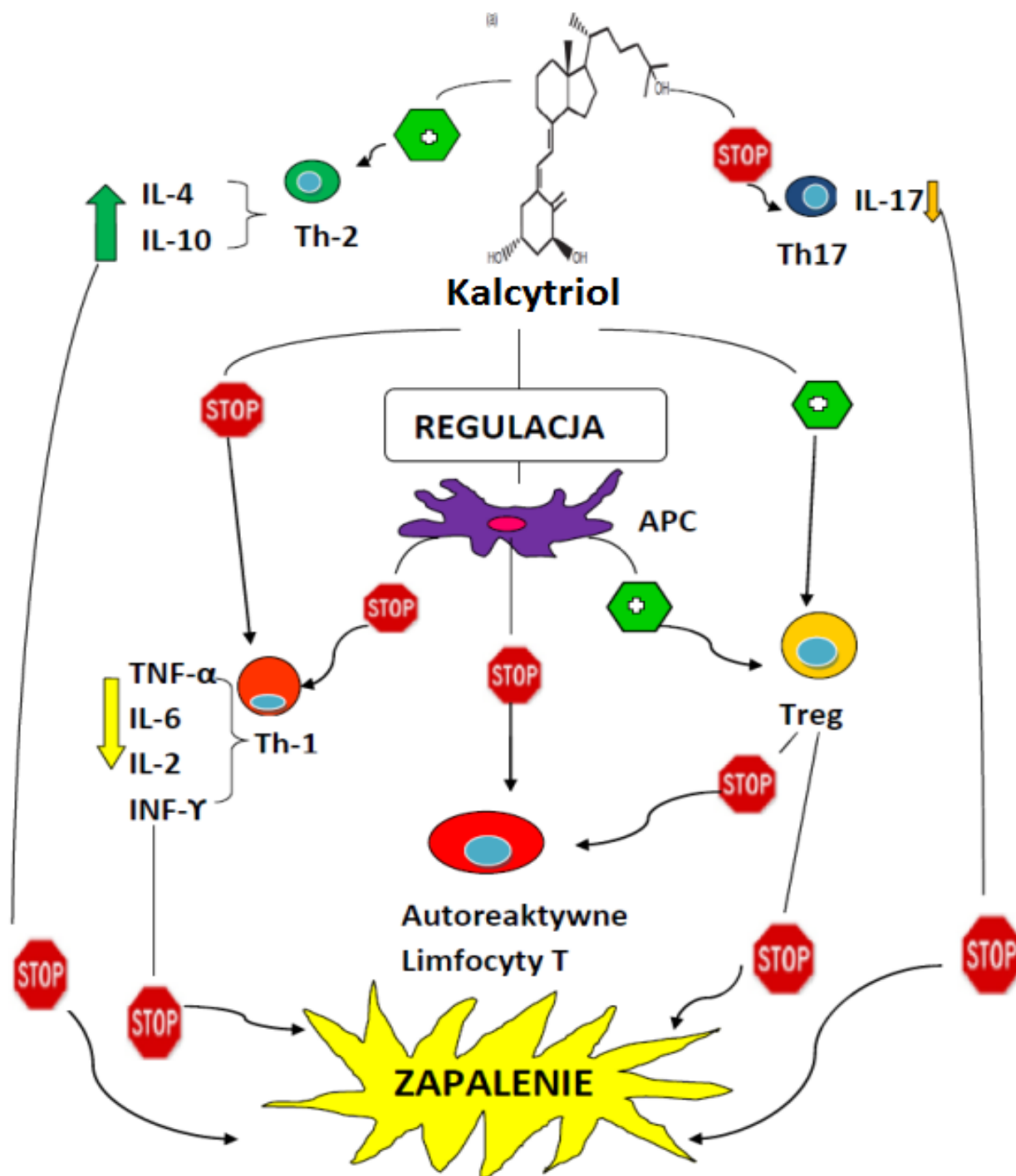
Witamina D moduluje odpowiedź układu odpornościowego nie tylko przez indukcję syntezy katelicydyn i defensyn, ale również przez regulację funkcji limfocytów T oraz wpływ na różnicowanie, dojrzewanie i funkcję komórek dendrytycznych.[20, 43] Kalcytriol wpływa też na

wydzielanie cytokin hamując nadmierną ekspresję cytokin prozapalnych oraz wpływa na zwiększenie syntezy IL-10, która m.in. bierze udział w hamowaniu wytwarzania cytokin prozapalnych w tym IL-2 i interferonu γ . [44, 45, 46]

1.2.2.1.2. Witamina D i nabyta odpowiedź immunologiczna

Wykazano, że 25(OH)D₃ hamuje wtórną odpowiedź immunologiczną. [42, 47] W modelach eksperymentalnych wykazano hamowanie odpowiedzi immunologicznej zależnej od udziału limfocytów pomocniczych T helper typu 1 (Th1), co skutkuje obniżeniem produkcji cytokin zapalnych takich jak interferon- γ (INF- γ), IL-6, IL-2 i TNF- α . [42, 48, 49] Sugeruje się, że 1,25(OH)₂D₃ działa jako immunomodulator poprzez hamowanie aktywacji komórek Th1, ale również poprzez modulowanie aktywności komórek Th2, limfocytów T regulatorowych (Treg) i komórek Th17. Większość badań *in vitro* wskazuje, że witamina D₃ zwiększa aktywność komórek Th2. [34] Immunomodulujący wpływ witaminy D wyraża się również w jej zdolności do hamowania komórek Th17 i wzmacniania aktywności komórek Treg. [50, 51, 52]

Działanie witaminy D na dojrzewanie komórek Th może być wywołane przez jej wpływ na komórki dendrytyczne, które należą do komórek prezentujących antygen (antygen-presenting cells APCs), i które są odpowiedzialne za stymulację dojrzewania natywnych komórek T w komórki efektorowe wykazujące działanie pro- lub przeciwzapalne. Ta modulacja APCs jest elementem krytycznym dla inicjacji i podtrzymania wtórnej odpowiedzi immunologicznej i wytworzenia tolerancji dla własnych antygenów. [53] Dojrzewanie *in vitro* komórek dendrytycznych w obecności 1,25(OH)₂D₃ indukuje „stan tolerancji immunologicznej” charakteryzujący się niskim poziomem cytokin prozapalnych, takich jak IL-12 i TNF- α i zarazem wzrostem stężenia cytokiny przeciwzapalnej IL-10, ponadto prowadzi do indukcji dojrzewania komórek Treg oraz apoptozy autoreaktywnych komórek T (Rycina 7). [34]



Rycina 7. Wpływ witaminy D na wtórną odpowiedź immunologiczną. Skróty: APC- komórki prezentujące antygeny; IL -interleukina; Th1- Limfocyty Th1; Th2- Limfocyty Th2; Th17- Limfocyty Th17; TNF- czynnik martwicy nowotworów; Treg- Limfocyty regulatorowe; INF- interferon. Opracowano w oparciu o „ Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator.” Sassi F., Nutrients 2018 [34]

1.3 DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE WITAMINY D

Odkrycie jądrowego receptora witaminy D (VDR) i wykazanie jego obecności w komórkach układu odpornościowego oraz w komórkach linii nowotworowych dało początek badaniom nad rolą witaminy D w rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych.[20] Publikowane od 80 lat wyniki obserwacji, analiz epidemiologicznych, badań przedklinicznych i klinicznych silnie sugerują, że wraz z niedoborem witaminy D wzrasta ryzyko rozwoju pewnych typów nowotworów.[54]

Już w roku 1941 Frank Apperly wykazał ujemną korelację pomiędzy ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe a śmiertelnością z powodów raka w lokalizacjach pozaskórnych. Wsunął on hipotezę, że światło słoneczne wzmacnia siły obronne organizmu w przypadku nowotworów o lokalizacji innej niż skórna. Schwartz i Hanchette wykazali, że wiele nowotworów takich jak rak jelita grubego czy prostaty występuje ze zwiększoną częstością w wysokich szerokościach geograficznych, co wiążali z niskim surowiczym stężeniem witaminy D.[55] Podobne wyniki badań epidemiologicznych opublikowali Garland i Garland w 1980 roku w przypadku raka jelita grubego i Schwartz i Hulka w przypadku raka prostaty w 1990 roku postulując, że w stanie niedoboru witaminy D wzrasta ryzyko zachorowania na te nowotwory.[56, 57] Podobne zależności stwierdzono później dla nowotworów w lokalizacjach takich jak: piersć, jajniki, trzustka, przez co witamina D stała się potencjalnym czynnikiem zapobiegającym rozwojowi procesu nowotworowego.[58, 59] Opublikowane przez Giovannuciego i wsp. wyniki badania Health Professionals Follow-up Study (zależności pomiędzy stężeniem osoczym witaminy D z całkowitą liczbą zachorowań na nowotwory i śmiertelnością) wskazują, iż utrzymanie optymalnego stężenia witaminy D koreluje znamienne z obniżeniem zachorowalności na nowotwory i z redukcją śmiertelności z tego powodu.[60]

Rak jelita grubego i odbytnicy. Prawdopodobnie najbardziej jednoznaczne relacje pomiędzy stężeniem 25(OH)D₃, a ryzykiem rozwoju nowotworu wykazano w przypadku raka jelita grubego. Wyniki czterech metaanaliz opublikowane w 2011 roku wskazują, iż wyższe stężenie 25(OH)D₃ we krwi jest związane z niższym ryzykiem zarówno raka jelita grubego jak i odbytnicy. Ujemne korelacje o podobnej sile wykazano też w badaniach Touviera i wsp. dla raka jelita grubego i odbytnicy.[61] Najnowsze badania McCollough i wsp. z 2019 roku obejmujące 17 kohort w których wzięło udział 5706 osób z rakiem jelita grubego i 7107 osób stanowiących grupę kontrolną wykazały, że osoby u których stężenie 25(OH)D₃ wynosiło poniżej 12 ng/ml (30 nmol/l) miały o 31% wyższe ryzyko zachorowania na raka jelita grubego. Z kolei osoby, u których te stężenia były

wysokie (wynosiły w przedziałach 30-35 ng/ml i 35-40 ng/ml (75-87,5 i 87,5-100 nmol/l) ryzyko raka jelita grubego było obniżone (odpowiednio o 19% i 27%). Określono również, że każdy wzrost krążącej 25(OH)D₃ o 10 ng/ml (25 nmol/l) wiąże się z obniżeniem ryzyka raka jelita grubego u kobiet o 19% i 7% u mężczyzn.[62] Jest też jedno badanie sugerujące wzrost ryzyka raka jelita grubego wraz ze wzrostem stężenia witaminy D.[63]

Rak pęcherza. Wyniki dwóch metaanaliz (przeprowadzonych przez Zhang i wsp. oraz Zhao i wsp.) w których każda zawierała 7 pojedynczych badań zarówno pro- jak i retrospektywnych wykazały, że wyższe stężenie 25(OH)D₃ w surowicy było powiązane z niższym ryzykiem raka pęcherza u ludzi, przy czym Zhao i wsp. określili, iż jedynie stężenie powyżej 30 ng/ml (75 nmol/l) zapewnia działanie protekcyjne.[64, 65]

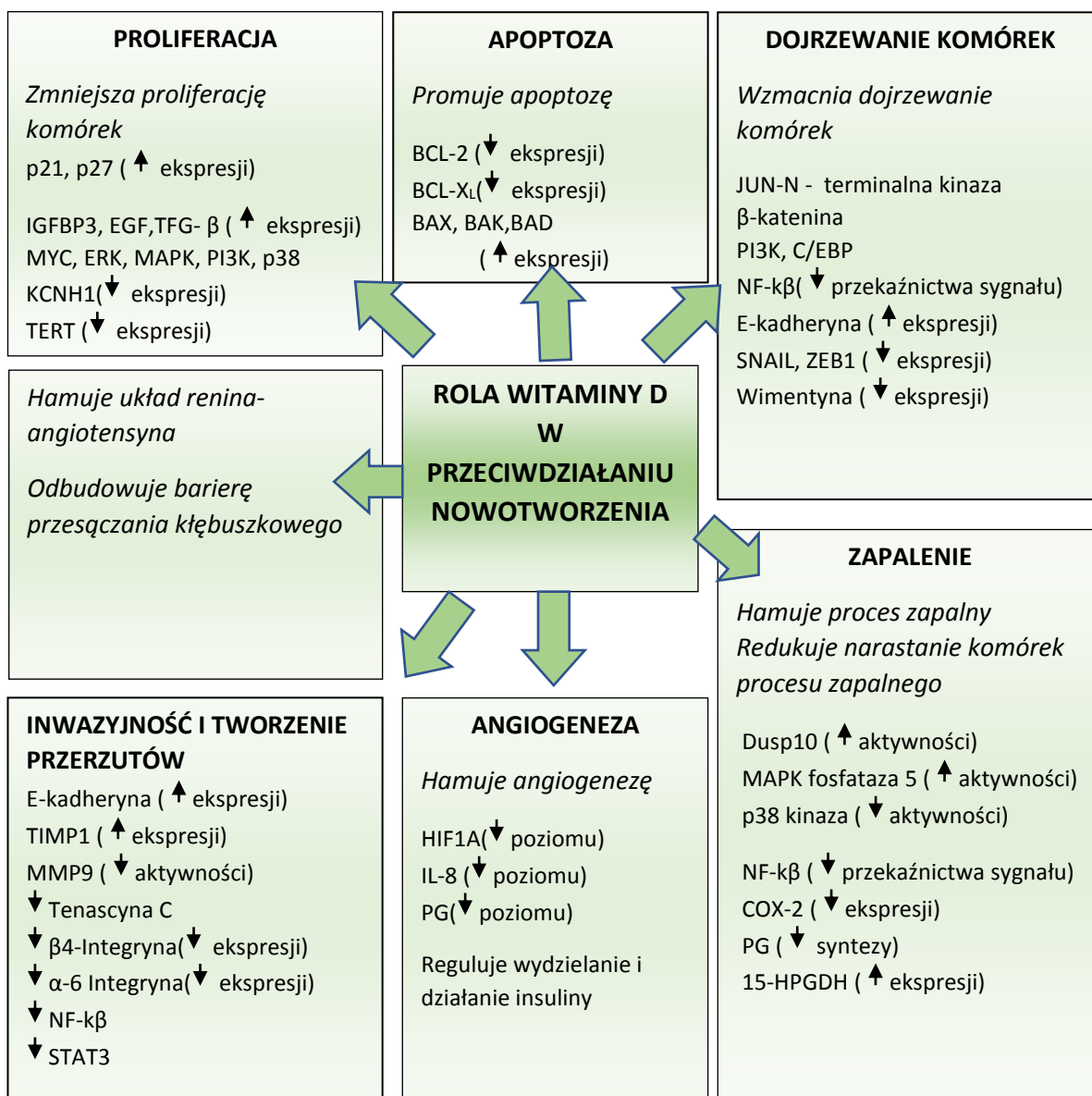
Rak płuc i jajnika. Ujemną korelację stężenia witaminy D z ryzykiem rozwoju nowotworu wykazano w metaanalizach również w odniesieniu do raka płuca i jajnika, przy czym dla raka jajnika zależność ta nie wykazywała istotności statystycznej.[66, 67, 68]

Rak sutka. W wielu badaniach oceniano zależność pomiędzy poziomem witaminy D a ryzykiem raka sutka. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów wielu badaczy stwierdziło ujemną korelację pomiędzy stężeniem witaminy D a ryzykiem tego raka. W 1990 roku Garland i wsp. jako pierwsi wykazali negatywną zależność pomiędzy całkowitą, średnioroczną ekspozycją na promieniowanie słoneczne a zależną od wieku śmiertelnością pacjentek z powodu raka sutka. W sześciu badaniach kliniczno - kontrolnych oceniających zależność pomiędzy dobowym spożyciem witaminy D i ryzykiem raka sutka wykazano, że kobiety z najwyższym dobowym spożyciem (> 190 IU) miały o 34% niższe ryzyko raka sutka w porównaniu do tych z najniższym spożyciem (< 60 IU). Podobne rezultaty uzyskano w Women's Health Study w którym przebadano 10,578 kobiet przed menopauzą i 20,909 kobiet po menopauzie. Wyższe spożycie witaminy D było powiązane z niższym ryzykiem raka sutka u kobiet przed menopauzą. U kobiet po menopauzie nie stwierdzono takich zależności.[27] Z metaanalizy przeprowadzonej przez Chen i wsp. wynika, że u kobiet w najwyższym kwantylu surowiczych stężeń 25(OH)D₃ ryzyko raka sutka było 45% niższe w porównaniu z kobietami w najniższym kwantylu stężeń witaminy D.[14] Kolejna metaanaliza przeprowadzona przez Bauera i wsp. obejmująca 5202 przypadków kobiet z rakiem sutka i 6450 w grupie kontrolnej również wykazała istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy stężeniem w surowicy 25(OH)D₃, a ryzykiem raka sutka. Dodatkowo wykazano, że status menopauzalny może mieć wpływ na relację pomiędzy krążącą 25(OH)D₃ a ryzykiem raka sutka.[69] Również Shao i wsp. w zbiorczej analizie 8 badań wykazali, że wyższe stężenie 25(OH)D₃ było powiązane z niższym ryzykiem zachorowania na raka sutka. Jednakże w

badaniach tych nie brano pod uwagę czasu pobrania krwi do oznaczeń stężenia witaminy D, przed czy po zdiagnozowaniu raka sutka.[70] Dwie metaanalizy na które składały się badania retro- i prospektywne, niezależnie wykazały, że ujemna korelacja ryzyka raka sutka ze stężeniem witaminy D występowała jedynie w badaniach retrospektywnych.[71, 72] Podobnie Yin i wsp. stwierdzili ujemną korelację w 5 retrospektywnych badaniach oraz brak zależności w 4 prospektywnych badaniach.[71, 72] Wyniki kolejnych metaanaliz badań prospektywnych wykazały pewne powiązanie stężenia 25(OH)D₃ z ryzykiem raka sutka jedynie w specyficznych subpopulacjach kobiet w odniesieniu do statusu menopauzalnego oraz pochodzenia etnicznego.[73]

1.3.1 Mechanizmy działania przeciwnowotworowego witaminy D

Witamina D wykazuje właściwości przeciwnowotworowe poprzez wpływ na odczyn zapalny, regulację wzrostu i proliferacji oraz stymulację dojrzewania komórek. Jej aktywny metabolit 1,25(OH)₂D₃ wiążąc się z jądrowym receptorem VDR dla witaminy D wpływa na ekspresję specyficznych genów. Geny na których ekspresję wpływa witamina D kodują z kolei białka regulujące przywołane wyżej procesy. Dodatkowo hamuje angiogenezę i zdolność do tworzenia przerzutów, wpływa na zmniejszenie liczby receptorów estrogenowych, hamuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych, reguluje ekspresję miRNA, moduluje ścieżkę sygnałową Hedgehog oraz indukuje apoptozę komórek raka sutka *in vitro* i *in vivo*. [15, 19, 74, 75, 76] W stanie niedoboru witaminy D, dochodzi do dysregulacji wzrastania i proliferacji komórek, ułatwienia neoangiogenezy i karcynogenezy. Witamina D może odgrywać rolę w kontrolowaniu wzrostu zarówno zdrowych komórek gruczołu piersiowego jak i pomagać w zapobieganiu rozrostu nowotworowego. Wykazano, że przynajmniej 35 genów podlega regulacji przy udziale witaminy D w tkance gruczołu piersiowego, a aktywność tych genów wiąże się z inwazyjnością i tworzeniem przerzutów nowotworowych.[77] Podsumowanie tych mechanizmów przedstawiono na rycinie nr 8.



Rycina 8. Mechanizmy przeciwnowotworowego działania witaminy D.

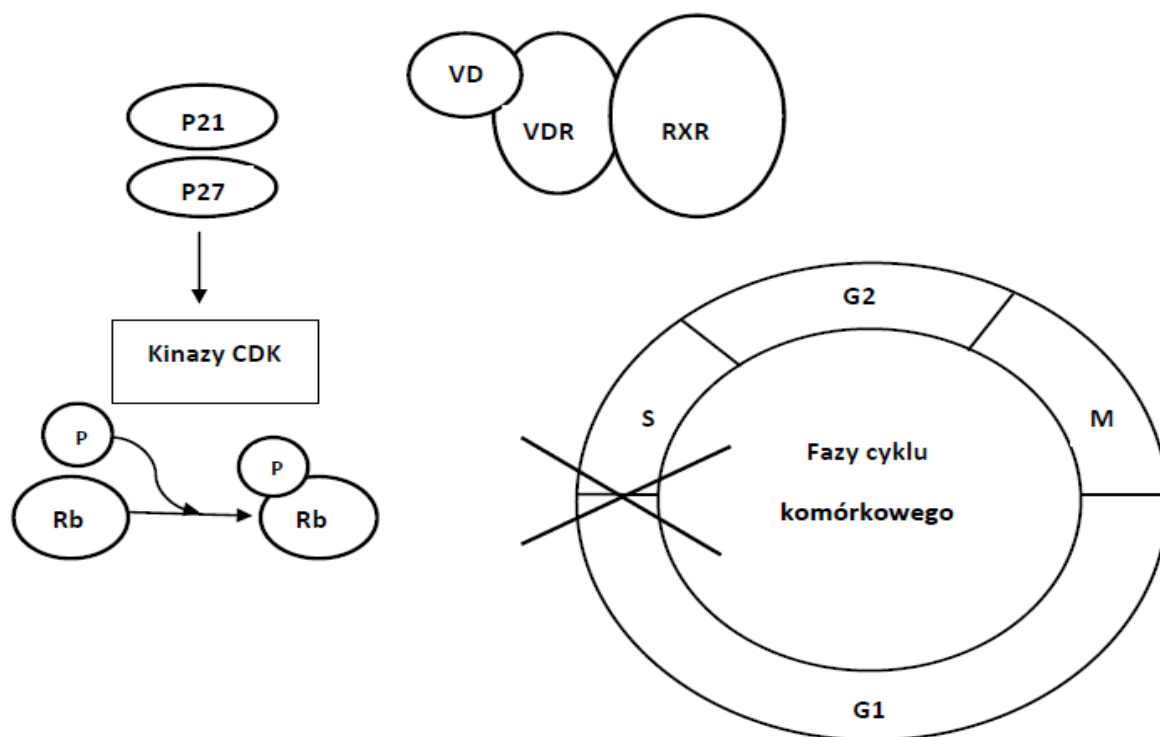
1.3.1.1 Zapalenie

Wiadomo, że mikrośrodowisko wytworzone w obrębie tkanki objętej stanem zapalnym utrzymuje, wzmacnia i promuje procesy, które są kluczowe dla rozwoju zmian nowotworowych. Udział stanu zapalnego w nowotworzeniu związany jest z takimi procesami jak angiogeneza, wzrost i przeżycie komórek, inwazyjność i tworzenie przerzutów, odpowiedź na leczenie oraz mechanizmami immunologicznymi zachodzącymi w obrębie tkanki nowotworowej. Witamina D przyczynia się do zmniejszenia nasilenia stanu zapalnego, a mechanizmy które są za to odpowiedzialne wiążą się z:

- Zwiększeniem syntezy fosfatazy białkowej o podwójnej specyficzności 10 (DUSP10) lub fosfatazy 5 z grupy kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), która hamuje szlak sygnałowy kinazy białkowej p38 aktywowanej stresem. To prowadzi do obniżenia produkcji cytokin prozapalnych.
- Obniżeniem aktywności szlaku sygnałowego NF- κ B, będącego jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję genów wpływających na szeroki zakres procesów biologicznych, w tym wrodzoną i adaptacyjną odporność, zapalenie, odpowiedź na stres, dojrzewanie limfocytów B i organogenezę limfatyczną.
- Obniżeniem aktywności cyklooksygenazy 2 (COX2), co wpływa na redukcję syntezy prostaglandyn prozapalnych.
- Wzrostem aktywności dehydrogenazy 15-hydroksyprostaglandynowej (zaangażowanej w katabolizm prostaglandyn) i obniżeniem ekspresji receptorów prostaglandynowych, co wpływa hamująco na szlak sygnałowy prostaglandyn.
- Zwiększeniem wydzielania przeciwzapalnej IL-10 i produkcji regulatorowych limfocytów T z jednoczesnym obniżeniem produkcji cytokin prozapalnych wydzielanych przez limfocyty T pomocnicze takich jak IL-2, IL-32, IL-17 i interferon- γ . [15, 19]

1.3.1.2 Proliferacja komórkowa

Regulacja proliferacji komórkowej przez witaminę D związana jest z jej wpływem na cykl komórkowy poprzez cykliny oraz kinazy zależne od cyklin. Przechodzenie komórek w cyklu komórkowym z fazy G1 do fazy S jest między innymi uwarunkowane fosforylacją białka retinoblastoma (Rb), co wyzwala uwolnienie czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F, które aktywują szereg genów związanych z postępowaniem cyklu komórkowego włączając w to cykliny E i A. Cykliny G1 i zależne od nich kinazy (cyklin dependent kinase, CDK) katalizują fosforylację Rb, ich aktywność jest natomiast hamowana przez białko p21. Badania *in vitro* wykazały, że 1,25(OH)₂D₃ połączona z VDR wiąże się z miejscem regulatorowym w obszarze promotora genu p21, tym samym zwiększając jego ekspresję. Prowadzi to do zahamowania kinaz CDK i fosforylacji białka retinoblastoma (białko Rb) i w efekcie zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1. Podobne działanie na CDK ma regulacja ekspresji genu p27, również hamowana przez 1,25(OH)₂D₃ (Rycina 9). [20, 78]



Rycina 9. Hamowanie proliferacji komórek przez witaminę D.

Kolejnym mechanizmem regulującym cykl komórkowy na który ma wpływ aktywna postać witaminy D, jest hamowanie sygnałów mitogennych przekazywanych przez czynniki wzrostu takie jak IGF-1, poprzez wzrost ekspresji genów dla białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-BP3 (insulin - like growth factor binding protein 3), i receptora dla nabłonkowego czynnika wzrostu EGF (epithelial growth factor), oraz poprzez pobudzenie szlaków transformującego czynnika wzrostu β (transforming growth factor β , TGF- β). Opisywany wpływ witaminy D na hamowanie aktywności prostaglandyn wiąże się również z zahamowaniem proliferacji komórek, jako że niektóre prostaglandyny działają jako stymulatory wzrostu komórkowego.[15, 19, 20] Innym mechanizmem prowadzącym do zahamowania proliferacji indukowanej przez 17- β estradiol w gruczole piersiowym jest zmniejszenie dostępności receptorów estrogenowych dla wolnych estrogenów przez witaminę D przy udziale wapnia. [79, 80]

Kalcytriol wykazuje również potencjał w hamowaniu aktywności protoonkogenów takich jak c-Myc i c-Fos, których wzmożoną ekspresję opisano w kilku rodzajach nowotworów. Witamina D hamując ekspresję onkogenu c-Myc promuje wzrost ekspresji jego antagonisty, represora transkrypcji MAD1/MXD1. Kalcytriol moduluje również ścieżkę wewnątrzkomórkowych kinaz ERK, MAPK, PI3K i p38. Gen KCNH1, który koduje białka kanału

potasowego bramkowanego napięciem, jest kolejnym onkogenem, którego nadekspresja jest powszechnie obserwowana w tkankach nowotworowych. Badania wykazały hamowanie ekspresji KCNH1 przez kalcytriol zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Innym genem, którego aktywność jest hamowana przez aktywną postać witaminy D jest odwrotna transkryptaza telomerazowa (TERT), przez co zredukowana jest aktywność telomerazy, której aktywność z kolei jest wzmożona w większości komórek nowotworowych i nadaje im fenotyp komórek nieśmiertelnych. Pewne typy mikroRNA są powiązane z obniżeniem aktywności TERT, np. miR-498 pobudzany przez kalcytriol promuje śmierć komórki, obniżając aktywność TERT i wzrost nowotworu.[15, 19]

1.3.1.3 Apoptoza

Wywoływanie efektu antyproliferacyjnego i proapoptotycznego związane jest z hamowaniem sygnałów stymulujących wzrost komórek i zarazem potęgowaniem sygnałów hamujących proliferację komórkową. Interakcja pomiędzy witaminą D a jej receptorem indukuje wzrost ekspresji genów z rodziny białek proapoptotycznych (białka BAX, BAK i BAD) i stymuluje obniżenie ekspresji dla białek antyapoptotycznych (BCL-2/BCL-X_L). Opisano w literaturze również inne, niegenomowe, mechanizmy proapoptotyczne stymulowane kalcytriolem: wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i uwolnienie cytochromu c z mitochondriów w mechanizmie niezależnym od kaspaz.[19, 20, 81]

1.3.1.4 Dojrzewanie komórkowe

Kalcytriol wykazuje potencjał do modyfikacji fenotypu niektórych komórek nowotworowych indukując regulację dojrzewania i różnicowania się komórek. W literaturze opisano wpływ kalcytriolu na:

- Indukcję markerów różnicowania w komórkach raka sutka takich jak białka adhezyjne i kazeina.
- Zwiększanie wydzielania antygenu specyficznego dla prostaty (PSA), morfogenetycznego białka kości 6 (BMP) i E-kadheryny w komórkach nowotworowych prostaty.
- Indukcję dojrzewania komórek linii mieloidalnej w przewlekłej białaczce szpikowej, (co było pierwszym przedklinicznym dowodem na przeciwnowotworowe działanie kalcytriolu).

- Indukcję dojrzewania biomarkerów nabłonkowych jelita grubego w nowotworowych komórkach jelita grubego.
- Dodatkowo kalcytriol wpływa na regulację cząsteczek zaangażowanych w dojrzewanie komórkowe takich jak JNK- kinazę c-Jun N-terminalną, β -kateninę, czynnik jądrowy $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) i PI3K. W ten sam sposób kalcytriol kontroluje aktywność czynników transkrypcyjnych takich jak białko wiążące sekwencję CCAAT/białko (C/EBP) i kompleks białek aktywatorowych 1.[19]

1.3.1.5 Angiogeneza

Angiogeneza to proces, w którym tworzone są nowe naczynia krwionośne, istotne dla rozwoju i ekspansji nowotworów. Aktywna forma witaminy D reguluje procesy angiogenezy na poziomie molekularnym. Witamina D w połączeniu z VDR ma możliwość hamowania transkrypcji czynnika alfa-1 indukującego hipoksję (HIF1A), który promuje ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), jednego z głównych regulatorów angiogenezy. Dodatkowo kalcytriol wpływa hamująco na angiogenezę poprzez zmniejszenie wydzielania IL-8, będącej pod kontrolą NF- $\kappa\beta$, który jak opisano powyżej jest kontrolowany m.in. przez witaminę D. Prostaglandyna E₂ (PGE₂) stymuluje syntezę HIF1A w komórkach nowotworowych, a jak opisano powyżej kalcytriol hamuje kaskadę produkcji prostaglandyn, obniżając tym samym ich potencjał naczyniotwórczy.[19]

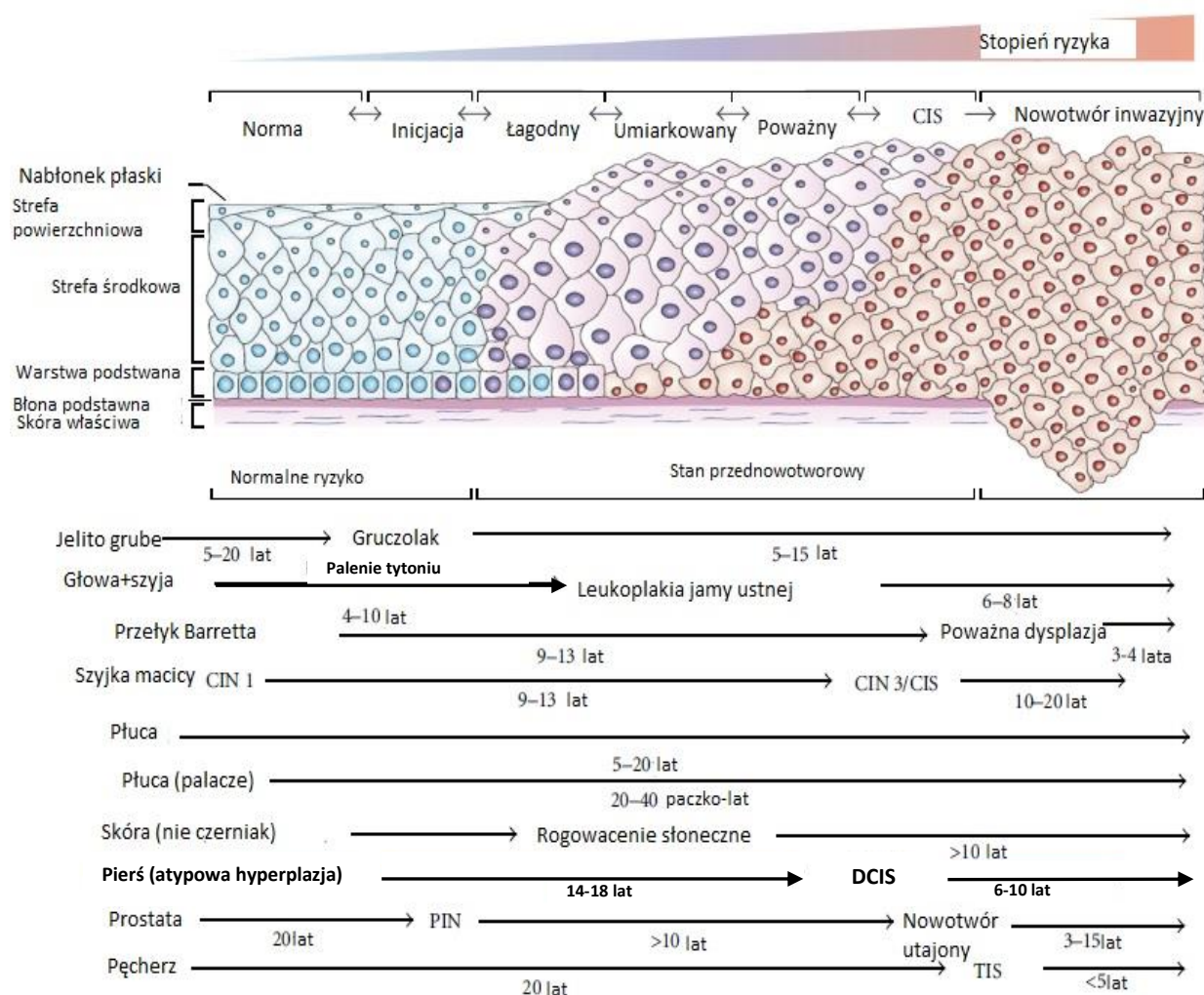
1.3.1.6 Inwazyjność i tworzenie przerzutów nowotworowych

Kalcytriol może regulować ekspresję cząsteczek o kluczowej roli w procesie tworzenia przerzutów i inwazyjności komórek nowotworowych. Wykazuje on potencjał do wzmacniania ekspresji genu E-kadheryny, która hamuje rozwój nowotworów i jest negatywnie skorelowana z potencjałem do tworzenia przerzutów przez nowotwór.[82, 83, 84] Hamuje również ekspresję cząsteczek zaangażowanych w proces przerzutowania: tenascyny C, β 4 integryny i α 6 integryny.[85, 86]

Uważa się, że lokalna migracja komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, oraz następnie wniknięcie do układu krążenia zależy od zdolności przejścia komórek z fenotypu epithelialnego do mezenchymalnego (epithelial-mesenchymal transition, EMT) będącego pod kontrolą głównie czynników transkrypcyjnych Twist, Snail i ZEB.[87] Wykazano, że kalcytriol hamuje również aktywację genu Twist przez co zmniejszana jest zdolność komórek do EMT.[19]

1.4 RAK SUTKA

Nowotworzenie jest procesem długotrwałym, wielostopniowym, wielokierunkowym, wielowarstwowym z postępującymi zmianami genetycznymi oraz powiązany jest z niszczeniem tkanek. U jego podstawy leży akumulacja czynników genetycznych prowadzących do pojawienia się dysplazji komórek ze zmianami genotypowymi i fenotypowymi. Utrata kontroli nad podziałami komórkowymi związana jest z mutacjami genów kodujących białka uczestniczący w cyklu komórkowym, co prowadzi do zaburzeń w regulacji wzrostu komórkowego i procesu programowanej śmierci komórkowej, i w konsekwencji powoduje raka (Rycina 10). Proces ten przebiega podobnie we wszystkich rakach nabłonkowych, a zdolność do zatrzymania jednego lub kilku z tych etapów może opóźnić rozwój raka.[88]



Rycina 10. Schemat procesu karcenogenezy u ludzi. Opracowano w oparciu o „Breast cancer chemoprevention: old and new approaches.” Cazzaniga M., J Biomed Biotechnol 2012 [88]

1.4.1 Epidemiologia i etiologia

Rak sutka jest jednym z największych problemów zdrowia publicznego, będąc jednym z najczęstszych nowotworów u kobiet na świecie. Globalnie diagnozowanych jest ponad jeden milion przypadków rocznie, przeciętnie co trzy minuty jedna kobieta dowiaduje się o nowo wykrytym nowotworze sutka.[79] Na raka sutka zachoruje 1 na 8 kobiet w krajach wysokorozwiniętych.[89] Również w Polsce rak sutka jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. W 2015 roku stanowił 22,2% ogółu zachorowań na nowotwory, w 2016 roku 22,8%, natomiast wg ostatnich dostępnych danych z 2017 roku 22,5%. Pod względem umieralności z przyczyn onkologicznych u kobiet, rak sutka plasuje się na drugiej pozycji. W 2015 roku w populacji polskiej nowotwór sutka był przyczyną 14,1% zgonów spowodowanych chorobą nowotworową, w 2016 było to już 14,5% natomiast w roku 2017 odsetek ten wyniósł 14,8%. [90, 91, 92, 93, 94] W Polsce wśród młodych kobiet (20-44 lat) nowotwory sutka stanowią 27% zachorowań i 26% zgonów z przyczyn nowotworowych. W populacji kobiet w średnim wieku (45-64 lat) nowotwór piersi stanowi 28% zachorowań i 17 % zgonów, a dla kobiet po 65 roku życia nowotwór sutka stanowi 18% zachorowań i 12% zgonów z przyczyn onkologicznych.[91] W świecie proporcje te różnią się znacząco w zależności od rasy, szerokości geograficznej miejsca zamieszkania i statusu socjoekonomicznego.[95]

1.4.2. Czynniki ryzyka raka sutka

Czynniki ryzyka raka sutka można podzielić na niemodyfikowalne i modyfikowalne.

Do niemodyfikowalnych należą:

- najważniejszy czynnik ryzyka jakim jest wiek, a w dalszej kolejności:
- płeć,
- rasa,
- wczesna pierwsza miesiączka (przed ukończeniem 11 roku życia),
- menopauza w późnym wieku (po 54 roku życia) [79, 89, 94]
- niektóre łagodne choroby rozrostowe sutka,
- rodzinne występowanie raka sutka, zwłaszcza w młodszym wieku (poniżej 50 roku życia), nosicielstwo mutacji niektórych genów (przede wszystkim BRCA1 i BRCA2), w tym mutacje w genach supresorowych i onkogenach, zmiany epigenetyczne.[95]

Modyfikowalnymi czynnikami ryzyka raka sutka są:

- późny wiek pierwszego porodu zakończonego urodzeniem żywego dziecka (po 35 roku życia),
- nierództwo (ponieważ właściwe i kompletne różnicowanie się komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego jako rezultat donoszonej ciąży jest czynnikiem odpowiedzialnym za redukcję ryzyka raka sutka w przyszłości),
- niski stopień aktywności fizycznej,
- przebyte aborcje,
- długotrwała hormonalna terapia zastępcza (HTZ) (co najmniej 10 lat),
- ekspozycja na działanie promieniowania jonizującego, [79, 89, 94]
- wysoka wartość wskaźnika masy ciała (BMI).

Wyniki badań Owiredu i wsp. wykazują, że dyslipidemia i podwyższone BMI są powiązane z zwiększonym ryzykiem raka sutka.[96] Również duża ilość tkanki tłuszczowej przy prawidłowym BMI (wysoki wzrost) jest czynnikiem podwyższonego ryzyka inwazyjnego raka sutka.[97] Gromadzenie tkanki tłuszczowej wpływa na wzmożoną konwersję androstendionu w estron.[98] Poza tym, gromadzenie tkanki tłuszczowej może prowadzić do zespołu metabolicznego, którego patogenezą związana jest z insulinoopornością. W przebiegu zespołu metabolicznego dochodzi do zwiększonej produkcji insuliny oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu – 1 (IGF-1), które ostatecznie promują proliferację komórek i jednocześnie hamują ich zaprogramowaną śmierć, co sprzyja nowotworzeniu. [99, 100]

- dieta uboga we włókniak pokarmowy.

Istnieje kilka mechanizmów wyjaśniających ujemną korelację pomiędzy ilością spożywanego włókniaka, a ryzykiem raka sutka. Włókniak pokarmowy promuje wzrost bakterii probiotycznych i hamuje wzrost bakterii patogennych, przez co ogranicza produkcję substancji karcynogennych. Włókniak pokarmowy adsorbuje, a przez to ogranicza wchłanianie z jelit związków organicznych mogących działać pronowotworowo, jak również wolnych estrogenów produkowanych przy udziale jelitowych enzymów bakteryjnych. Włókniak wzmacnia również fagocytozę, blokuje syntezę nitrozoamin i redukuje poziom estrogenów. Włókniak pokarmowy może promować produkcję krótko - łańcuchowych kwasów tłuszczowych (short-chain fatty acids, SCFA) przez bakterie fermentujące w obrębie jelita grubego. Badania wykazały, że SCFA działają przeciwnowotworowo poprzez hamowanie antyapoptotycznego genu bcl-2 i nasilanie

ekspresji proapoptotycznego genu *bax*, co zapobiega rozwojowi komórek nowotworowych. Metaanaliza przeprowadzona przez Chen'a i wsp wykazała, że dieta bogata we włókniak pokarmowy ma działanie protekcyjne i może redukować ryzyko raka sutka o 12%.[101] Z kolei na podstawie metaanalizy wykonanej przez Suzuki i wsp. oszacowano, że kobiety spożywające duże ilości błonnika, pochodzącego z owoców mają niższe ryzyko raka sutka o 34%.[99]

- nadużywanie alkoholu.

Dane epidemiologiczne wskazują, że konsumpcja alkoholu wpływa na wzrost ryzyka raka sutka. Ryzyko raka sutka jest wprost proporcjonalne do ilości spożywanego alkoholu powyżej limitu oszacowanego jako ilość stanowiąca małe ryzyko (60 g/dobę). Relatywne ryzyko rozwoju raka sutka wzrasta o 7,1% na każde dodatkowe 10 g alkoholu przyjmowanego na dobę.[102] U kobiet w okresie przedmenopauzalnym, nawet umiarkowane spożycie alkoholu może wydłużać cykle menstruacyjne, przez co wydłuża się ekspozycja tkanki gruczołowej sutka na endogenne estrogeny. Również metabolizowanie alkoholu może prowadzić do powstania reaktywnych form tlenu, które są znanymi czynnikami indukującymi modyfikację DNA, prowadzącymi do powstawania aberracji chromosomalnych i punktowych mutacji. Alkohol może także hamować absorbcję folianów i przez to utrudniać naprawy DNA.[98] W prospektywnym badaniu Deschasaux i wsp., w którym oceniano zależność pomiędzy 25(OH)D₃, a konsumpcją alkoholu na ryzyko raka sutka, stwierdzono, że optymalny poziom witaminy D był powiązany z obniżonym ryzykiem raka sutka, także u kobiet spożywających alkohol w ilości nie przekraczającej średniej wartości spożycia dla kobiet tj. 7,1 g/dobę. Zapewnienie odpowiedniego stężenia witaminy D, może w pewnym stopniu chronić przed niekorzystnym wpływem alkoholu na rozwój nowotworów sutka.[103]

- spożycie tłuszczu.

Dane epidemiologiczne dostarczają sprzecznych rezultatów odnośnie związku pomiędzy spożywanymi tłuszczami pokarmowymi a ryzykiem raka sutka. Dieta bogata w wielonienasycone kwasy tłuszczowe w modelach zwierzęcych wiązała się z wzrostem zapadalności na nowotwory gruczołu piersiowego. Proponowanych jest kilka mechanizmów wyjaśniających ten związek. Kwas arachidowy będący metabolitem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, aktywuje aromatazę cytochromu P450 - kluczowego enzymu dla syntezy estrogenów. Ponadto wielonienasycone kwasy tłuszczowe mogą redukować wiązanie estrogenów przez białka wiążące, zarówno przez

białko wiążące hormony płciowe (SHGB) jak i przez albuminę, przez co dodatkowo wzrasta poziom krążących estrogenów, które mogą aktywować wzrost komórek nowotworowych sutka. Wykazano też, że kwasy eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA) hamują produkcję eikozanoidów pochodzących z kwasu arachidonowego w obrębie tkanki nowotworowej. Peroksydacja lipidów tłuszczowych może indukować apoptozę. Wielonienasycone (n-3) kwasy tłuszczowe mogą wiązać i aktywować receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów, prowadząc do aktywacji cząsteczki powierzchniowej proteoglikanu syndekanu-1 w ludzkich komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego, promując tym samym apoptozę i doprowadzając do zahamowania wzrostu komórki. Z kolei z kwasu linolowego może tworzyć się kwas 13-hydroksylinolowy (13-HODE), który wzmacnia sygnały stymulujące syntezę białkowych czynników wzrostowych takich jak nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF) i insulina, które z kolei promują wzrost komórek nowotworowych.[98]

1.4.3 Ocena ryzyka raka sutka

Do określenia ryzyka raka sutka dla kobiet w wieku powyżej 35 lat używa się zmodyfikowanego modelu GAIL, w którym bierze się pod uwagę czynniki takie jak:

- aktualny wiek,
- wiek pierwszej miesiączki,
- wiek pierwszego żywo urodzonego dziecka lub nierództwo,
- liczba członków rodziny z I linii z rakiem sutka,
- liczba wcześniej przebytych biopsji piersi,
- atypowa hyperplazja w poprzednich biopsjach piersi,
- rasa.[104]

1.4.4 Profilaktyka raka sutka

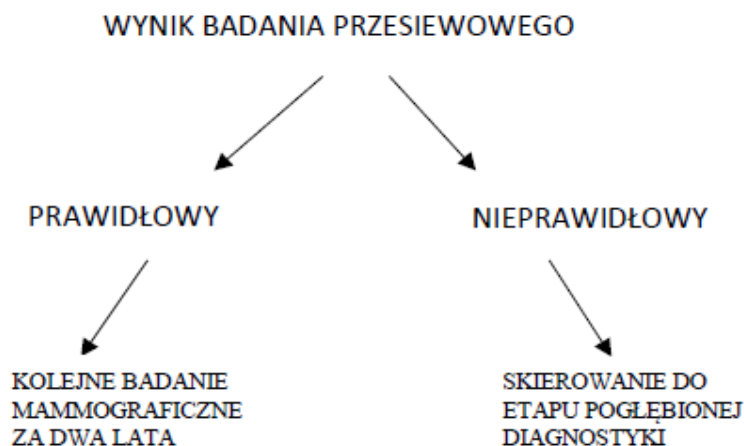
Profilaktykę raka sutka dzieli się na pierwotną mającą na celu zapobieganie zachorowaniu poprzez zdrowy styl życia oraz wtórną opartą na populacyjnych badaniach przesiewowych. Profilaktyka pierwotna wiąże się z promowaniem zdrowego stylu życia w tym utrzymaniu właściwej masy ciała poprzez stosowanie zrównoważonej diety i aktywności fizycznej. Profilaktyka wtórna obejmuje samobadanie piersi oraz wykonywanie badań przesiewowych.

Populacyjnym programem wczesnego wykrywania raka sutka w Polsce objęte są kobiety w wieku od 50 do 69 lat, w interwale raz na 2 lata. Z programu wykluczone są kobiety, u których wcześniej zdiagnozowano zmiany nowotworowe o charakterze złośliwym w piersi. Powyższe zakresy wiekowe, obejmujące badania kobiety z grupy najwyższego ryzyka zachorowania, zostały opracowane zgodnie z wytycznymi zawartymi w Rekomendacji Rady Unii Europejskiej z dnia 2 grudnia 2003 r. w sprawie badań przesiewowych [Council Recommendation of 2 December 2003 on cancer screening (2003/878/EC)].

W Polsce przesiewowe badania profilaktyczne wykonuje się w dwóch etapach:

Etap podstawowy, składający się z:

- przeprowadzenia wywiadu i wypełnienia ankiety,
- badania mammograficznego z opisem,
- rejestracji w ogólnopolskim programie internetowym SIMP,
- decyzji dotyczącej dalszego postępowania w zależności od wyniku badania przesiewowego



Rycina 11. Schemat działań profilaktycznych w przypadku raka gruczołu piersiowego.

Drugi etap:

W przypadku stwierdzenia w badaniu mammograficznym zmian podejrzanych o nowotwór dalsza diagnostyka powinna się odbywać w ośrodkach wyspecjalizowanych w diagnostyce raka sutka przy ścisłej współpracy radiologa, chirurga, onkologa i patomorfologa. Zakres dalszych badań diagnostycznych powinien odpowiadać stopniowi ryzyka rozpoznania raka sutka. Kobiety z rodzin wysokiego ryzyka wystąpienia raka sutka oraz nosicielki mutacji związanych z rakiem sutka powinny być objęte zindywidualizowanym programem opieki.[105]

1.4.5 Diagnostyka genetyczna w profilaktyce raka sutka

Badanie nosicielstwa mutacji genu BRCA1 i BRCA2 powinno być realizowane przez poradnie genetyczne, a wykonanie badania należy poprzedzić analizą wywiadu rodzinnego krewnych I-III stopnia oraz informacją na temat ograniczeń testów. W Polsce wykonuje się badanie tylko w kierunku kilku najczęstszych mutacji w genie BRCA1, a często pomija się badanie mutacji genu BRCA2 z uwagi na niską częstość ich występowania w polskiej populacji.[106]

1.4.6 Leczenie raka sutka

Postępowanie terapeutyczne w przypadku raka przedinwazyjnego przewodowego stanowiącego najczęściej rozpoznawany typ raka sutka (70-80% przypadków) i inwazyjnego raka sutka o wczesnym zaawansowaniu, polega na leczeniu chirurgicznym, często skojarzonym z radioterapią (RTH) i/lub leczeniem systemowym.[106, 107] W przypadkach wysokiego zaawansowania miejscowo - regionalnego opisane leczenie poprzedzone jest leczeniem systemowym tj. (chemioterapią i/lub hormonoterapią, a u chorych z dodatnią cechą HER2 skojarzone z leczeniem przeciwciałem monoklonalnym - transtuzumabem), w chorobie uogólnionej zastosowanie ma przede wszystkim leczenie systemowe.[106]

Aktualnie w Europie zachodniej 60-80% nowo diagnozowanych przypadków raka sutka leczonych jest chirurgicznie metodą oszczędzającą pierś. Leczenie takie należy zaproponować każdej pacjentce, o ile nie ma jest przeciwwskazań do zastosowania tego typu terapii. Amputację piersi wykonuje się u chorych na raka sutka w stopniu zaawansowania I, IIA, IIB, które ze względu na przeciwwskazania medyczne nie kwalifikują się do zabiegu oszczędzającego, bądź nie wyrażają zgody na taki zabieg. Pooperacyjna radioterapia stanowi ważny element leczenia chorych po zabiegu oszczędzającym, ponieważ znacząco redukuje nawrót choroby w okresie 10 lat oraz zmniejsza ryzyko śmierci związanej z zachorowaniem na raka sutka w okresie 15 lat.[108]

Decyzja o włączeniu uzupełniającego leczenia systemowego po zabiegu operacyjnym powinna opierać na oszacowaniu prawdopodobieństwa odpowiedzi na zastosowany typ terapii, korzyści z jej zastosowania oraz indywidualnie szacowanego ryzyka nawrotu. Ostateczna decyzja powinna również obejmować przewidywane skutki uboczne zastosowanej terapii, wiek biologiczny pacjentki, ogólny stan zdrowia, choroby współistniejące i osobiste preferencje. Leczenie powinno zostać wdrożone w 2-6 tygodni po zabiegu operacyjnym. Efektywność leczenia uzupełniającego znacząco spada, gdy jego wprowadzenie jest opóźnione więcej niż 12 tygodni od zabiegu chirurgicznego. Hormonoterapia wskazana jest u wszystkich pacjentek z dodatnią

ekspresją receptorów estrogenowych (ER) (definiowanych jako >1% inwazyjnych komórek raka), niezależnie od zastosowanej chemioterapii i/lub celowanej terapii. Wybór konkretnego leku zależy od statusu menopauzalnego chorej. U chorych przed menopauzą stosuje się najczęściej tamoksifen, a po menopauzie tamoksifen lub inhibitory aromatazy.

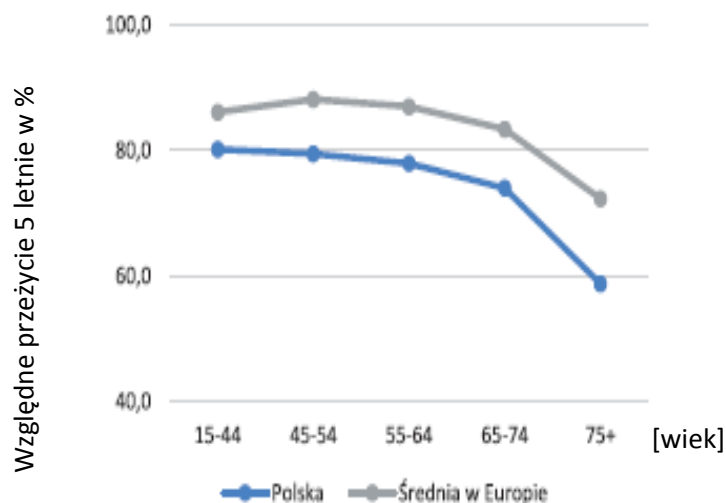
Do pooperacyjnej chemioterapii kwalifikowane są niemalże wszystkie chore na raka „potrójnie ujemnego”, chore z cechą HER2+ oraz chore z guzami luminalnymi HER-2 negatywnymi o wysokim ryzyku nawrotu. Chemioterapia jest zazwyczaj podawana przez 12-24 tygodni (cztery do ośmiu cykli) w zależności od indywidualnego ryzyka nawrotu choroby i określonego zestawu reguł dopasowanych do danego chorego. Zastosowanie trastuzumabu, humanizowanego przeciwciała monoklonalnego IgG1, hamującego proliferację komórek, które wykazują nadekspresję receptora HER2 oraz preferencyjnie pobudzającego cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (*antibody-dependent cellular cytotoxicity* – ADCC) wobec komórek nowotworu wykazujących nadekspresję receptora HER2, w połączeniu z chemioterapią u pacjentów z cechą HER2+ o około połowę redukuje ryzyko nawrotu w porównaniu do zastosowania samej chemioterapii. Użycie trastuzumabu jest zatwierdzone dla pacjentów z zajęтыми węzłami chłonnymi lub u pacjentów bez zajęcia węzłów chłonnych gdy wielkość guza przekracza 1cm. W większości przypadków trastuzumab jest podawany przez okres 1 roku, chociaż w badaniu FinHer wykazano, że stosowanie tego leku przez okres 9 miesięcy dawało porównywalne efekty terapeutyczne.[108]

1.4.7 Ryzyko wznowy

W związku z wydłużającym się czasem przeżycia kobiet, które były leczone z powodu raka sutka, rośnie ryzyko wznowy nowotworu. W praktyce klinicznej ryzyko wznowy określa się przy użyciu klasyfikacji anatomicznej guza TNM w połączeniu z wybranymi czynnikami klinicznymi. Wznowa może mieć postać izolowanego nawrotu raka po tej samej stronie co nowotwór pierwotny (Isolated ipsilateral breast tumor recurrence, IBTR) lub raka drugiej piersi (Contralateral breast cancer, CBC) [109]. Czas od zakończenia leczenia nowotworu pierwotnego po którym rozwija się nawrót choroby zależy od wielu czynników między innymi: biologii guza, jego podtypu molekularnego, stopnia zaawansowania w trakcie diagnozy, zastosowanego leczenia. Jednocześnie określono, że 10 – letni współczynnik wznowy po leczeniu zachowawczym wynosi około 10 - 20% u pacjentów z wczesnym stadium inwazyjnego raka sutka.[110] Dwoma najważniejszymi czynnikami wznowy po leczeniu zachowawczym piersi są odstępianie od miejscowej radioterapii oraz niecałkowite usunięcie zmiany nowotworowej (tzw. dodatnie

marginesy). Dodatkowe czynniki ryzyka obejmują młodszy wiek pacjentki, duży rozmiar guza, wysoki stopień złośliwości i brak receptorów hormonalnych. W metaanalizie 17 badań z randomizacją, w których wzięło udział 10 801 kobiet, odnotowano 10 – letnie ryzyko wznowy wynoszące 25% u tych pacjentek, które nie otrzymały radioterapii i 8% u tych, które otrzymały radioterapię. Z kolei wyniki z 20 - letniej obserwacji badania NSABP-B 06 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) wykazały, że tylko u 10% kobiet, które przeszły mastektomię, wystąpiła wznowa, w porównaniu z 39% po częściowej mastektomii i 14 % po częściowej mastektomii z radioterapią pooperacyjną ($p < 0,0001$)[111]. Wznowy odnotowano później po leczeniu zachowawczym niż po mastektomii (mediana 3 - 4 lata vs. 2 – 3 lata). Spok i wsp. przeprowadzili analizę piśmiennictwa z lat 2000 do 2015 dotyczącą częstości występowania wznowy u pacjentek leczonych z powodu raka sutka. Ich częstość rosła wraz z długością obserwacji, nawet do ponad 15 latach od diagnozy. Mediana rocznej zapadalności na izolowany IBTR wynosi 0,6% (zakres 0,4 – 1,1%), w przypadku CBC mediana rocznego wskaźnika zapadalności wyniosła 0,5% (zakres 0,2 – 0,7%).[109]

Wskaźniki względnej szansy przeżycia (obrazujące odsetek osób w danym wieku chorujących na raka, które przeżywają określony okres, w stosunku do liczby osób w danym wieku nie chorujących na raka, przeżywających ten sam okres) dają Polkom istotnie niższe szanse na przeżycie pierwszych pięciu lat po zdiagnozowaniu choroby w porównaniu do większości Europejki. 1-roczne wskaźniki przeżyć wśród Polek, u których zdiagnozowano nowotwory piersi w latach 2000-2002 wynosiły 92,8%, natomiast w latach 2003-2005 93,2% kobiet. Przeżycia 5-letnie wśród pacjentek z nowotworami piersi w ciągu pierwszej dekady XXI wzrosły nieznacznie: z 75,0% w latach 2000-2002 do 77,2% w latach 2003-2005.[112] Dane statystyczne z lat 2000-2007 pokazują, że szanse przeżycia kobiet chorych na raka sutka w Polsce rok po zdiagnozowaniu były o ponad 4 punkty procentowe niższe od średniej europejskiej. Z kolei przy pięcioletnim przeżyciu od diagnozy różnica ta wynosi około 10 punktów procentowych w porównaniu do średnich dla Europejki (Rycina 12).



Rycina 12. Względne przeżycia pięcioletnie po zdiagnozowaniu raka sutka w Polsce, a średnia w Europie w grupach wiekowych kobiet chorych na raka sutka (%). Opracowano w oparciu o EUROCARE-5 (online database- lata 2000-2007)

1.4.8 Opieka medyczna nad pacjentkami po leczeniu raka sutka

Druga Rezolucja Parlamentu Europejskiego na temat raka sutka z października 2006 wzywa do zapewnienia każdej kobiecie w UE, bez względu na miejsce zamieszkania, status społeczny, zawód lub wykształcenie, dostępu do wysokiej jakości badań przesiewowych, leczenia i opieki po leczeniu raka sutka. W Polsce opiekę nad pacjentkami leczonymi z powodu raka sutka regulują: Obwieszczenie Ministra Zdrowia w sprawie zaleceń postępowania dotyczących diagnostyki i leczenia raka oraz Wytyczne Postępowania Diagnostyczno-Terapeutycznego w Raku Piersi wydane przez Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (PTOK). [106, 113]

Pacjentki, które chorowały na raka sutka pozostają pod stałą opieką lekarza onkologa w celu:

- wczesnego wykrycia lokalnego nawrotu choroby nowotworowej lub pojawienia się wznowy w drugiej piersi,
- oceny i leczenia skutków ubocznych zastosowanej terapii (takich jak objawy menopauzy, osteoporoza, inne nowotwory),
- motywowania pacjentek do kontynuacji leczenia hormonalnego,
- zapewnienia wsparcia psychologicznego, w celu powrotu do normalnego i zdrowego stylu życia.[108]

Według zaleceń PTOK opieka nad pacjentkami, które przeszły radykalne leczenie z powodu raka sutka opiera się na co miesięcznym samobadaniu piersi, badaniach przedmiotowych co 3 miesiące przez pierwsze dwa lata, (2-5 lat co 6 miesięcy, >5 lat co 12 miesięcy), a w przypadku raków przedinwazyjnych badania kontrolne co 6 miesięcy przez pierwsze dwa lata, następnie co 12 miesięcy. Mammografię należy wykonywać co 12 miesięcy, w razie potrzeby uzupełnioną o USG lub MR piersi. U chorych leczonych z zachowaniem piersi pierwsze badanie mammograficzne należy przeprowadzić po 6 miesiącach od zakończenia leczenia.

Pacjentki powinny pozostać pod opieką ginekologa, w przypadku kobiet z zachowaną macicą, leczonych tamoksyfenem badanie ginekologiczne powinno być wykonane co 12 miesięcy. Nie zaleca się wykonywania rozszerzonego zakresu badań obrazowych lub laboratoryjnych w celu aktywnego poszukiwania bezobjawowych przerzutów odległych. Wykonanie tych badań uzasadnione jest natomiast w przypadku klinicznych cech sugerujących nawrót nowotworu. Rekomendacje PTOK zalecają ocenę stanu mineralizacji kości w postaci badania densytometrycznego jedynie pacjentkom z wysokim ryzykiem osteoporozy związanej z leczeniem inhibitorami aromatazy lub z zahamowaniem czynności hormonalnej jajników. Ponadto rekomenduje się ocenę stanu odżywienia i ewentualnie podjęcie działań, aby BMI pozostawało w przedziale 20-25.[106]

1.4.9 Oznaczanie stężenia witaminy D i suplementacja witaminą D₃ u chorych na raka sutka

Postęp we wczesnej diagnostyce i terapii chorych na raka sutka znacząco wydłużył czas przeżycia oraz wpłynął na poprawę rokowania klinicznego, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych.[114] W ostatnich latach dużą uwagę zwraca się na utrzymanie właściwego stężenia witaminy D w zdrowej populacji jak i szczególnie u osób po leczeniu nowotworów. Pomimo licznych doniesień na temat zależności pomiędzy surowiczym stężeniem witaminy D, a ryzykiem raka sutka, jego zaawansowaniem i odległym rokowaniem nie ma jednolitych wytycznych jakie dawki witaminy D i jakie docelowe stężenia w surowicy należy uznać za właściwe zarówno u osób zdrowych jak i u pacjentów onkologicznych. Opracowane w Polsce, nowelizowane w 2018 zasady suplementacji i leczenia witaminą D dla osób zdrowych i dla grup ryzyka niedoborów zalecają, aby dorośli przyjmowali witaminę D w dawce 800-2000 IU/dobę zależnie od masy ciała i podaży witaminy D w diecie od września do kwietnia. W grupach ryzyka deficytów witaminy D do której należą osoby chorujące na nowotwory suplementacja powinna być prowadzona pod kontrolą laboratoryjnych oznaczeń 25(OH)D, tak aby utrzymać stężenie optymalne w granicach > 30–50 ng/ml.[115] Wg polskich Standardów leczenia żywieniowego w

onkologii z 2015 roku wskazaniem do suplementacji związków aktywnych, w tym witaminy D, jest udokumentowany niedobór składnika we krwi lub typowe kliniczne cechy niedoboru wapnia i witaminy D.[116] Brak jest też jednolitych kryteriów laboratoryjnych dla stwierdzenia niedoboru witaminy D, w oparciu o jej stężenie we krwi. Z rekomendacji amerykańskiej Narodowej Akademii Medycyny (dawniej Instytut Medycyny (IOM)) wynika, że u osób dorosłych należy suplementować witaminę D w dobowej dawce 800 IU, tak by utrzymać surowicze stężenie 25(OH)D powyżej 20 ng/ml (50 nmol/l).[117, 118] Amerykańskie Stowarzyszenie Endokrynologii Klinicznej (AACE) i Towarzystwo Endokrynologiczne rekomendują surowiczy poziom 25(OH)D \geq 30 ng/ml (75 nmol/l) jako wystarczający.[117, 119] Wytyczne Niemieckiego Towarzystwa Żywnościowego z 2016 roku podają, że pożądanym stężeniem witaminy D w surowicy jest wartość >20 ng/ml (>50 nmol/l) lub wyższa.[120]

Z wytycznych American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology (Amerykańskiego Towarzystwa Nowotworowego/ Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej) wynika, że aby zmniejszyć śmiertelność powiązaną z utraty masy kostnej u pacjentek z rakiem sutka należy stosować suplementację wapnia (1200 mg/dobę) i witaminy D (600-1000 IU/dobę) począwszy od 50 roku życia.[121] Z kolei według wytycznych grupy ESMO (Europejskiego Towarzystwa Onkologii Medycznej) dobowy podaż wapnia u chorych na raka sutka powinna wynosić 1000 mg wraz z suplementacją witaminą D w ilości 1000-2000 IU/dobę.[122] Liczne badania wskazują, że utrzymanie optymalnego stężenia witaminy D ze względu na omówione powyżej działanie hamujące rozwój nowotworów ma istotny wpływ na zmniejszenie ryzyka rozwoju raka sutka.[14, 74, 76, 123, 124] Utrzymanie stężenia witaminy D w zakresie wartości referencyjnych u kobiet z rakiem sutka w czasie leczenia korzystnie wpływa na rokowanie, natomiast po okresie leczenia przeciwnowotworowego koreluje z mniejszą statystycznie liczbą nawrotów choroby.[125, 126, 127, 128, 129, 130] Istnieją również doniesienia o zmniejszonej śmiertelności pacjentek z powodu raka sutka, jeśli wyniki stężenia witaminy D nie wskazywały na niedobór tej witaminy w czasie stawiania diagnozy.[128, 131, 132]

2. CEL PRACY

Rak sutka jest najpowszechniej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet w Polsce. W przypadkach wczesnego rozpoznania raka sutka około 30–40 procent pacjentek może mieć nawrót choroby, a w przypadku raka miejscowo zaawansowanego – nawet 90 procent chorych może mieć wznowę. Prowadzono wiele badań w celu ustalenia czynników, które zmniejszałyby ryzyko zachorowań, bądź poprawiłyby rokowania u osób już chorujących na ten typ nowotworu. Liczne z nich wskazują na pozytywne znaczenie witaminy D. Ma ona działanie przeciwnowotworowe poprzez wpływ na proliferację, dojrzewanie, apoptozę oraz na wydzielanie czynników wzrostowych w komórkach gruczołu piersiowego. Opisano również, że niedobór witaminy D koreluje się z zachorowaniami na nowotwory w tym raka sutka, prostaty i jelita grubego. Surowicze stężenie 25(OH)D uznaje się za czynnik prognostyczny dla czasu przeżycia wolnego od choroby u pacjentek z rakiem sutka, a suboptymalny poziom witaminy D u kobiet ze zdiagnozowanym rakiem sutka koreluje z krótszym całkowitym czasem przeżycia i skróconym czasem wolnym od wznowy nowotworowej.

Zespół Ekspertów z udziałem konsultantów krajowych i prezesów towarzystw naukowych opracowujący zasady suplementacji i leczenia witaminą D, rekomenduje profilaktykę i leczenie niedoborów witaminy D w codziennej praktyce lekarzy i dietetyków klinicznych. Niestety z uwagi na brak jednolitych wytycznych dla pacjentów onkologicznych, w tym określenia której specjalności lekarz jest odpowiedzialny za wdrożenie i monitorowanie suplementacji witaminą D pacjentek po leczonym raku sutka, kwestia ta jest nadal marginalizowana. Zwykle system opieki onkologicznej, jak również opieka lekarza rodzinnego w większości przypadków nie zapewnia odpowiedniego wsparcia i wskazówek dotyczących korzystnego dla pacjentek po leczeniu raka sutka stylu życia, w tym diety i suplementacji witaminami.

Dlatego celem pracy doktorskiej była :

1. Ocena stężenia witaminy D w surowicy kobiet po leczonym raku sutka w zależności od pory roku.
2. Ocena wpływu pór roku, nawyków żywieniowych i społecznych, suplementacji witaminą D₃, oraz rekomendacji lekarzy prowadzących na aktualne stężenia witaminy D w surowicy u kobiet po leczonym raku sutka.
3. Wpływ oznaczeń stężenia witaminy D na poprawę statusu witaminy D w kolejnych badaniach oraz na zmianę zachowań mających na celu uzyskanie i utrzymanie zalecanego surowiczego stężenia witaminy D.

Cel 1 zrealizowano poprzez:

- Pomiar surowiczego stężenia witaminy D w grupie kobiet po leczonym raku sutka (mastektomia). Badanie wykonywano dwukrotnie – latem i zimą.

Cel 2 zrealizowano poprzez analizę danych z badania ankietowego, w tym:

- Analizę nawyków żywieniowych jak i społecznych (opalanie i aktywność na świeżym powietrzu) oraz suplementacji na stężenie witaminy D u kobiet po leczonym raku sutka.
- Analizę odsetka pacjentek suplementujących witaminę D₃ w grupie kobiet po leczeniu z powodu raka sutka.
- Ocenę znajomości rekomendacji dotyczących stężeń i suplementacji witaminą D₃ w populacji kobiet leczonych w przeszłości z powodu raka sutka.
- Wiedzy pacjentek po leczeniu onkologicznym z powodu raka gruczołu piersiowego na temat naturalnych źródeł pozyskiwania witaminy D.

Cel 3 zrealizowano poprzez :

- Zebranie informacji nt. monitorowania stężenia witaminy D u pacjentek leczonych z powodu raka gruczołu piersiowego i wpływu wyniku tego badania laboratoryjnego na dalsze leczenie.
- Analizę wpływu oznaczania stężenia witaminy D u pacjentek z rakiem sutka na modyfikację stylu życia, w tym wzbogacanie diety w produkty bogate w witaminę D, suplementację witaminy D₃ i ekspozycję na promieniowanie słoneczne.

3. MATERIAŁ I METODY

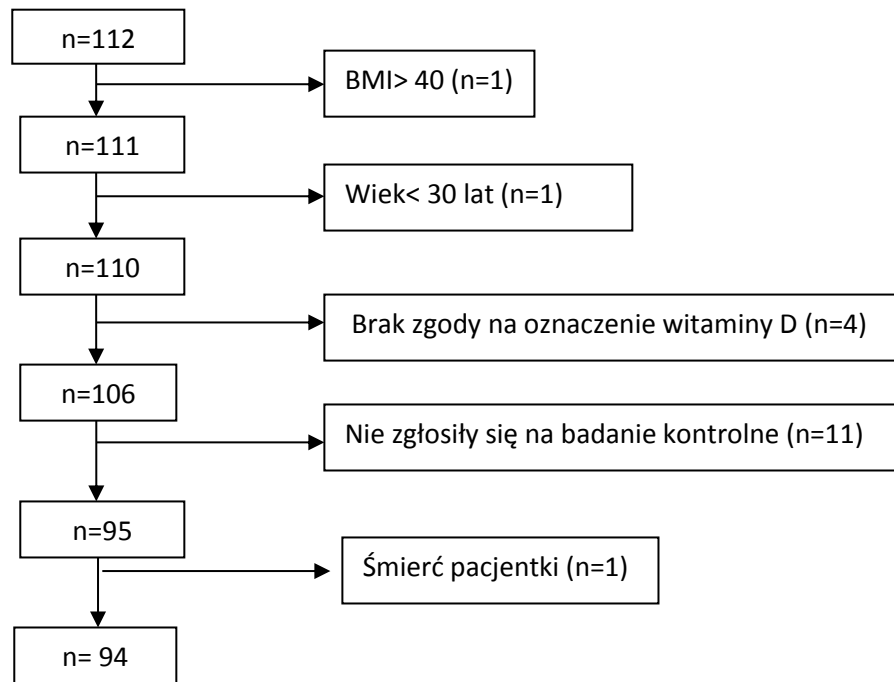
Projekt badania uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr 122.6120.18.2017 z dnia 20 stycznia 2017 roku (załącznik 1). Pacjenci przed włączeniem do badania wyrażali świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

3.1. PACJENCI

3.1.1. Badane grupy

Do grupy badanej rekrutowano pacjentki po radykalnym leczeniu raka sutka (mastektomia). W celu rekrutacji pacjentek nawiązano współpracę z lokalnymi kołami Amazonek: nowosądeckim (Nowosądeckie Stowarzyszenie Amazonek im. Heleny Włodarczyk, Al. Wolności 49, 33-3000 Nowy Sącz), brzeskim (Brzeskie Stowarzyszenie Kobiet z Problemami Onkologicznymi Amazonka, ul. Uczestników Ruchu Oporu 2, 32-800 Brzesko) oraz gorlickim (Stowarzyszenie Klub Gorlickich Amazonek, ul. Władysława Jagiełły 10, 38-300 Gorlice).

Wstępnie do grupy badanej zakwalifikowano 112 kobiet z terenu Małopolski po leczeniu onkologicznym raka sutka. Ostatecznie do analizy statystycznej włączono 94 kobiety w wieku od 30 do 86 lat. Z badania wykluczono pacjentki, które nie zgodziły się na oznaczenie witaminy D (n=4), miały skrajną otyłość lub niedowagę - BMI poniżej 18,5 lub powyżej 40 (n=1), które nie zgłosiły się na badanie kontrolne (n=12, w tym jedna pacjentka zmarła przed przeprowadzeniem powtórnych badań) (Rycina 13).



Rycina 13. Kryteria włączenia pacjentów do grupy badanej.

Grupy wydzielono w zależności od pory roku w której pacjentki włączono do badania na:

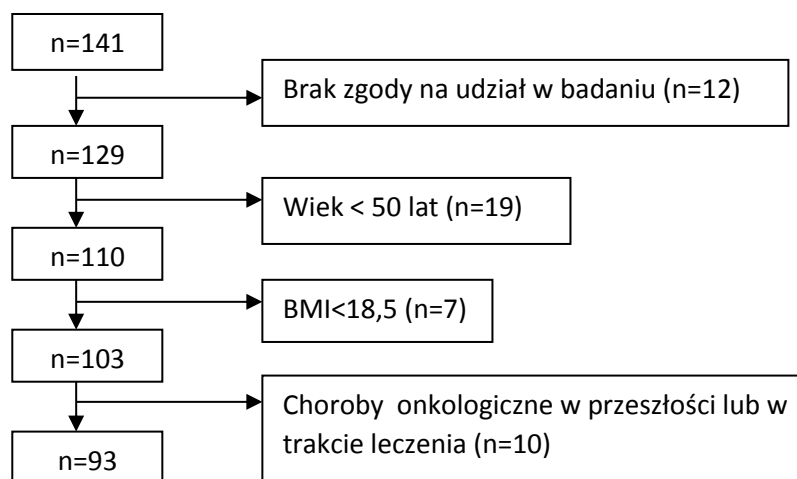
Grupę badaną A - 62 kobiety, u których pierwsze badanie ankietowe i oznaczenie stężenia witaminy D przeprowadzono w zimie - grudniu 2016/styczniu 2017. U tych pacjentek procedurę badawczą powtórzono w lecie - lipcu/sierpniu 2017.

Grupę badaną B - 32 kobiety, u których pierwsze badanie ankietowe i oznaczenie stężenia witaminy D wykonano w lecie - lipcu/sierpniu 2017, i powtórzono je w zimie - grudniu 2017/styczniu 2018.

3.1.2. Grupa kontrolna

Pacjentów rekrutowano wśród uczestników prospołecznego programu „Miej serce dla Nowego Sącza - profilaktyka chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym edukacja dotycząca żywienia i znaczenia zdrowotnego witaminy D” organizowanego przez Urząd Miasta Nowego Sącza i realizowanego w Medycznym Laboratorium Diagnostycznym NZOZ Diagmed sp. z o.o. dla osób z grupy ryzyka wystąpienia niedoborów witaminy D. Kryterium włączenia do programu był wiek ≥ 40 lat oraz zamieszkanie na terenie miasta Nowego Sącza. Program prowadzono od 21.11.2017 do 21.12.2017.

Wstępnie do grupy kontrolnej zakwalifikowano 141 pacjentek w wieku powyżej 40 lat. Ostatecznie do analizy statystycznej włączono 93 kobiety w wieku od 50 do 79 lat, średni wiek wynosił 62 lata (+/- 7 lat). Z badania wykluczono pacjentki, które nie zgodziły się na włączenie do badania (n=12), miały skrajną otyłość lub niedowagę - BMI poniżej 18,5 lub powyżej 40 (n=7), w ankiecie zgłosiły aktualną chorobę nowotworową lub chorobę nowotworową w przeszłości (n=10). Schemat doboru osób w grupie kontrolnej przedstawia rycina 14.



Rycina 14. Kryteria włączenia pacjentów do grupy kontrolnej.

3.2. METODY BADAWCZE

3.2.1. Ankieta

Etap pierwszy: konstrukcja kwestionariusza ankiety. Narzędziem badawczym był kwestionariusz ankiety opracowany na potrzeby opisanego badania (załącznik 2).

Konstruując kwestionariusz ankiety zwrócono uwagę na właściwą kolejność pytań, tak aby pierwsze odnosiły się do kwestii ogólnych, a kolejne do bardziej szczegółowych związanych z omawianym zagadnieniem. Dobierano rodzaje pytań tak, by ułatwić ankietowanym odpowiedź oraz zmniejszyć prawdopodobieństwo błędnych odpowiedzi. Zadbano, aby odpowiedzi na każde pytanie wносиły istotne dane dla badanego problemu. Zastosowano pytania filtrujące, tak by pacjentki mogły np. właściwie odnieść się do kwestii związanych z suplementacją witaminy D₃. Tam gdzie to było możliwe określono zakres pytania, aby umożliwić podanie najbardziej trafnej odpowiedzi np. w kwestii częstości spożywania pokarmów bogatych w witaminę D. Dodatkowo w przypadku niektórych pytań zamkniętych, pozostawiono możliwość indywidualnego podania czy doprecyzowania odpowiedzi np. w pytaniu o źródło informacji na temat suplementowanej

dawki witaminy D₃. Za pomocą ankiety zebrano od badanych kobiet szczegółowe dane obejmujące aspekty demograficzne, kliniczne, społeczne w tym związane z nawykami żywieniowymi.

W ankiecie pytano m.in. o:

- a) podstawowe dane demograficzne i antropometryczne (aktualny wiek, wzrost i masa ciała),
- b) kliniczne, nacelowane na chorobę nowotworową (wiek w którym stwierdzono nowotwór sutka, występowanie nowotworów wśród krewnych, w tym nowotworu sutka, metodzie leczenia raka sutka, leczenia radioterapią w przeszłości),
- c) dane dotyczące układu rozrodczego (wiek przy pierwszej miesiączce, wiek wejścia w okres menopauzy, wiek urodzenia pierwszego dziecka, stosowania HTZ),
- d) nawyków żywieniowych (częstość spożywania produktów bogatych w witaminę D),
- e) ekspozycji na naturalne promieniowanie UV (średni dobowy czas ekspozycji, sposób ochrony przed promieniowaniem UV),
- f) znajomość rekomendacji nt. suplementacji witaminy D₃ u pacjentów onkologicznych oraz zalecenia udzielone przez lekarza prowadzącego nt. suplementacji witaminy D₃.
- g) stosowanie suplementacji witaminą D₃ - przyjmowana dawka w różnych porach roku.

W pytaniu odnoszącym się do powierzchni ciała jaką pacjentki eksponują na promieniowanie słoneczne, do określenia procentowej powierzchni ciała wykorzystano regułę dziewiątek Wallace'a.[133] Produkty spożywcze bogate w witaminę D wybrano na podstawie Norm Żywienia dla populacji Polski [134] oraz polskich zaleceń dotyczących profilaktyki niedoborów witaminy D.[135]

3.2.2 Badanie pilotażowe - walidacja ankiety

W okresie od 22.05 – 20.06.2016 roku przeprowadzono badanie pilotażowe wśród pacjentek biorących udział w programie profilaktycznym oceniającym poziom niedoboru witaminy D wśród mieszkańców powiatu nowosądeckiego. Pacjentki zostały dwukrotnie, w dwutygodniowym odstępie czasu, poproszone o wypełnienie tej samej ankiety. Powtarzalność kwestionariusza sprawdzono poprzez wyznaczenie współczynnika korelacji rang Spearmana pomiędzy wynikami uzyskanymi dla tych samych osób w pierwszym i drugim wywiadzie, co stanowiło element walidacji kwestionariusza. Oceniono powtarzalność kwestionariusza ankiety przy pomocy uzyskanego współczynnika korelacji R Spearmana stosując poniższe kryteria (wg Hoelscher, Am Diet Association, 2003):

0,70 -0,80 poziom akceptowalny

0,81-0,90 poziom wystarczający

>0,91 poziom bardzo dobry

Uzyskano wyniki współczynnika korelacji R Spearmana dla poszczególnych pytań pomiędzy parami ankiet w zakresie od 0,861 do 0,965. Dokonana została korekta części pytań, na które pacjentki miały problem z udzieleniem jednoznacznej odpowiedzi.

Z ankiety przeznaczonej dla grupy kontrolnej usunięto pytania odnoszące się do rozpoznania klinicznego choroby nowotworowej i zastosowanego leczenia, zastąpiono je pytaniem czy u pacjentki stwierdzono nowotwór złośliwy. Ponadto z ankiety dla grupy kontrolnej z pytania o wiek w którym pacjentka weszła w okres menopauzy usunięto część w której pytano czy pacjentka weszła w okres menopauzy przed rozpoznaniem choroby nowotworowej. Zmiana dotyczyła również pytania odnoszącego się do znajomości rekomendacji suplementacją witaminy D₃. W grupie badanej odnosiło się ono do znajomości rekomendacji suplementacji preparatami z witaminą D₃ u kobiet z rakiem sutka lub chorobami nowotworowymi, a w grupie kontrolnej rekomendacji suplementacji u osób zdrowych.

Użyto też pytań kontrolnych celem zweryfikowania odpowiedzi udzielanych przez respondentów.

1. Pytanie o nowotwór występujący rodzinnie, pytanie kontrolne- o nowotwór sutka u krewnego pierwszego stopnia. Jako odpowiedzi niezgodne uznano wykazanie krewnego pierwszego stopnia u którego stwierdzono nowotwór sutka gdy jednocześnie w pytaniu o nowotwór występujący rodzinnie uzyskano odpowiedź o braku zachorowań.
2. Pytanie o stosowanie suplementacji witaminy D₃, jako pytanie kontrolne zapytano o ilość miesięcy w których suplementowana jest witamina D. Jako odpowiedzi niezgodne uznano wykazanie miesięcy w których stosowana jest suplementacja witaminy D₃ gdy w pytaniu o stosowanie suplementacji witaminy D uzyskano odpowiedź zaprzeczającą stosowaniu witaminy D₃.
3. Pytanie o ilość dni w których pacjent się opala w ciągu roku, pytanie kontrolne o noszenie odzieży zakrywającej całe ciało. Jako odpowiedzi niezgodne uznano uzyskanie informacji potwierdzających opalanie się u danej pacjentki równocześnie z odpowiedzią o unikaniu słońca poprzez stosowanie odzieży zakrywającej całe ciało.
4. Pytanie o podanie masy ciała i wzrostu z których wyliczono BMI, jako pytanie kontrolne zapytano o nadwagę w wieku postmenopauzalnym. Jako odpowiedzi niezgodne uznano

uzyskanie u pacjentek BMI powyżej normy z jednoczesną deklaracją pacjentki o braku nadwagi w wieku postmenopauzalnym. Ze statystyki dla tego badania wyłączono kobiety, które w czasie rozpoznania nowotworu były w okresie przedmenopauzalnym.

5. Pytanie o wykonywane w przeszłości oznaczenie witaminy D przy okazji drugiego cyklu oznaczeń. Jako odpowiedzi niezgodne uznano uzyskanie informacji, że pacjentka nie miała wykonanych w przeszłości oznaczeń witaminy D, co było sprzeczne z prawdą, gdyż wszystkie osoby biorące udział w badaniu w pierwszym cyklu miały wykonane badanie stężenia witaminy D.

W zależności od pytania uzyskano zgodność od 82 do 95%.

Anonimizacja danych osobowych

W celu anonimizacji, w ankietach nie korzystano z takich danych jak nazwiska lub adresy uczestników. Każdej osobie badanej został nadany indywidualny kod liczbowy, za pomocą którego identyfikowano osoby biorące udział w badaniu. Jedynie osoba prowadząca badanie miała możliwość zdekodowania uzyskanych danych. Zostało to zrobione tylko i wyłącznie dla potrzeb medycznych (tj. w celu wydania wyniku stężenia witaminy D) i powiązania wyniku badania stężenia witaminy D z danymi z ankiety.

3.2.3 Badanie ankietowe pacjentek

W pracy wykorzystano pośrednią metodę badawczą w postaci ankiety, którą każda z badanych osób wypełniła dwukrotnie, w okresie zimowym i letnim, przed lub po (nie dłużej niż miesiąc) oznaczeniu stężenia witaminy 25(OH)D .

3.3. OZNACZENIA LABORATORYJNE

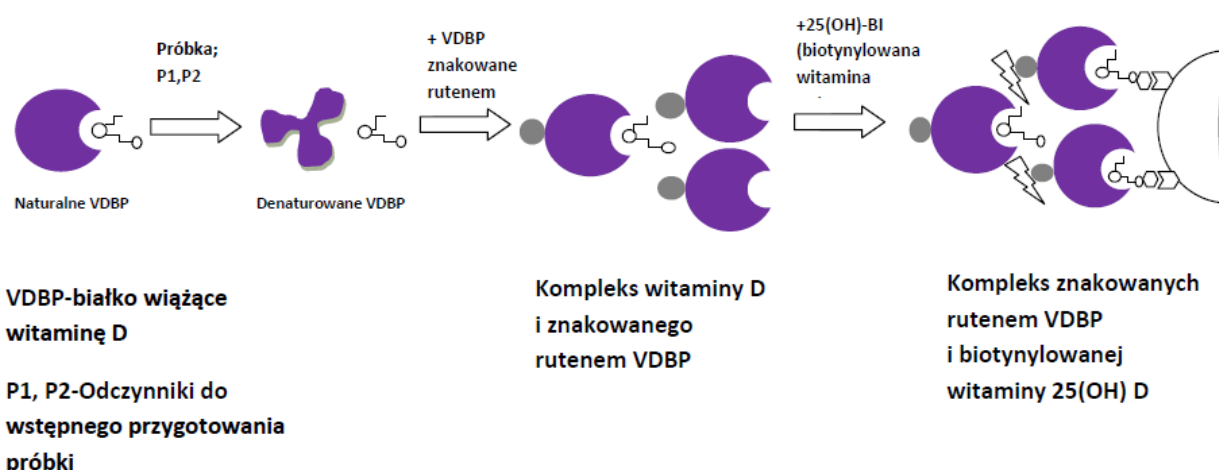
3.3.1 Pobieranie krwi

Pacjentki zgłaszały się między 7 a 10 rano, na czczo, do pobrania krwi w celu oznaczenia stężenia witaminy 25(OH)D. Przed badaniem pacjentki otrzymywały pisemną informację po przeczytaniu której były proszone o podpisanie formularza świadomej zgody na udział w badaniu oraz wypełnienie ankiety bezpośrednio przed pobraniem bądź dostarczenie wypełnionej ankiety przy okazji odbierania wyniku badania.

Od wszystkich badanych pobierano krew żylną do próbek z tworzywa sztucznego PET, sterylnych A z przyspieszaczem wykrzepiania, 4ml VacuCol (Medlab, Polska). Po 20 min (czas wymagany do wykrzepienia), krew odwirowywano przy 3000g przez 10 minut w wirówce MPW-351 (MPW Med. Instruments, Polska) w temperaturze pokojowej. Surowicę oddzielano i wykonywano oznaczenia stężenia witaminy 25(OH)D na bieżąco.

3.3.2 Oznaczenie stężenia witaminy 25(OH)D

Stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy krwi oznaczano kompetycyjną metodą immunochemiczną na analizatorze Integra cobas e411 (Roche Diagnostics, Szwajcaria) testem Elecsys Vitamin D total II (Roche Diagnostics, Szwajcaria) wykorzystującym elektrochemiluminescencję. W teście tym 25-hydroksywitamina D₃ i 25-hydroksywitamina D₂ łączy się ze znakowanym rutenem białkiem wiążącym witaminę D (VDBP). Reakcje krzyżowe z 24,25-dihydroksywitaminą D blokowane są za pomocą swoistych przeciwciał monoklonalnych.



Rycina 15. Schemat metody oznaczania witaminy D.

Procedura wykonania oznaczenia:

Surowicę (20 µL) inkubowano z odczynnikami do wstępnego przygotowywania próbki, (odczynnik 1 - dithiothreitol 1 g/l, pH 5,5, odczynnik 2 - wodorotlenek sodu 55 g/l) dzięki czemu związana 25-hydroksywitamina D uwalniana jest od endogennego VDBP, które ulega inaktywacji. W trakcie inkubacji wstępnie przetworzonej próbki ze znakowanym rutenem białkiem wiążącym witaminę D, tworzy się kompleks pomiędzy 25-hydroksywitaminą D, a znakowanym rutenem VDBP. Swoiste, nieznakowane przeciwciała wiążą obecną w próbce 24,25-dihydroksywitaminę D i hamują reakcje krzyżowe tego metabolitu witaminy D z VDBP.

Po dodaniu paramagnetycznych mikrocząstek opłaszczonych streptawidyną i znakowanej biotyną 25-hydroksywitaminy D, związane zostają wolne, nadmiarowe cząsteczki VDBP znakowane rutenem. Tworzy się kompleks składający się ze znakowanego rutenem białka wiążącego witaminę D i biotynylowanej 25-hydroksywitaminy D, który z kolei wiąże się z fazą stałą poprzez interakcję biotyny i streptawidyny. Mieszanina reakcyjna przenoszona jest do komory pomiarowej, gdzie mikrocząstki przyciągane są do powierzchni elektrody na zasadzie magnetycznych oddziaływań pomiędzy cząstkami paramagnetycznymi a elektrodą. Następnie niezwiązane substancje usuwane są za pomocą płynów płuczących. Napięcie przyłożone do elektrody indukuje reakcję elektrochemiluminescencji z udziałem rutenu, której produktami są fotony światła mierzone za pomocą fotopowielacza. Ich liczba jest odwrotnie proporcjonalna do ilości oznaczanej witaminy D.

Wyniki odczytywane są z krzywej wzorcowej po wcześniejszym wykonaniu 2 punktowej kalibracji przy użyciu dedykowanego zestawu CalSet. Kalibrację wykonywano dla każdej nowej serii odczynnika. Ponowną kalibrację wykonywano zgodnie z wytycznymi producenta zestawów:

- gdy używano nowego zestawu odczynnikowego,
- po 7 dniach, jeżeli w analizatorze stosowany był ten sam zestaw odczynnikowy.

3.3.3 Laboratoryjna charakterystyka zestawów Elecsys

Granice i zakresy

Zakres pomiarowy 3-100 ng/ml czyli 7,5-250 nmol/l (wyznaczone przez granicę wykrywalności oraz najwyższy punkt krzywej wzorcowej). Wartości poniżej dolnej granicy wykrywalności podaje się jako < 3 ng/ml (< 7,5 nmol/l). Wartości powyżej zakresu pomiarowego podaje się jako > 100 ng/ml (> 250 nmol/l).

- Całkowity czas trwania oznaczenia: 27 min
- Materiał do badania: surowica i osocze
- Objętość próbki: 20 μ L
- Powtarzalność: < 20 ng/ml SD < 0,8 ng/ml; > 20 ng/ml CV \leq 4,1%
- Precyzja pośrednia: < 20 ng/ml SD \leq 1,3 ng/ml; > 20 ng/ml CV \leq 5,6%

Kalibracja, spójność pomiarowa:

Metoda została wystandaryzowana wobec standardów wewnętrznych spójnych z Referencyjną Metodą Pomiarową ID-LC-MS/MS dla 25-hydroksywitaminy D. Procedura

ID-LC-MS/MS jest spójna ze Standardowym Materiałem Referencyjnym 2972 Krajowego Instytutu Standardów i Technologii (USA). Wszystkie dane kalibracyjne danej serii odczynnika Elecsys zapisane są na etykiecie w postaci kodu kreskowego.

Zgodnie z zaleceniami producenta zestawu kalibrację należy przeprowadzić zawsze dla nowej serii odczynnika (w ciągu 24 godz. od umieszczenia go w analizatorze), a ponowną kalibrację po 3 mies. (12 tyg.) jeżeli stosowana jest ta sama seria odczynnika i po 7 dniach, jeżeli zestaw odczynnikowy zdeponowany jest w analizatorze.

Kontrola jakości

Do przeprowadzenia kontroli jakości używano zestawu PreciControl Vitamin D total II (Roche, Szwajcaria). Kontrole były oznaczane równolegle do próbek badanych w dwóch zakresach stężeń. Wartości docelowe kontroli odpowiednio na poziomie 1 i 2 wynosiły 13 ng/ml i 30 ng/ml. Wyniki kontroli zawsze mieściły w wyznaczonych zakresach i nie przekraczały granic dopuszczalnego błędu całkowitego dla tego oznaczenia.

Zakres wartości referencyjnych stężenia 25(OH)D w surowicy krwi:

0-10 ng/ml niedobór ciężki

10-20 ng/ml niedobór znaczny

20-30 ng/ml stężenie suboptymalne

30-50 ng/ml stężenie optymalne

50-100 stężenie wysokie

> 100 ng/ml stężenie toksyczne

wg rekomendacji profilaktyki i leczenia niedoborów witaminy D dla populacji ogólnej i w grupach ryzyka z 2018 roku.[115]

3.4 PROCEDURA BADANIA

Procedurę badania, na którą składało się pobranie krwi, wykonanie oznaczeń stężenia 25(OH)D w surowicy, wypełnienie ankiet przeprowadzono w grupach A i B dwukrotnie ze względu na sezonową zmienność stężenia witaminy D.

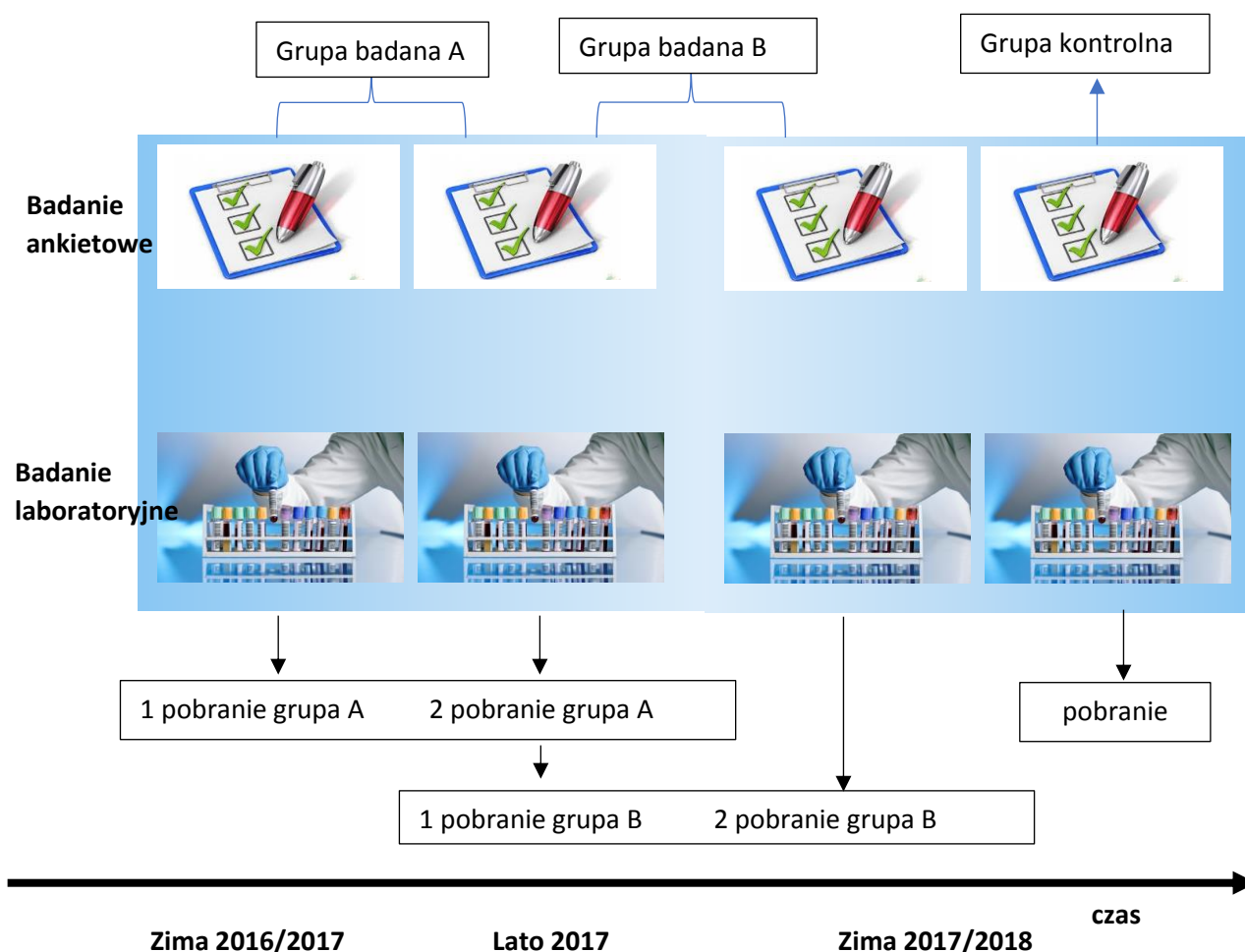
Grupa A została włączona do badania zimą 2016/2017 (grudzień/styczeń), kolejnego pobrania krwi od pacjentek wraz z powtórным wypełnieniem ankiet dokonano latem 2017 (lipiec/sierpień).

Grupa B natomiast została włączona do badania latem 2017 (lipiec/sierpień), kolejnego pobrania krwi od pacjentek wraz z powtórным uzupełnieniem ankiet dokonano zimą 2017/2018 (grudzień /styczeń).

Grupa kontrolna została włączona do badania zimą 2017 roku (listopad/grudzień).

Pacjentkom z grup A i B po uzyskaniu wyników z pierwszorazowych badań została udzielona porada przez diagnostę laboratoryjnego w zakresie laboratoryjnej interpretacji wyniku stężenia 25(OH)D, a dodatkowo, w przypadku wyników poza wartościami referencyjnymi poinformowano pacjentki o konieczności uzyskania porady lekarskiej.

Graficzny schemat procedury badania



Rycina 16. Schemat procedury badania - pobrań krwi oraz wypełniania ankiet.

3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA

Statystyka opisowa

Zgodność rozkładu zmiennych z hipotetycznym rozkładem normalnym była sprawdzona testem normalności D'Agostino-Pearson. Uzyskane wyniki badań są przedstawione wykorzystując podstawowe elementy statystyki opisowej:

1. Miary położenia:

- a) wartość średnią
- b) medianę

2. Miary zmienności:

- a) odchylenie standardowe
- b) minimum
- c) maksimum

Zależności

Do oceny prostych zależności pomiędzy pojedynczymi parametrami wykorzystano testy korelacji. Dla zmiennych o charakterze ciągłym o rozkładach normalnych zastosowano test parametryczny korelacji Pearsona. W pozostałych przypadkach zastosowano test nieparametryczny – korelację rang Spearmana. Do porównania grup pod względem cechy mierzalnej zastosowano analizę wariancji (ANOVA). W celu oceny różnic pomiędzy wybranymi czynnikami w grupie badanej A i B dla zmiennych o rozkładzie normalnym stosowano test t-studenta, natomiast dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego test U-Manna-Whitneya (oba dla zmiennych niezależnych). W przypadku porównywania zmiennych zależnych wykorzystano test Wilcoxon. Do porównania rozkładu danych skategoryzowanych w obu grupach badanych wykorzystano test chi kwadrat.

Za wyniki istotne statystycznie uznawano wyniki, w których $p < 0,05$.

Wyniki uzyskane w trakcie analiz przedstawiono w postaci tabel oraz wykresów.

Do przeprowadzenia analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie komputerowe Statistica 13 (TIBCO Software Inc., USA) oraz MedCalc 15.8 (MedCalc Software Ltd, Belgia).

4. WYNIKI BADAŃ

4.1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP

Od wszystkich chorych zebrano dane demograficzne i antropometryczne takie jak wiek, masa ciała i wzrost. W oparciu o dwie ostatnie dane obliczono wskaźnik masy ciała (BMI).

Grupę badaną A stanowiły 62 kobiety, których średnia wieku wynosiła 64,5 roku (SD 11 +/- lat) (zakres od 30 do 86 lat), średni wzrost i masa ciała badanych kobiet wynosiła odpowiednio 161, 6 cm +/- 5,9 cm oraz 70,2 kg +/- 10,4 kg. Wyliczono BMI, który wynosił 26,9 kg/m² +/- 4,1 kg/m². Szczegółowe informacje zawarte zostały w tabeli 2.

Do grupy badanej B włączono 32 kobiety, których średnia wieku wynosiła 63 lata (SD 8 +/- lat) (zakres od 46 do 78 lat), średni wzrost kobiet wynosił 162,9 cm +/- 6,7 cm, średnia masa ciała 74kg +/- 12,8 kg. Wyliczony BMI średnio wynosił 27,9 kg/m² +/- 4,4. Szczegółowe informacje dotyczące danych demograficzno - antropometrycznych zostały zawarte w tabeli 2.

Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiły 93 kobiety, których średni wiek wynosił 62,1 lat (SD +/- 7,1 lat) (zakres od 50-79 lat), średni wzrost kobiet w grupie kontrolnej wynosił 162,1 cm +/- 6,3 cm, średnia masa ciała 68,9 +/- 10,6 kg. Wyliczone średnie BMI wynosiło 26,2 +/- 3,7 kg/m². Szczegółowe informacje zawarte zostały w tabeli 2.

Wyżej opisane parametry nie różniły się statystycznie pomiędzy poszczególnymi grupami A, B i grupą kontrolną (wiek p=0,234; wzrost p=0,662; masa ciała p=0,156; BMI p=0,148 test ANOVA) (Tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka demograficzno-antropometryczna grup badanych i grupy kontrolnej.

		WIEK	WZROST	MASA CIAŁA	BMI
		[lata +/- SD]	[cm +/- SD]	[kg +/-SD]	[kg/m ² +/- SD]
Grupa A	średnia	64,5	161,6	70,2	26,9
	SD	11,1	5,9	10,4	4,1
Grupa B	średnia	63,0	162,9	74,0	27,9
	SD	8,1	6,7	12,8	4,4
Grupa kontrolna	średnia	62,1	162,1	68,9	26,2
	SD	7,1	6,3	10,6	3,7
p ANOVA		p=0,234	p=0,662	p=0,156	p=0,148

4.2 PODSTAWOWE DANE EPIDEMIOLOGICZNE ZWIĄZANE Z UKŁADEM ROZRODCZYM

Grupa badana A

Średnia wieku, w którym pacjentki rozpoczynały miesiączkować wynosił 14 lat (zakres od 11 do 18 lat), natomiast mediana wieku w którym wchodziły w okres menopauzy wynosiła 50 lat (zakres od 45 do 51 lat). Osiem kobiet (13%) nie rodziło. Mediana wieku pierwszego porodu wynosiła 23,5 lat (zakres od 21 do 27 lat). Większość chorych (86%) nie stosowała HTZ/doustnej antykoncepcji. Wartość skorygowana odsetka pacjentek stosujących HTZ w tej grupie wyniósł 26%. Korekcja polegała na pominięciu w wyliczeniach pacjentek, u których wykryto nowotwór sutka przed menopauzą, co jest przeciwwskazaniem to stosowania hormonalnej terapii zastępczej. Szczegółowe informacje dotyczące tych danych zostały zawarte w tabeli 3.

Grupa badana B

Mediana wieku, w którym pacjentki rozpoczynały miesiączkować wynosiła 14 lat (zakres od 13 do 15 lat), natomiast mediana wieku w którym wchodziły w okres menopauzy wynosiła 50 lat (zakres od 49 do 53 lat). Cztery pacjentki nie rodziły, co stanowiło 13% pacjentek tej grupy. Mediana wieku pierwszego porodu wynosiła 23,5 lat (zakres od 21 do 25,5 lat). Większość badanych w tej grupie (87%) nie stosowała HTZ/doustnej antykoncepcji. Wartość skorygowana

(wg zasad opisanych wyżej) odsetka pacjentek stosujących HTZ wynosiła 21%. Szczegółowe informacje przedstawiono w tabeli 3.

Grupa kontrolna

Średnia wieku, w którym pacjentki rozpoczynały miesiączkować wynosił 14 lat (zakres od 11 do 17 lat), natomiast średnio w wieku 50 lat wchodziły w okres menopauzy (zakres od 39 do 60 lat). Liczba nieródek wynosiła 15, co stanowiło 16% pacjentek grupy kontrolnej. Średni wiek pierwszego porodu wyniósł 24,4 lata. Większość badanych tej grupy (74%) nie stosowała HTZ/doustnej antykoncepcji. Szczegółowe informacje dotyczące danych demograficzno-klinicznych zostały zawarte w tabeli 3.

Wyżej opisane parametry (poza stosowaniem HTZ) nie różniły się statystycznie zarówno pomiędzy grupą pacjentek po leczeniu przeciwnowotworowym a grupą kontrolną (wiek pierwszej miesiączki $p=0,652$, wiek menopauzy $p=0,657$ i wiek, w którym pacjentki rodziły pierwsze dziecko $p=0,699$; test U Manna-Whitneya) jak i pomiędzy wydzielonymi grupami A, B a grupą kobiet, bez chorób nowotworowych w wywiadzie (Tabela 3).

Tabela 3. Charakterystyka demograficzno-kliniczna grup badanych i grupy kontrolnej.

	Wiek I miesiączki	Wiek menopauzy	Liczba nieródek (odsetek)	Wiek w czasie pierwszego porodu	HTZ liczba (odsetek)	HTZ wartości skorygowane *
Grupa A	14,1 +/- 1,6	50 [45; 51]	8 (13%)	23,5 [21; 27]	9 (14%)	26%
Grupa B	14 [13; 15]	50 [49; 53]	4 (13%)	23,5 [21; 25,5]	4 (13%)	21%
Grupa kontrolna	14,0 +/- 1,6	50,5 +/- 4,1	15 (16%)	24,4 +/- 4,0	25 (26%)	
p	$p=0,652$	$p=0,657$	$p=0,85$	$p=0,699$	$p=0,04$	$p=0,92$

średnia i SD lub mediana i kwartyłe gdzie właściwe

*Wartości skorygowane – u 27 pacjentek z grupy A i 13 pacjentek z grupy B rozpoznano nowotwór piersi przed menopauzą. Odsetek kobiet stosujących HTZ liczono tylko dla pozostałych kobiet.

W przypadku stosowania hormonalnej terapii zastępczej stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę pomiędzy grupą pacjentek po leczeniu raka sutka a grupą kontrolną przed korekcją. Pomiedzy skorygowanymi grupami badanymi (korekcja polegała na pominięciu w

wyliczeniach pacjentek, u których wykryto nowotwór sutka przed menopauzą) a grupą kontrolną nie stwierdzono różnic w częstości stosowania HTZ.

4.3 PODSTAWOWE DANE KLINICZNE ZWIĄZANE Z CHOROBA NOWOTWOROWĄ

Grupa A

Nowotwór u kobiet tej grupy rozpoznano średnio w wieku 52 lat (zakres wynosił od 30 do 78 lat). Od wykrycia choroby nowotworowej do obecnego badania minęło średnio 13,8 lat. W większości przypadków (56,46%) choroba została rozpoznana po wejściu w okres menopauzy. Jedynie

w przypadku 12,9% chorych nowotwór sutka został wykryty u krewnej I stopnia. W najbliższej rodzinie 29,0% pacjentek wykryto inny nowotwór. Wszystkie chore poddane zostały mastektomii, dodatkowo u 25 chorych (46,30%) włączono leczenie systemowe (chemioterapia i/lub hormonoterapia). Szczegółowe informacje zawarte zostały w tabeli 4.

Grupa B

W tej grupie badanej nowotwór średnio rozpoznano w wieku 53 lat (zakres wynosił od 32 do 68 lat). W większości przypadków (59,38%) choroba została zdiagnozowana w okresie menopauzy. Od wykrycia choroby nowotworowej do obecnego badania minęło średnio 11,3 roku. Jedynie w przypadku 12,5% chorych, nowotwór sutka został wykryty u krewnej I stopnia. W 40,62% przypadków wykryto inny nowotwór u członków najbliższej rodziny. Wszystkie chore poddane zostały mastektomii, ponadto u 11 chorych (35,5%) zastosowano również leczenie systemowe (chemioterapia i/lub hormonoterapia). Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 4.

Grupa kontrolna

W grupie kontrolnej u 10 osób (10,7%) wykryto nowotwór sutka u krewnej I stopnia, natomiast wśród członków najbliższej rodziny 31,2% osób stwierdzono inny nowotwór.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna grup badanych i grupy kontrolnej związana z chorobą nowotworową.

	Wiek, w którym wykryto nowotwór sutka	Lata od wykrycia nowotworu do obecnego badania	Nowotwór piersi u bliskiej krewnej (odsetek)	Inna choroba nowotworowa w rodzinie (odsetek)
Grupa A	52,7 +/- 11,8	13,8 +/- 11,5	8 (12,9%)	18 (29,0%)
Grupa B	53,4 +/- 8,8	11,3 +/- 12,7	4 (12,5%)	13 (40,62%)
Grupa kontrolna	X	X	10 (10,7%)	29 (31,2%)
p dla grup badanych A i B	p=0,63	p=0,34	p=0,93 *p=0,70	p=0,24 *p=0,85

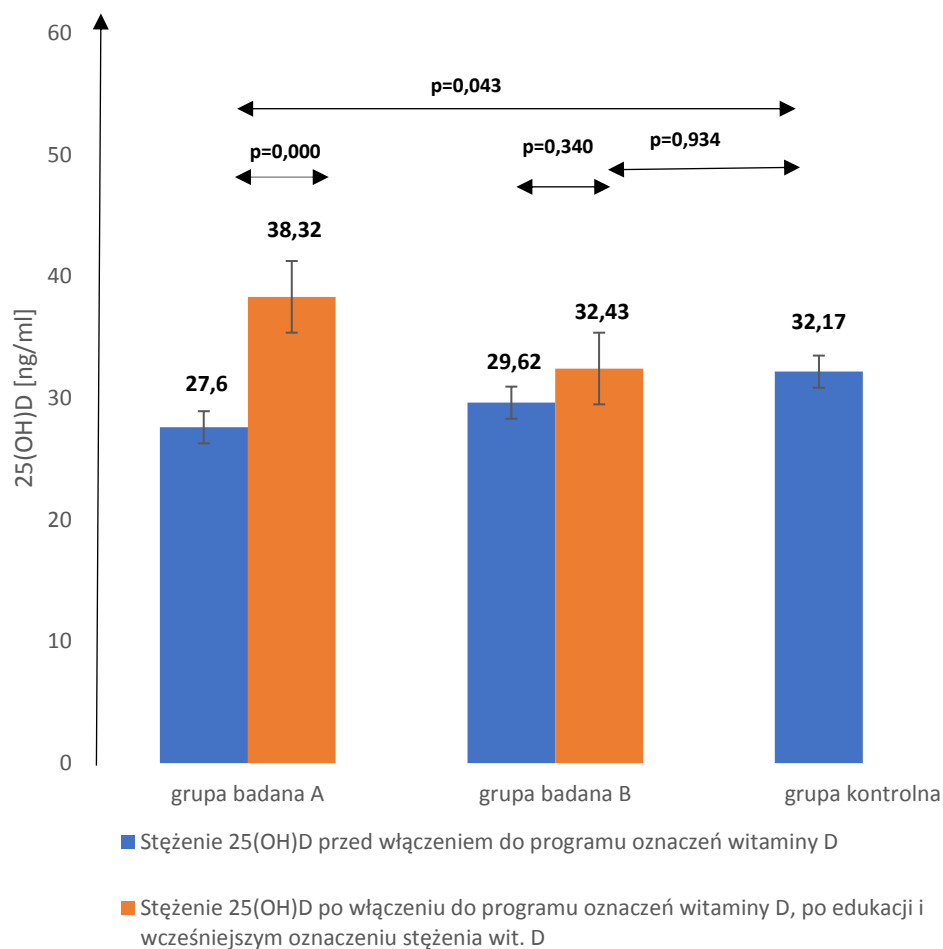
*Grupa badana (grupa A + grupa B) vs kontrola

W zakresie występowania nowotworów w rodzinie nie stwierdzono różnic pomiędzy wszystkimi badanymi grupami. W przypadku danych związanych z zachorowaniem na nowotwór sutka nie stwierdzono różnic pomiędzy grupą A i B.

4.4 STĘŻENIE WITAMINY D U PACJENTEK BADANYCH GRUP

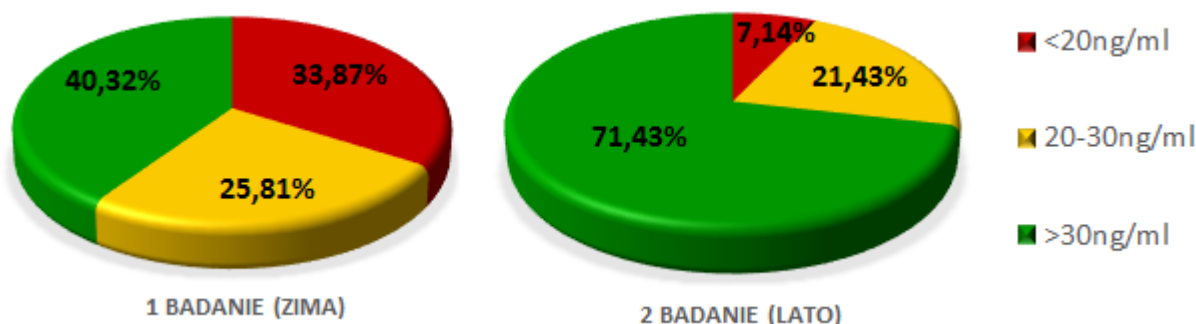
Średnie stężenie witaminy D w grupie A w pierwszym badaniu wynosiło 27,60 +/- 14,1 ng/ml, a po pół roku później, jej średnie stężenie wyniosło 38,32 +/- 12,2 ng/ml. W grupie B, w pierwszym badaniu średnie stężenie witaminy D wynosiło 29,6 +/- 13,6 ng/ml a po pół roku wzrosło do 32,4 +/- 13,3 ng/ml. W grupie kontrolnej średnie stężenie witaminy D (oznaczone zimą) wynosiło 32,2 +/- 14,4 ng/ml (Rycina 17).

Średnie stężenia witaminy D w grupie A w pierwszym badaniu były znacząco niższe niż średnie stężenie witaminy D w drugim badaniu, po edukacji i w miesiącach letnich (p=0,000 test Wilcoxon). Wyniki z pierwszego badania w tej grupie były również znacząco niższe niż średnie stężenie witaminy D w grupie kontrolnej (p=0,043). W grupie B nie wykazano znaczących różnic zarówno pomiędzy wynikami średniego stężenia witaminy D uzyskanych z pierwszego badania przed edukacją pacjentek, a średnim wynikiem stężenia witaminy D uzyskanego z drugiego badania (p=0,340 test Wilcoxon). Podobnie nie stwierdzono różnic znaczących statystycznie pomiędzy średnim wynikiem stężenia witaminy D w grupie kontrolnej, a średnim wynikiem stężenia witaminy D uzyskanego z drugiego pobrania w grupie B (oba pobrania w zimie) (p=0,934).



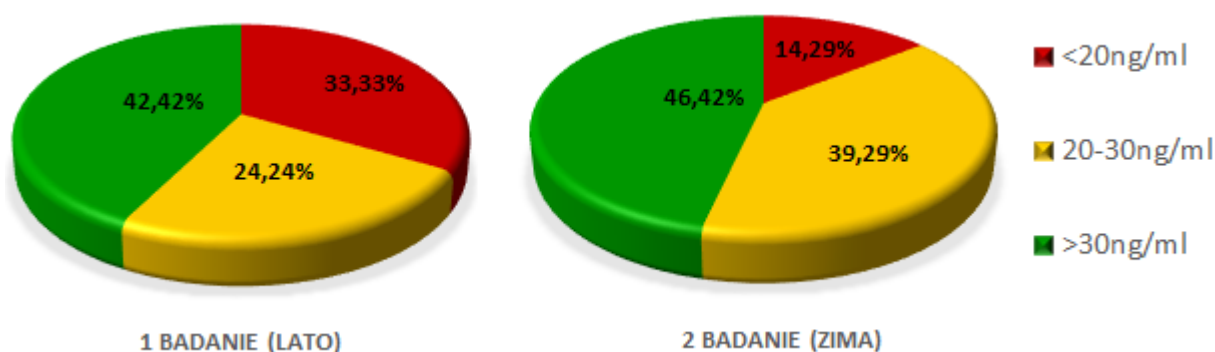
Rycina 17. Średnie stężenia 25(OH)D (+/- SD) uzyskane w badaniach przed i po włączeniu do programu oznaczeń witaminy D w poszczególnych grupach. Porównanie wyników grupy kontrolnej (uzyskanych zimą), do wyników grup z okresów zimowych.

W grupie A, w wynikach uzyskanych z pierwszego badania (zima) stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy u 33,87% pacjentek wynosiło poniżej 20 ng/ml (poniżej zakresu wartości referencyjnych), u 25,81% mieściło się w zakresie 20-30 ng/ml (poziom suboptymalny), natomiast u 40,32% chorych wynosiło powyżej 30 ng/ml (wartość prawidłowa) (Rycina 18). W wynikach uzyskanych z drugiego badania (lato) stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy poniżej 20 ng/ml zaobserwowano u 7,14% pacjentek grupy A, u 21,43% mieściło się w zakresie 20-30 ng/ml (poziom suboptymalny), natomiast u 71,43% chorych wynosiło powyżej 30 ng/ml (wartość prawidłowa) (Rycina 18).



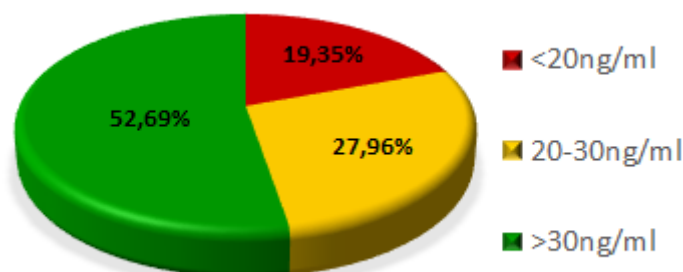
Rycina 18. Stratyfikacja stężeń witaminy D w grupie A w zimie i w lecie. Zielonym kolorem zaznaczono odsetek badanych z prawidłowym stężeniem witaminy D (>30 ng/ml), żółtym z poziomem suboptymalnym (20-30 ng/ml) i czerwonym z niedoborem (<20 ng/ml).

W grupie B w wynikach uzyskanych z pierwszego badania (lato) stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy u 33,33% pacjentek wynosiło poniżej 20 ng/ml (poniżej zakresu wartości referencyjnych), u 24,24% mieściło się w zakresie 20-30 ng/ml (poziom suboptymalny), natomiast u 42,42% chorych wynosiło powyżej 30 ng/ml (wartość prawidłowa) (Rycina 19). W wynikach uzyskanych z drugiego badania (zima) stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy poniżej 20 ng/ml stwierdzono u 14,29% pacjentek, u 39,29% mieściło się w zakresie 20-30 ng/ml (poziom suboptymalny), natomiast u 46,42% chorych wynosiło powyżej 30 ng/ml (wartość prawidłowa) (Rycina 19).



Rycina 19. Odsetek kobiet po leczonym raku sutka ze stężeniami witaminy 25(OH)D poniżej zakresu wartości referencyjnych oraz odsetek kobiet z wartościami w granicach wartości referencyjnych w grupie badanej B (pierwsze badanie - lato, drugie badanie w zimie).

W grupie kontrolnej, w wynikach uzyskanych z badania przeprowadzonego zimą stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy u 19,35% pacjentek wynosiło poniżej 20 ng/ml (poniżej zakresu wartości referencyjnych), u 27,96% mieściło się w zakresie 20-30 ng/ml (poziom suboptymalny), natomiast u 52,69% wynosiło powyżej 30 ng/ml (wartość prawidłowa) (Rycina 20).



Rycina 20. Stratyfikacja stężeń witaminy 25(OH)D w grupie kontrolnej.

Szczegółowy opis stężeń witaminy D w poszczególnych grupach w odniesieniu do suplementacji, znajomości rekomendacji odnośnie zasad suplementacji i leczenia witaminą D₃ zamieszczono przy omawianiu tych zagadnień.

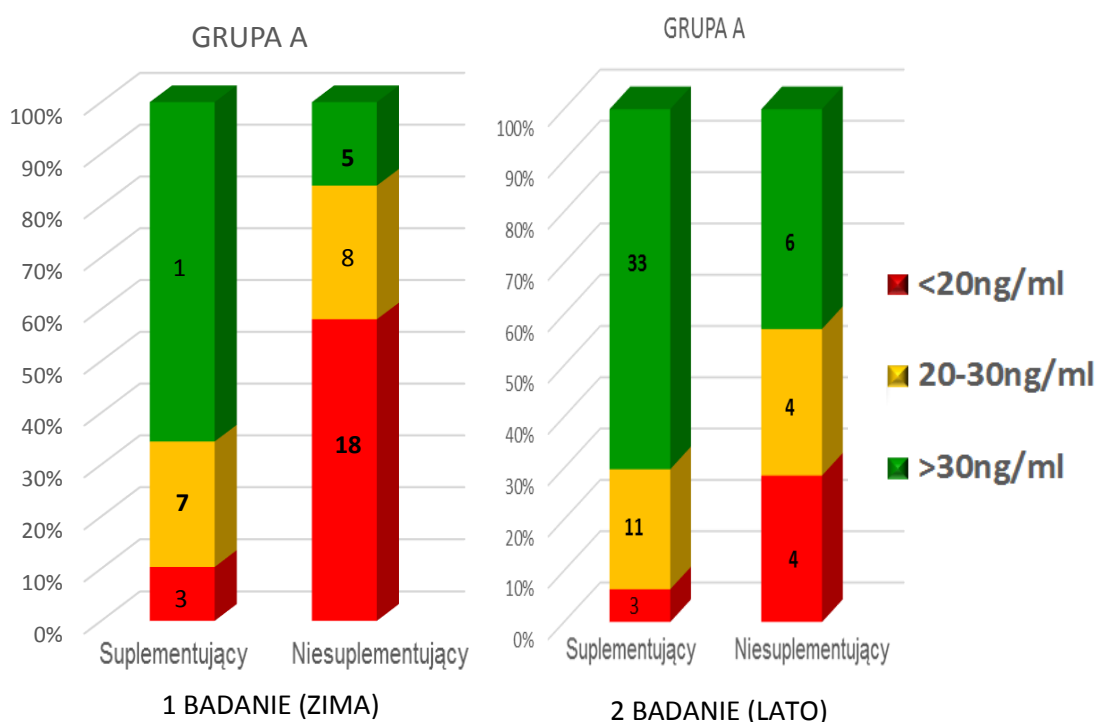
4.5 SUPLEMENTACJA WITAMINY D₃ W BADANYCH GRUPACH

W momencie włączania do badania pacjentek po leczeniu raka sutka ponad połowa z nich nie suplementowała witaminy D₃. W grupie A było to 51,6% (n=32), a w grupie B 56,2 % (n=18). Wg danych z ankiet wykonanych przy okazji drugiego pobrania, po uzyskaniu wyniku stężenia witaminy D odsetek suplementujących w grupie A wzrósł z 48,4% do 75,8% (n=47) a więc o 27,4%, natomiast w grupie B z 43,8% do 76,9%, czyli o 33,1%. Wzrosła też średnia dawka suplementowanej witaminy D₃. W grupie A średnia dawka witaminy D przyjmowana przed pierwszym oznaczeniem witaminy D (w okresie zimowym) wynosiła średnio 1500 jednostek na dobę (zakres od 200 do 4000 jednostek). Natomiast w okresie przed kolejnym pobraniem średnia przyjmowana dawka witaminy D wynosiła nieco powyżej 1700 jednostek na dobę (zakres od 500 do 4000 jednostek). W grupie B średnia przyjmowana dawka witaminy D przed pierwszym badaniem wynosiła blisko 2000 jednostek na dobę (zakres od 1000 do 8000 jednostek). Natomiast po edukacji, przed kolejnym pobraniem wzrosła średnio prawie 2500 jednostek na dobę. Szczegółowe dane dotyczące poziomu witaminy D w zależności od suplementacji zostały zawarte zostały w tabeli 5.

Tabela 5. Średnie stężenia 25(OH)D w zależności od suplementacji witaminy D₃.

	Suplementujący [ng/ml]	Niesuplementujący [ng/ml]	p
Grupa 1A I pobranie zima	34,6 +/-14,2	22,4 +/-11,9	p=0,0006
Grupa 1A II pobranie lato	38,9 +/- 12,2	34,8 +/-12,1	p=0,24
Grupa 1B I pobranie lato	36,8 +/- 15,4	24,0 +/- 9,0	p=0,012
Grupa 1B II pobranie zima	35,3 +/-13,7	22,75 +/-5,3	p=0,001
Kontrola	38,3 +/- 16,3	27,6 +/- 10,9	p=0,0006

W grupie A przy pierwszym badaniu (zima) stężenie 25(OH)D poniżej 20 ng/ml stwierdzono u 10,34% (n=3) pacjentek, które przyjmowały farmakopelną postać witaminy D oraz u 58,06% (n=18) pacjentek, które nie stosowały suplementacji. Poziom suboptymalny wykazano u 24,13 % (n=7) osób przyjmujących preparaty witaminy D oraz u 25,8% (n=8) pacjentek nie przyjmujących farmakopelnej witaminy D.



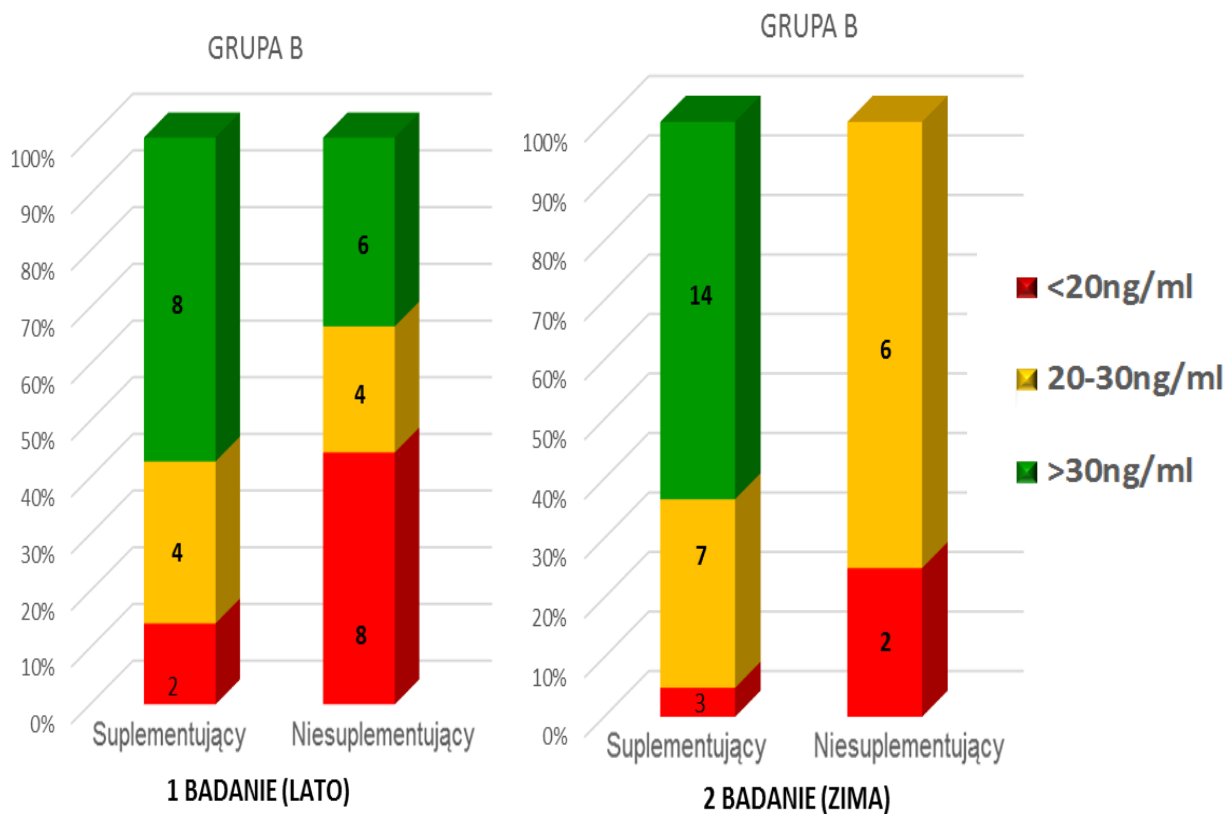
Rycina 21. Odsetek pacjentek z niedoborem, poziomem suboptymalnym i prawidłowym stężeniem witaminy D w zależności od suplementacji w grupie A w pierwszym badaniu (zima) i w drugim badaniu (lato).

Wartości zalecane stężenia witaminy D wynoszące > 30 ng/ml stwierdzono u 19 osób (65,51%) przyjmujących farmakopealną witaminę D oraz 5 osób (16,12%) nie suplementujących witaminy D₃ (Rycina 21).

W wynikach uzyskanych w drugim badaniu (lato; grupa A) stężenie 25(OH)D poniżej 20 ng/ml stwierdzono u 6,38% (n=3) pacjentek, które przyjmowały farmakopealną postać witaminy D₃, oraz u 28,57% (n=4) w grupie niesuplementujących, poziom suboptymalny wykazano u 23,4% (n=11) osób przyjmujących preparaty witaminy D₃ oraz u 28,57% (n=4) pacjentek nie przyjmujących farmakopealnej witaminy D₃. Wartość prawidłową stężenia witaminy D wynoszącą > 30 ng/ml stwierdzono u 70,21% (n=33) osób przyjmujących farmakopealną witaminę D oraz u 42,86% (n=6) osób nie suplementujących witaminy D₃ (Rycina 21).

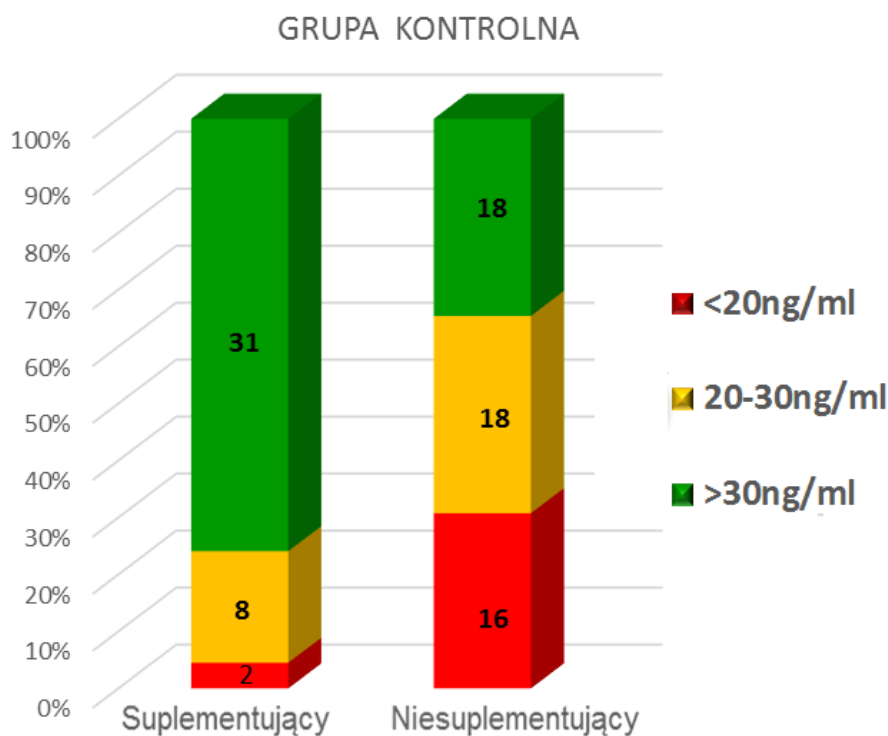
W grupie B, w wynikach uzyskanych z pierwszego badania (lato) stężenie 25(OH)D poniżej 20 ng/ml uzyskało 14,28% (n=2) pacjentek które przyjmowały farmakopealną postać witaminy D, w grupie nieprzyjmujących farmakopealnej witaminy D odsetek osób w tej grupie wyniósł 44,44% (n=8), poziom suboptymalny wykazano u 28,57% osób przyjmujących (n=4) i 22,22% nieprzyjmujących (n=4) preparaty witaminy D. Wartość prawidłową stężenia witaminy D wynoszącą > 30 ng/ml stwierdzono u 57,14% (n=8) osób przyjmujących farmakopealną witaminę D oraz u 33,33% (n=6) osób, które nie suplementowały witaminy D₃ (Rycina 22).

W wynikach uzyskanych z drugiego badania (zima) stężenie 25(OH)D poniżej 20 ng/ml uzyskały trzy pacjentki (12,5%), które przyjmowały farmakopealną postać witaminy D₃, oraz dwie niesuplementujące (25%). Poziom suboptymalny wykazano u siedmiu osób (29,16%) przyjmujących preparaty witaminy D₃ oraz u sześciu (75%) pacjentek nie przyjmujących farmakopealnej witaminy D₃. Wartość prawidłową stężenia witaminy D stwierdzono u 14 pacjentek (58,33%) przyjmujących farmakopealną witaminę D₃, żadna pacjentka z grupy niesuplementujących preparatów witaminy D₃ nie uzyskała prawidłowego stężenia witaminy D. (Rycina 22).



Rycina 22. Odsetek pacjentek z niedoborem, poziomem suboptymalnym i prawidłowym stężeniem witaminy D w zależności od suplementacji w grupie B w pierwszym badaniu (lato) i w drugim badaniu (zima).

Wśród pacjentek z grupy kontrolnej stężenie 25 (OH)D poniżej 20 ng/ml stwierdzono u dwóch (4,88%) osób, które suplementowały witaminę D₃, i u 16 (30,76%) pacjentek bez suplementacji. Poziom suboptymalny wykazano u ośmiu (19,51%) osób przyjmujących preparaty witaminy D oraz u osiemnastu (34,62%) pacjentek nie przyjmujących farmakologicznej witaminy D₃. Wartości zalecane stężenia witaminy D stwierdzono u trzydziestu jeden (75,61%) osób przyjmujących farmakologiczną witaminę D₃ oraz u osiemnastu (34,62%) osób nie suplementowały witaminy D₃ (Rycina 23).



Rycina 23. Odsetek kobiet grupy kontrolnej z niedoborem, poziomem suboptymalnym i prawidłowym stężeniem witaminy D w zależności od suplementacji.

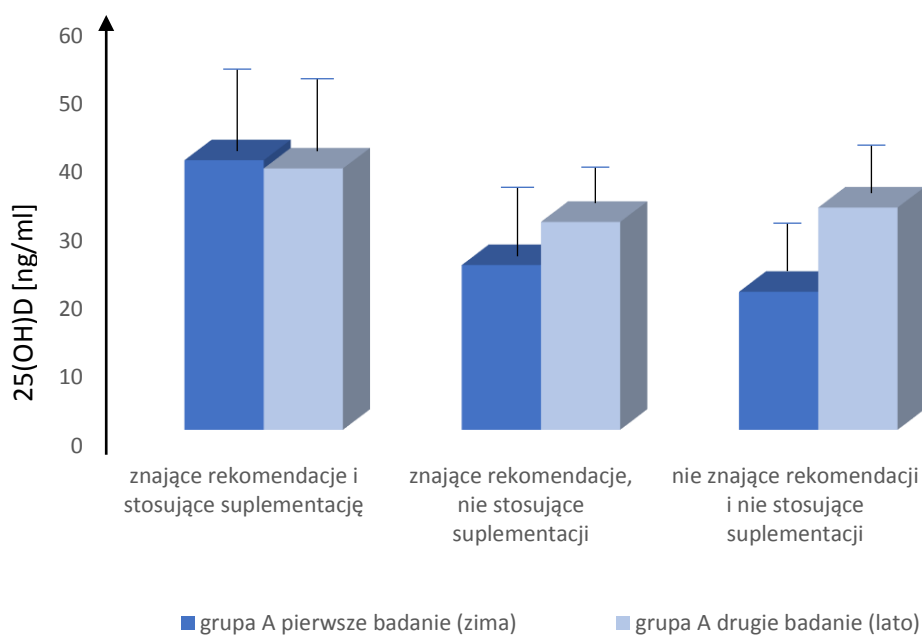
Odsetki osób suplementujących witaminę D₃ w grupie A i B przy pierwszym pobraniu z niedoborem, stężeniem suboptymalnym i z wartościami prawidłowymi były zbliżone – odpowiednio (A – 10%; 24%, 66%, B – 14%, 29%, 57%). W grupie kontrolnej wśród kobiet suplementujących witaminę D₃ odsetek osób z prawidłowym wynikiem witaminy D był jednak znacznie wyższy (75%). Natomiast wśród pacjentek niesuplementujących w grupie B stwierdzono znacznie niższy odsetek wyników wskazujących na niedobór witaminy D (44%) a wyższy suboptymalnych i optymalnych (odpowiednio 22 i 33%) niż w grupie A (odpowiednio 58%, 26% i 17%).

4.6 ZNAJOMOŚĆ REKOMENDACJI NA TEMAT SUPLEMENTACJI WITAMINY D₃

W grupie A 14 (22,6%) pacjentek deklarowało znajomość rekomendacji w zakresie suplementacji witaminą D₃ u kobiet z rakiem sutka przed włączeniem do badania. Wśród nich 10 (71,42%) deklarowało stosowanie suplementacji witaminą D₃. Jednak tylko 5 pacjentek (35,7%) miało oznaczone stężenie witaminy D w przeszłości. Średnia wartość stężenia witaminy D w grupie A wśród znających rekomendacje i stosujących suplementację witaminy D wyniosła 39,3

ng/ml, a wśród kobiet znających rekomendację, ale nie stosujących suplementacji witaminy D₃ średnie zmierzone stężenie wyniosło 24 ng/ml, natomiast średnie stężenie witaminy D u kobiet nie znających i nie stosujących suplementacji witaminą D₃ było niskie - 20,1 ng/ml (Rycina 24).

W badaniach drugiej serii, wykonanych latem, 39 (62,9%) pacjentek deklarowało znajomość rekomendacji w zakresie suplementacji witaminy D₃ u kobiet z rakiem sutka z których 92,3% (n=36) deklarowało stosowanie suplementacji witaminy D₃. Średnia wartość stężenia witaminy D w grupie badanych znających rekomendacje i stosujących suplementację witaminy D₃ wyniosła 38,1 ng/ml, a wśród kobiet znających rekomendację, ale nie stosujących suplementacji witaminy ta wartość wyniosła średnio 30,3 ng/ml, natomiast średnie stężenie witaminy D u kobiet nie znających i nie stosujących suplementacji witaminą D₃ wyniosło 32,4 ng/ml (Rycina 24).

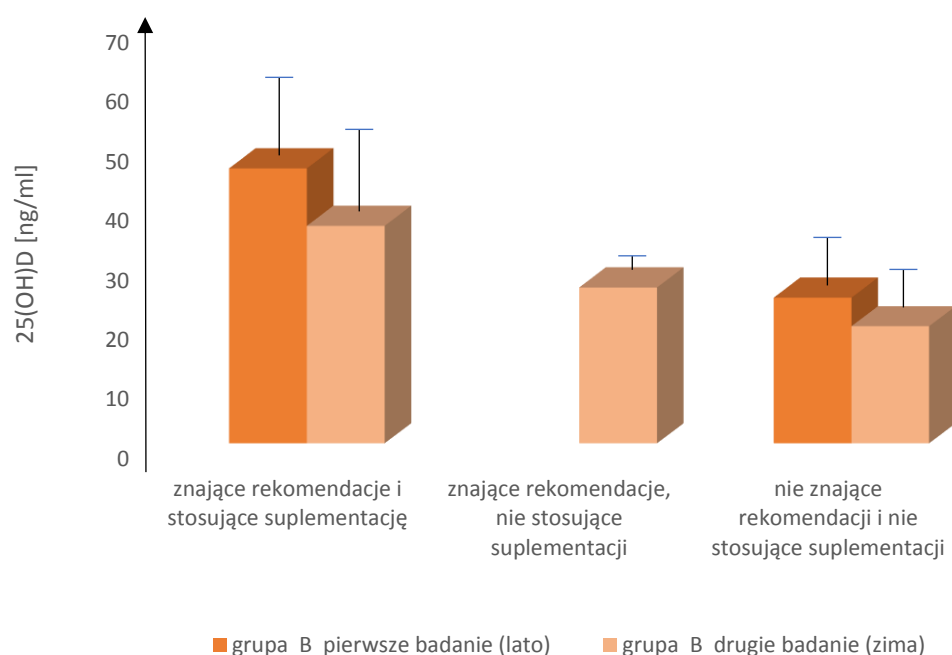


Rycina 24. Średnie stężenia witaminy 25(OH)D w surowicy w grupie badanej A w pierwszym i drugim badaniu w zależności od znajomości wytycznych suplementacji witaminą D₃ i jej stosowania.

W grupie B 4 pacjentki (12,5%) deklarowały znajomość rekomendacji w zakresie suplementacji witaminy D₃ u kobiet z rakiem sutka przed włączeniem do programu oznaczeń witaminy D (lato). Wszystkie pacjentki, które знаły ww. rekomendacje deklarowały stosowanie

suplementacji witaminą D₃, i trzy z nich (75%) miały zmierzone stężenie witaminy D w przeszłości. Średnia wartość stężenia witaminy D wśród pacjentek znających rekomendacje i stosujących suplementację witaminy D₃ wyniosła 46,2 ng/ml. Średnie stężenie witaminy D u kobiet nie znających rekomendacji i nie stosujących suplementacji witaminą D₃ wyniosło 24,6 ng/ml (Rycina 25).

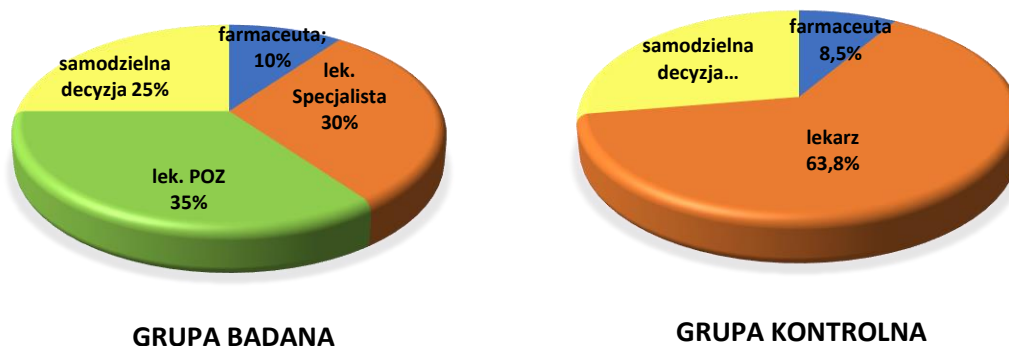
W kolejnej serii badań wykonanych zimą 18 (56,3%) pacjentek deklarowało znajomość rekomendacji w zakresie suplementacji witaminy D₃ u kobiet z rakiem sutka, z których 15 (83,3%) stosowało suplementację witaminy D₃. Średnia wartość stężenia witaminy D w grupie badanych znających rekomendacje i stosujących suplementację witaminy D₃ wyniosła 36,6 ng/ml, a wśród kobiet znających rekomendację, ale nie stosujących suplementacji witaminy D₃ ta wartość wyniosła średnio 26,3 ng/ml. Średnie stężenie witaminy D u kobiet nie znających i nie stosujących suplementacji witaminą D₃ wyniosło 19,8 ng/ml (Rycina 25).



Rycina 25. Średnie stężenia witaminy 25(OH)D w surowicy w grupie B uzyskane z pierwszego i drugiego badania w zależności od znajomości wytycznych suplementacji witaminą D₃ i jej stosowania.

Łącznie wśród pacjentek z grupy A i B tylko 15 (15,9%) kobiet miało przed włączeniem do tego badania oznaczone stężenie witaminy D. Również podobny odsetek kobiet z grupy kontrolnej miał wcześniej wykonane oznaczenia poziomu witaminy D (15,1%, n=14).

Pacjentkom z grupy badanej (łącznie A i B) przyjmowanie witaminy D rekomendowali lekarze POZ w 35% (n=14), lekarze specjaliści w 30%; (n=12) (w tym onkolodzy, neurologi, endokrynolodzy, ginekolodzy, diabetolodzy, interniści), farmaceuci w 10%; (n=4), oraz często chore samodzielnie podejmowały decyzję o rozpoczęciu suplementacji (25%; n=10) (Rycina 26).



Rycina 26. Źródło informacji na temat suplementacji witaminy D wśród pacjentek grupy badanej (A i B) przed włączeniem do programu oraz wśród pacjentek grupy kontrolnej.

W grupie kontrolnej przyjmowanie witaminy D najczęściej było rekomendowane przez lekarza (63,8%; n=30), farmaceutę (8,5%; n=4), oraz była to samodzielna decyzja pacjentek (27,7%; n=13) na podstawie informacji uzyskiwanych z przekazów medialnych oraz od znajomych (Rycina 26).

4.7 EKSPOZYCJA PACJENTEK NA PROMIENIOWANIE SŁONECZNE

W grupie A i B większość pacjentek deklarowała, że chroni się w lecie przed słońcem (odpowiednio 72% (n=45) i 73% (n=23)). W grupie kontrolnej odsetek pacjentek chroniących się przed słońcem był mniejszy – 61% (n=55), jednak nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic pomiędzy całą grupą po leczeniu raka sutka a grupą zdrowych ($p=0,27$, test χ^2). Większość pacjentek po leczeniu raka sutka chroniła się przed słońcem poprzez odpowiedni ubiór (73%), 27 % stosowało tylko lub dodatkowo kremy z filtrem. W grupie kontrolnej ponad połowa

(50,7%) pacjentek chroniących się przed słońcem stosowała kosmetyki z filtrami UV jako ochronę podstawową lub dodatkową.

Pacjentki grupy badanej (A+B), które nie chroniły się przed promieniowaniem słonecznym wg własnej oceny przebywały w lecie na słońcu średnio 151 +/- 101 minut dziennie, a pacjentki z grupy kontrolnej 108 +/- 101 minut dziennie ($p=0,13$).

Nie stwierdzono różnic w stężeniach witaminy D oznaczanej w lecie pomiędzy grupą pacjentek unikających słońca (stosujących odpowiedni ubiór lub kremy z filtrami UV; 34,9 +/- 13,9 ng/ml) oraz tych, które deklarowały, że nie stosują żadnych zabezpieczeń, a nawet chętnie się opalają (34,1 +/- 11,1 ng/ml).

4.8 NAWYKI ŻYWIENIOWE WPLYWAJĄCE NA STĘŻENIE WITAMINY D

Pacjentki po leczeniu raka sutka znacznie częściej spożywały pokarmy bogate w witaminę D jak ryby (węgorz, śledź, łosoś, dorsz) niż pacjentki grupy kontrolnej ($p=0,019$). Nie stwierdzono różnic w spożywaniu nabiału pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Szczegółowe informacje dotyczące diety z danych uzyskanych w zimie zostały zawarte w tabeli 6.

Tabela 6. Częstość spożywania produktów bogatych w witaminę D w grupach badanych i grupie kontrolnej.

		Grupa badana n=94	Grupa kontrolna n=93	p (Chi ²)
Ryby	< 1 x w tygodniu	29% (27)	30% (28)	p=0,84
	1-2 x w tygodniu	39% (37)	53% (49)	p=0,07
	Często > 2 x tydzień	32% (30)	17% (16)	p=0,019
Nabiał	< 1 x w tygodniu	13% (12)	10% (9)	p=0,50
	1-2 x w tygodniu	32% (30)	45% (42)	p=0,06
	Często > 2 x tydzień	55% (52)	45% (42)	p=0,14

Nie stwierdzono wpływu znajomości wyników stężeń witaminy D z pierwszej serii pomiarów (grupa badana) na korzystną zmianę nawyków żywieniowych ($p= 0,51563$ dla ryb).

Stwierdzono nawet zmianę niekorzystną, związaną z rzadszym spożywaniem nabiału ($p=0,014611$; test χ^2) (Tabela 7).

Tabela 7. Spożywanie produktów bogatych w witaminę D przed pierwszą i drugą serią oznaczeń witaminy D w grupie badanej.

	Rzadziej niż 1 x w tygodniu	1-2 x w tygodniu	Więcej niż 2 x w tygodniu
Ryby przed 1 serią pomiarów	28	37	29
Ryby przed 2 serią pomiarów	35	31	28
Nabiał przed 1 serią pomiarów	8	37	49
Nabiał przed 2 serią pomiarów	19	22	53

4.9 INFEKCJE

Niezależnie od pory roku pacjentki po leczonym raku sutka jak i osoby z grupy kontrolnej deklarowały, że chorują średnio 1 raz w roku (zakres od 0 do 8 razy). Średni czas trwania infekcji we wszystkich grupach był podobny 5- 6 dni.

4.10 WPLYW NOWOTWOROWEJ CHOROBY W RODZINIE NA SUPLEMENTACJĘ

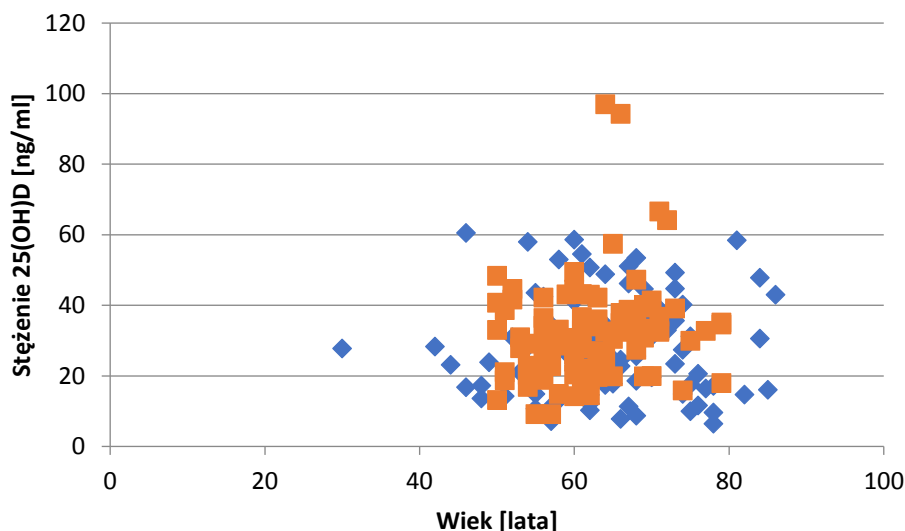
WITAMINY D₃

Pacjentki z obciążającym wywiadem rodzinnym - rak sutka u bliskich krewnych ($n=11$) nieco częściej stosowały suplementację witaminą D₃ - 64% z nich suplementowało tą witaminę przy pierwszym badaniu. Również stężenie witaminy D u tych pacjentek było nieco wyższe ($32,1 \pm 12,6$ ng/ml) niż w całej grupie pacjentek z rakiem sutka, ale różnica nie była znamienne statystycznie ($p<0,399$).

4.11 KORELACJE

4.11.1. Korelacja stężenia witaminy D z wiekiem

Zanalizowano zależność pomiędzy wiekiem pacjentek a stężeniem witaminy D oznaczonym przy pierwszym pomiarze. Nie stwierdzono żadnej statystycznie istotnej zależności zarówno w grupie badanej ($R=0,010$, $p=0,91$) jak i w grupie kontrolnej ($R=0,19$, $p=0,068$).



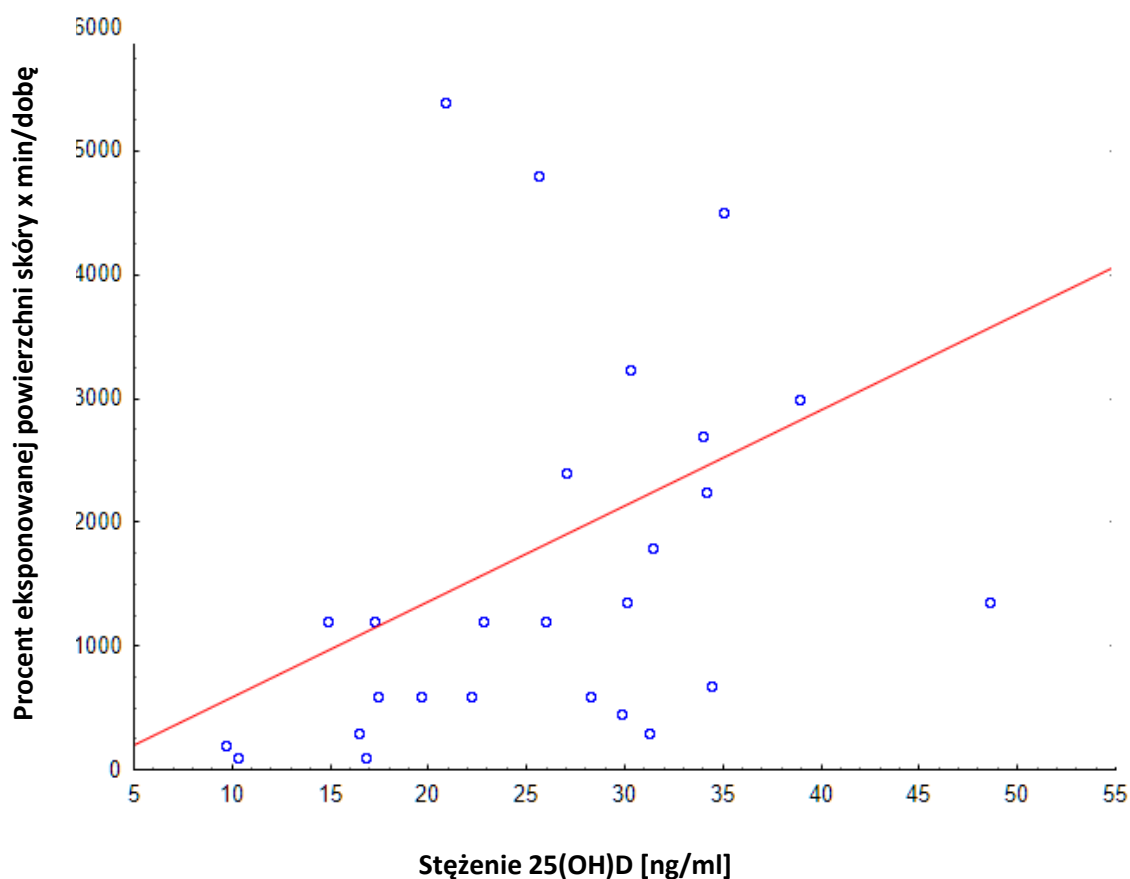
Rycina 27. Rozkład stężenia witaminy D w zależności od wieku w grupie badanej i w grupie kontrolnej. Grupa badana kropki niebieskie [■], grupa kontrolna kropki pomarańczowe [■].

4.11.2. Korelacja surowiczego stężenia witaminy D z dietą

W celu oceny wpływu diety na stężenie witaminy D zanalizowano dane uzyskane od wszystkich pacjentów w okresie zimowym, aby uniknąć zafałszowania wyników na skutek endogennej produkcji po ekspozycji na promieniowanie słoneczne. Korelacja stężenia witaminy D w zimie u wszystkich badanych w odniesieniu do sumarycznego spożycia pokarmów bogatych w witaminę D nie była statystycznie istotna ($R=0,041$; $p=0,585$). Dodatkowo oceniono korelację w grupie osób niesuplementujących witaminę D₃, aby pominąć wpływ suplementacji na stężenie witaminy D. Również w tym przypadku nie stwierdzono istotnej zależności ($R=0,004$, $p=0,969$).

4.11.3. Korelacja deklarowanego czasu opalania ze stężeniem witaminy D

W celu analizy wpływu światła słonecznego na stężenie witaminy D zanalizowano taką zależność u pacjentów niesuplementujących witaminę D₃ korelując iloczyn czasu i powierzchni skóry ekspozowanej na słońce ze stężeniem witaminy D uzyskanym z badań w miesiącach letnich. Uzyskano wynik statystycznie znamiennej $R=0,584$, $p=0,0014$.



28. Wykres zależności iloczynu czasu i powierzchni skóry ekspozowanej na promieniowanie słoneczne od stężenia witaminy D.

4.11.4. Korelacja stężenia witaminy D z częstością infekcji

Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem witaminy D a częstością zachorowań ani czasem trwania choroby, zarówno w grupie pacjentek po leczeniu raka sutka (odpowiednio $R=0,091$; $p=0,39$ i $R=0,036$; $p=0,76$), w grupie kontrolnej (odpowiednio $R=0,03$; $p=0,77$ i $R=0,071$; $p=0,5$) oraz analizując łącznie wszystkich badanych (odpowiednio $R=0,004$; $p=0,96$ i $R=0,077$; $p=0,32$)

5. DYSKUSJA

Rak gruczołu piersiowego należy do grupy nowotworów złośliwych o charakterze polietiologicznym. Karcynogenezę gruczołu piersiowego, mogą zainicjować czynniki środowiskowe, które zaburzają molekularne ścieżki sygnałowe. [77, 136, 137] Jako że mniej niż 10% przypadków raka sutka ma podłoże genetyczne, czynniki środowiskowe odgrywają kluczową rolę w genezie tego typu nowotworu. Do głównych czynników ryzyka raka sutka należą: wczesna pierwsza miesiączka przed 14 r.ż., wysoki wzrost i masa ciała, późna pierwsza donoszona ciąża - po 35 r.ż. (first full-term pregnancy, FFTP), późna menopauza - po 54 r.ż., oraz nierództwo.[138, 139] Onkogenny wpływ terapii hormonalnej dotyczy zarówno młodych kobiet przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne dłużej niż 5 lat, jak również kobiet po menopauzie stosujących hormonalną terapię zastępczą przez okres minimum 10 lat oraz substytucyjne podawanie estrogenów. Do czynników ryzyka bezpośrednio związanych ze stylem życia należy: otyłość, stosowanie diety bogatotłuszczowej i z niską zawartością błonnika, palenie tytoniu, stosowanie używek, w szczególności alkoholu, a także niska aktywność fizyczna.[138, 139, 140, 141]

Na poziomie molekularnym jądrowe receptory, aktywowane przez hormony steroidowe: estrogeny i progesteron, są czynnikami odgrywającymi kluczową rolę w rozwoju gruczołów piersiowych i pełnią złożoną rolę w etiologii raka sutka. Receptory te stanowią ważny cel zarówno w działaniach prewencyjnych jak i w leczeniu raka sutka. Innym receptorem, którego wysoką ekspresję wykazano w tkance sutka jest receptor witaminy D (VDR), aktywowany przez 1,25-dihydroksywitaminę D. Aktywacja tego receptora moduluje fenotyp komórek gruczołu piersiowego zarówno w hodowlach prawidłowych komórek jak i w liniach komórek nowotworowych.

W trakcie badań nad mechanizmem działania witaminy D w chorobach nowotworowych wykazano, że zarówno *in vitro* jak i *in vivo* 1,25(OH)₂D₃, wskazuje protekcyjne działanie w patogenezie raka sutka poprzez działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne. Dzięki obecności 1- α -hydroksylazy w komórkach gruczołu piersiowego, możliwe jest tworzenie tego aktywnego

metabolitu witaminy D (1,25dihydroksywitaminy D) *in situ*, sugeruje się również działanie autokrynne witaminy D.

Badania wpływu diety bogatej lub ubogiej w witaminę D, jak i suplementacji farmakologicznej witaminą D w modelach zwierzęcych raka sutka wykazały, że pobudzenie receptora VDR ma działanie hamujące na rozwój nowotworu sutka. Delecja genu kodującego VDR u myszy nasila rozwój hiperplazji oraz hormono - niezależnych guzów w odpowiedzi na chemiczne karcynogeny, jak również promuje proces nowotworzenia w gruczole piersiowym. Wskazuje to, że VDR aktywowany przez 1,25(OH)₂D₃ działa jako czynnik hamujący rozwój nowotworów w komórkach gruczołu piersiowego.[142] Istnieją również kliniczne doniesienia, że ryzyko ludzkiego raka sutka oraz jego progresja jest powiązana ze stężeniem witaminy D.

Niedobór witaminy D wśród pacjentek z rakiem sutka, był wielokrotnie wykazywany w wielu badaniach klinicznych. Hipowitaminozę D uznaje się coraz częściej za jeden z czynników ryzyka raka sutka, a stężenie witaminy D w osoczu/surowicy zyskuje też rolę czynnika prognostycznego.[77] Wyniki metaanaliz dowodzą, że wyższe surowicze stężenie 25(OH)D₃ oznaczane po zdiagnozowaniu raka sutka koreluje z niższą śmiertelnością z powodu raka sutka. W szczególności pacjentki o stężeniu 25(OH)D₃ w najwyższym kwartylu miały o około połowę niższy wskaźnik śmiertelności w porównaniu do tych ze stężeniem witaminy D w najniższym kwartylu.[143] Istnieje też wiele doniesień na temat powiązań pomiędzy surowiczym stężeniem witaminy D, a osiąganymi rezultatami klinicznymi leczenia raka sutka.[144] Niskie stężenie witaminy D można powiązać z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu w chwili zdiagnozowania i większym ryzykiem nawrotu choroby.[145]

Większość środowiskowych czynników ryzyka raka sutka, takich jak ekspozycja na promieniowanie słoneczne, wskaźnik masy ciała, aktywność fizyczna, stosunkowo łatwo podlegają korzystnym modyfikacjom, które wydłużają przeżycie kobiet po leczonym raku sutka. Opisana powyżej zależność pomiędzy stężeniem witaminy D, a ryzykiem raka sutka czy wznowy, oraz sukcesem terapeutycznym w przypadku wystąpienia tej choroby wskazuje na konieczność zwrócenia uwagi na ten czynnik. Można go w świadomy sposób łatwo modulować przez czas spędzany na słońcu i dietę, a także jest możliwość terapeutycznego podawania tej witaminy w preparatach farmakopealnych.[142]

5.1 STĘŻENIE WITAMINY D U PACJENEK PO LECZONYM RAKU SUTKA

Poziom witaminy D w populacji jest zależny od wielu czynników, w tym od szerokości geograficznej oraz od pochodzenia etnicznego. Aktualnie toczy się ożywiona dyskusja nad pożądanym stężeniem 25(OH)D w surowicy. Wyniki przeprowadzonych badań klinicznych sugerują, że pożądaną surowiczą stężenie 25(OH)D mieści się pomiędzy 30 a 60 ng/ml (75-150 nmol/l). Niedobór witaminy D (surowicze stężenie 25(OH)D < 20 ng/ml lub <50 nmol/l) wśród populacji europejskiej jest zjawiskiem powszechnie występującym. Według doniesień European Calcified Tissue Society występuje u 30-40% populacji Europy Środkowej, Wschodniej i Południowo-Wschodniej.[146] Wyjątkiem są Skandynawowie, u których niedobory witaminy D stwierdza się u mniej niż 20% populacji. Wpływ na to ma wysoki odsetek osób suplementujących preparaty witaminy D oraz częste spożycie ryb morskich. Wśród populacji kanadyjskiej średni poziom 25(OH)D wynosił 28,15 ng/ml, w chińskiej 19,4 ng/ml. Wśród populacji zamieszkujących Afrykę i Środkowy Wschód niedobór (zazwyczaj definiowany jako stężenie 25(OH)D poniżej 20 ng/ml) wynosił od 5% do 80% badanej populacji. Wyniki niektórych badań wskazują, że mieszkańcy północnej części Europy Środkowej są bardziej narażeni na deficyty witaminy D niż przedstawiają to szacunki European Calcified Tissue Society. Wg Płudowskiego, który przebadał 5775 Polaków, średnie stężenie 25(OH)D wyniosło 18,0 +/- 9,6 ng/ml, przy czym znacząca większość (65,8%) badanych miało stężenie witaminy D poniżej 20 ng/ml, wskazujące na niedobór witaminy D, 24,1% wykazywało poziom suboptymalny (20-30 ng/ml) i tylko 9,1% miało stężenie 25(OH)D w zakresie wartości zalecanych (30-50 ng/ml).[147] W podobnych badaniach populacji niemieckiej wyniki były bardzo zbliżone do tych uzyskanych w Polsce. Średni poziom 25(OH)D wyniósł 18,24 ng/ml, a 61,6% badanych miało stężenie poniżej 20 ng/ml.[148]

Należy jednak pamiętać, że surowicze stężenie 25(OH)D powyżej 20 ng/ml, zabezpiecza prawidłowe funkcjonowanie gospodarki wapniowo - fosforanowej i metabolizmu kostnego, ale dopiero stężenia powyżej 30 ng/ml zapewniają optymalną ilość witaminy D dla innych funkcji organizmu, w tym dla właściwego działania mechanizmów odpornościowych, jak również dla uzyskania działania protekcyjnego w kontekście chorób nowotworowych.[149] Szacuje się, że utrzymanie średniego surowiczego stężenia witaminy D w zakresie 40-60 ng/ml powinno zmniejszyć o 75% liczbę zgonów z powodu raka sutka i jelita grubego w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie.[150]

Wiele badań wskazuje na wpływ niedoboru witaminy D na ryzyko raka sutka. Między innymi Krusińska i wsp. badali zależność pomiędzy stężeniem wybranych witamin i minerałów a ryzykiem raka sutka wśród 420 Polek pochodzących z północno - wschodniej Polski. Analizie

poddano badane składniki pochodzące zarówno z diety jak i z suplementacji. Autorzy wykazali, że surowiczy poziom $25(\text{OH})\text{D} \geq 24.6$ ng/ml był związany z 67% obniżeniem ryzyka raka sutka.[151] Zależność pomiędzy surowiczym stężeniem $25(\text{OH})\text{D}_3$ a redukcją ryzyka raka sutka u kobiet po menopauzie oszacowano na 30% gdy surowicze stężenie witaminy D wynosiło 38,0 ng/ml (badanie 3386 kobiet, Sister Cohort Study)[76] oraz 65% (przy stężeniu 40,0 ng/ml w analizie zbiorczej badań z randomizacją i prospektywnych badań kohortowych w których uczestniczyło łącznie 2304 kobiet).[152]

Niedobór witaminy D ma również wpływ na śmiertelność z powodu raka sutka. Mohr i wsp. przy użyciu metaanalizy wykazali, że wyższe surowicze stężenie $25(\text{OH})\text{D}$ było powiązane z niższym odsetkiem śmiertelności u pacjentek z rakiem sutka. Dla pacjentek z grupy o najwyższym stężeniu $25(\text{OH})\text{D}$ (górny kwantyl) wykazano o około połowę niższy odsetek śmiertelności w porównaniu do kobiet ze stężeniem w najniższym kwantylu.[143] Dodatkowo metaanaliza wykonana przez Shekarriz-Fourmani i Khodaie wykazała, że niedobór witaminy D znacznie częściej występuje u pacjentów ze zmianami neoplastycznymi niż w porównywalnej wiekowo zdrowej populacji. W zależności od badań, niedobór witaminy D w populacji chorych na raka sutka występuje u od 23% do 95,6% pacjentek.[153]

W obecnej pracy niedobór definiowany jako stężenie $25(\text{OH})\text{D}$ poniżej 20 ng/ml, wykazano przy pierwszym badaniu u 33,87% pacjentek w grupie A oraz u 33,33% pacjentek z grupy B. Z kolei stężenie suboptymalne podczas pierwszego badania występowało odpowiednio w 25,81% pacjentek grupy A i 24,24% pacjentek grupy B. W grupie kontrolnej odsetek pacjentów z niedoborem witaminy D (<20 ng/ml) wyniósł 19,35%, a stężenie suboptymalne $25(\text{OH})\text{D}$ obserwowano u 27,96% badanych.

Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają wnioski wysunięte przez Shekarriz-Fourmani i Khodaie o wyższej prevalencji niedoborów witaminy D w populacji osób z chorobami nowotworowymi. Podobne rezultaty uzyskano w badaniu przeprowadzonym na grupie szwedzkich pacjentek leczonych z powodu raka sutka. Niedobór obserwowano u 18% badanej grupy, a poziom suboptymalny (20-30 ng/ml) stwierdzono u 21% badanych. Podobnie jak w moich badaniach, zaobserwowano sezonowość zmian stężenia witaminy D.[154] Badania wykonane przez Andersena i wsp. w grupie 553 pacjentek zamieszkujących Stany Zjednoczone, po leczonym raku sutka również wykazały niedobór witaminy D u 30% badanych [155]. Z kolei wg badań przeprowadzonych przez Apoe i wsp. wśród Amerykanek po leczonym raku sutka wskazują, że niedobór witaminy D definiowany jako stężenie poniżej 30 ng/ml obserwowano w 62% przypadków.[136] Mechado i wsp. przeprowadzili badania 209 brazylijskich

kobiet po leczonym raku sutka - u 26,2% z nich stwierdzono niedobór witaminy D a wartość suboptymalną wykazano u 55,6% badanych.[156]

5.2 WPŁYW PÓR ROKU I EKSPOZYCJI NA ŚWIATŁO SŁONECZNE NA STĘŻENIE WITAMINY D W SUROWICY W BADANYCH GRUPACH PACJENTEK

Istnieją trzy podstawowe źródła witaminy D, do których zaliczamy syntezę endogenną po ekspozycji na promieniowanie słoneczne, witaminę D pochodzącą z diety oraz pochodzącą z suplementów. Endogenna produkcja stymulowana promieniowaniem słonecznym jest podstawowym źródłem witaminy D i jest determinowana zarówno przez czynniki geograficzne (szerokość geograficzną, warstwę ozonową, zachmurzenie, albedo), porę roku jak i czynniki osobnicze (genetyczne, w tym fototyp skóry, ilość czasu spędzanego poza pomieszczeniami, powierzchnia ciała ekspozowanego na promieniowanie słoneczne, wiek, rodzaj odzieży itp.).[157, 158, 159] Przyjmuje się, że ponad 90% zapotrzebowania na witaminę D jest pokrywane w lecie dzięki ekspozycji skóry na promieniowanie UVB. [160, 161]

Fohner i wsp. stwierdzili zmienność sezonową stężenia witaminy D wśród pacjentów zamieszkujących południowo-zachodnią Alaskę. Przebadali 743 pacjentów, których podzielono na 4 grupy. W grupie 1 stężenie witaminy D oznaczono w sierpniu, wrześniu lub w październiku, w grupie 2 w listopadzie, grudniu lub styczniu, w grupie 3 w lutym, marcu i kwietniu a w grupie 4 w maju, czerwcu i lipcu. Najwyższe stężenia 25(OH)D obserwowano w miesiącach sierpień - październik, a najniższe od lutego do kwietnia, następnie obserwowano wzrost stężeń do lipca. Po okresie najwyższych wartości następował spadek w miesiącach listopad - styczeń.[162] Do podobnych wniosków doszli Fayet-Moore i wsp. którzy badając zależność stężenia witaminy D od pory roku, fototypu skóry i powierzchni ciała ekspozowanej na promieniowanie słoneczne wielowymiarową regresją liniową wykazali, że czynniki te były głównymi predyktorami stężenia 25(OH)D pod koniec lata. Estebanez na podstawie metaanalizy 69 badań wysunął wniosek, że osoby z niskim stężeniem witaminy D w lecie będą miały również niski jej poziom w pozostałym okresie roku. Podobny wniosek przedstawił też Fayet-Moore i wsp.[81, 163]

W moich badaniach również stwierdziłam sezonowe zmiany stężeń witaminy D u pacjentek po leczeniu raka sutka. Po wykluczeniu z analizy pacjentek, które deklarowały suplementację witaminą D₃, w badaniach pierwszorazowych wykonanych w zimie odnotowano większy odsetek chorych, u których stężenia witaminy 25(OH)D wynosiły poniżej 20 ng/ml w

porównaniu do pierwszorazowych badań wykonanych latem (odpowiednio 58% i 44%). Natomiast w wynikach z pierwszego badania w lecie, wśród pacjentek niesuplementujących stwierdzono znacznie wyższy odsetek wyników stężeń witaminy D w zakresie prawidłowym (33%) niż wśród niesuplementujących witaminę D₃ pacjentek badanych pierwszy raz w zimie (16%). Z kolei w drugim badaniu w lecie, liczba pacjentek niesuplementujących, badanych wcześniej w zimie z jawnym niedoborem witaminy D (<20 ng/ml) zmniejszyła się o połowę (do 28,6%). Jednocześnie prawie trzykrotnie wzrosła liczba pacjentek grupy A niesuplementujących witaminę D₃, u których surowicze stężenie 25(OH)D było na poziomie optymalnym czyli >30 ng/ml (z 16,12% w badaniu przeprowadzonym zimą do 42,86% w badaniu przeprowadzonym latem). W okresie letnim kiedy osoby z grupy B zostały włączone do badania, niedobór witaminy D stwierdzono u 44,44% osób niesuplementujących tej witaminy, poziom suboptymalny u co piątej badanej (22,22%) oraz poziom optymalny u co trzeciej badanej (33,33%). W grupie B w okresie zimowym żadna z pacjentek nie stosujących suplementów witaminy D₃ nie uzyskała optymalnego surowiczego stężenia 25(OH)D powyżej 30 ng/ml.

Znacznie wyższy odsetek osób z optymalnym i suboptymalnym stężeniem witaminy D wśród pacjentek grupy A niesuplementujących witaminy D₃ w badaniu przeprowadzonym w okresie letnim (2 pobranie) w stosunku do odsetka osób w tej grupie z badania przeprowadzonego zimą (71,43% vs. 41,92%), uwarunkowany jest przede wszystkim wpływem promieniowania słonecznego i syntezą skórą witaminy D. I odwrotnie, większy odsetek pacjentek z deficytem witaminy D w okresie zimowym uwarunkowany jest niewielką ekspozycją na światło słoneczne spowodowaną ubiorem zakrywającym prawie całe ciało i brakiem odpowiedniego promieniowania słonecznego (UVB). Łącznie te przyczyny powodują znaczne ograniczenie skórnej syntezy witaminy D i w konsekwencji jej niedobór.

Podobną sezonowość zmian stężeń witaminy D u pacjentek po leczonym raku sutka wykazano w wielu badaniach. Acevedo i wsp. stwierdzili, że stężenia 25(OH)D u kobiet z rakiem sutka, latem były znacząco wyższe w porównaniu do oznaczeń wykonywanych zimą ($p=0,0322$).[129] Eliassen i wsp. również wykazali zależność stężenia 25(OH)D u pacjentek z rakiem sutka, od pory roku w której wykonywany był pomiar.[164] Badanie stężenia witaminy D w surowicy 1940 kobiet przeprowadzone przez Shi i wsp. podczas pierwszych 6 miesięcy po zdiagnozowaniu raka sutka wykazało wyższe poziomy witaminy D latem i jesienią.[145]

W szerokości geograficznej Polski (pomiędzy 30 a 55 stopniem szerokości geograficznej) około półgodzinna ekspozycja na promieniowanie słoneczne w okresie okołopołudniowym podczas lata, trzy razy w tygodniu przy założeniu odzieży z odkrytymi kończynami jest wystarczająca, aby uzyskać surowicze stężenie 25(OH)D równe lub wyższe 20 ng/ml (50 nmol/l)

u 90% białej populacji. Przy dłuższej lub częstszej ekspozycji można osiągnąć pożądany poziom tj. pomiędzy 30 ng/ml a 60 ng/ml. Wyniki badań przeprowadzonych przez Kanatani i wsp. w Japonii wykazały, że wydłużenie czasu ekspozycji na słońce o 15 minut przez 1 do 2 dni na tydzień skutkowało podniesieniem stężenia 25(OH)D o 0,5 ng/ml w zimie oraz o około 1 ng/ml w pozostałych porach roku. Pod koniec lata (we wrześniu), w grupie deklarującej co najmniej 15 minutową ekspozycję na słońce przynajmniej 5 razy w tygodniu 61,5% osób uzyskało surowicze stężenie witaminy D powyżej 20 ng/ml, podczas gdy u osób które deklarowały krótszy czas ekspozycji na promieniowanie słoneczne tylko 34,6% uzyskało pożądany poziom witaminy D.[165]

W Polsce od października do marca natężenie fali promieniowania słonecznego (UVB) niezbędnej do efektywnej syntezy witaminy D w skórze (255-330 nm z maksimum ok. 295 nm), docierającej do powierzchni ziemi jest osłabione wydłużoną drogą przez atmosferę. W efekcie w tym okresie roku synteza skórna witaminy D jest słabsza i niewystarczająca do pokrycia zapotrzebowania człowieka. Krzyścin i wsp. w 2010 roku przeprowadzili badania populacji polskiej, u osób pracujących w pomieszczeniach i przebywających poza budynkami 1h od poniedziałku do piątku (w godzinach 7.30-8.00 i 15.00-15.30) i 1h około południa w weekendy - w okresie zimowym (16 października do 14 kwietnia) i 2h w okresie letnim. W szerokości geograficznej w której przeprowadzono badania (52°N, 21°E) osoba w pozycji stojącej bez nakrycia głowy ekspozuje około 10% powierzchni ciała (twarz, ramiona i ręce), co zapewnia od 5% do 50% dziennej dawki promieniowania słonecznego zabezpieczającą właściwy poziom witaminy D (>30 ng/ml; 75 nmol/l). Z badań tych wynika, że opisane warunki (czas i powierzchnia skóry ekspozowana na promieniowanie słoneczne) są niewystarczające dla osiągnięcia pożądanego stężenia witaminy D w surowicy nawet w miesiącach letnich. Zwiększenie ekspozowanej na promieniowanie UV powierzchni ciała lub wydłużenie czasu nasłonecznienia (2h około południa w okresie letnim w ciągu całego tygodnia) powodowało, że badane osoby osiągały surowicze stężenie witaminy D na pożądanym poziomie w miesiącach od czerwca do września. Jednocześnie badacze określili, że ekspozując 25% powierzchni ciała w opisanych powyżej zakresach czasowych Polacy mogą otrzymać dawkę UV równoważną dobowej suplementacji 1000 IU witaminy D w czerwcu i w lipcu. Poza tymi miesiącami od kwietnia do września konieczny jest dłuższy czas ekspozycji na słońce.[159] Podobne wyniki zaprezentował O'Sullivan i wsp. w populacji Irlandczyków. W badaniu oceniono stężenie 25(OH)D u 92 pacjentów z chorobą Crohna będących w remisji otrzymujących 2000 IU witaminy D na dobę lub placebo przez okres 1 roku, badania wykonywano 4 krotnie. Na podstawie miejsca zamieszkania, określono dzienną dawkę promieniowania słonecznego UVB o długości fali zdolnej indukować

syntezę skórą witaminy D (D-UVB). Podobnie jak Krzyściń i wsp. stwierdzono znaczące różnice w stężeniu witaminy D zależne od pory roku u osób zamieszkujących wyższe i średnie szerokości geograficzne niezależnie od suplementacji wysokimi dawkami witaminy D.[166]

Niskie stężenie witaminy D związane z niską ekspozycją na promieniowanie UVB, koreluje z większą zachorowalnością na raka sutka. Ta odwrotna korelacja stężenia witaminy D z ryzykiem rozwoju raka sutka jest wykazywana w licznych badaniach przeprowadzanych w ostatnich latach.[69, 76, 81, 123, 127, 152, 167, 168, 169, 170, 171, 172]. Zapewne duże znaczenie w tym zakresie ma zmiana stylu życia dokonująca się w ostatnich dekadach. Zmniejsza się ekspozycja ludzi na promieniowanie słoneczne, które odgrywa zasadniczą rolę w izomeryzacji 7-dehydrocholesterolu do witaminy D.[166, 173] Odpowiedzialne są za tą sytuację niespójne informacje dotyczące wpływu ekspozycji światła słonecznego na ludzkie zdrowie. Wg powszechnie panującej opinii „nadmierna ekspozycja” (dla której brak jest definicji) na słońce jest czynnikiem wywołującym nowotwory skóry, a działanie prozdrowotne nasłonecznienia ogranicza się w powszechnej opinii do wpływu na gospodarkę kostną. Doprowadziło to do sytuacji w której większość osób wierzy, iż należy unikać słońca, i nadmiernie osłaniania ciała lub stosuje kosmetyki z filtrami.[174]

Wyniki moich badań wskazują, że pacjentki zarówno z grupy A jak i B w większości deklarowały stosowanie ochrony przeciwsłonecznej (odpowiednio 72% (n=45) i 73% (n=23)): u dwóch trzecich w postaci ubioru zakrywającego ciało, a pozostałe stosowały dodatkowo lub wyłącznie kremy z filtrami ochronnymi. Pomimo takiej ochrony, nie stwierdzono różnic w stężeniach witaminy D oznaczanej latem pomiędzy grupą pacjentek deklarujących brak stosowania ochrony przeciwsłonecznej lub opalających się (34,1 +/- 11,1 ng/ml) oraz tych które unikały słońca (stosując odpowiedni ubiór lub kremy z filtrami UV; 34,9 +/- 13,9 ng/ml). Jednocześnie wykazano istotną statystycznie zależność ($R=0,584$, $p=0,0014$) pomiędzy czasem i powierzchnią skóry eksponowanej na promieniowanie słoneczne u pacjentów niesuplementujących witaminę D₃ a stężeniem witaminy D oznaczanej w lecie.

Z powyższych danych wynika, iż promieniowanie słoneczne jest istotnym czynnikiem determinującym stężenie 25(OH)D w badanej przez mnie grupie pacjentek po leczeniu raka sutka. Należy jednak zwrócić uwagę na nieefektywną syntezę skórą poza okresem późnowiosennym i letnim oraz osobniczą zmienność związaną m.in. z nasileniem pigmentacji skóry oraz dość powszechne stosowanie kosmetyków z filtrami UV. Dlatego nawet w okresie letnim u pacjentek lubiących się opalać może występować niedobór witaminy D (jak u 9 badanych przez mnie pacjentek łącznie z grup A i B).

Fayet-Moore i wsp. przeprowadzili badania grupy zdrowych pracowników biurowych mieszkających w Sydney, gdzie synteza skórna witaminy D możliwa jest zarówno latem jak i w miesiącach zimowych z uwagi na położenie geograficzne i odpowiednie wskaźniki promieniowania UV. Wyższe stężenia 25(OH)D odnotowano u osób, które deklarowały częste spędzanie czasu w warunkach ekspozycji na promieniowanie słoneczne poza okresem urlopowym. Co ciekawe osoby deklarujące stosowanie „zazwyczaj” kremów przeciwsłonecznych miały wyższe średnie stężenie 25(OH)D (28,8 +/- 11,2 ng/ml) w porównaniu do osób ich nie używających (21,6 +/- 8 ng/ml; $p < 0,003$). Związane było to z faktem, iż osoby używające kremów przeciwsłonecznych spędzały średnio więcej czasu na aktywności fizycznej poza budynkami.[163]

Badania te mogą częściowo wyjaśniać uzyskane przeze mnie wyniki, w których osoby chroniące się przed promieniowaniem słonecznym miały stężenia witaminy D porównywalne do tych niestosujących takiej ochrony. Jest to efektem dłuższego ogólnie spędzanego czasu na świeżym powietrzu przez tą grupę osób. Równocześnie należy wziąć pod uwagę jaki procent powierzchni ciała został zabezpieczony kremem z filtrem UV, jaki był faktor SPF oraz jak grubą warstwą kremu została posmarowana skóra. Przy czym wyniki badań Matsouka i wsp. wykonane na grupie osób rasy kaukaskiej wskazują, że regularne stosowanie kremu z niskim faktorem (SPF 8) wpływało na uzyskiwanie stężeń 25(OH)D znacząco niższych w stosunku do niezabezpieczającej się grupy kontrolnej.[175] Wykazano również zależność pomiędzy wielkością powierzchni eksponowanej na promieniowanie UVB oraz grubością warstwy kremu z filtrem UV a syntezą witaminy D w skórze. Poziom witaminy D znacząco wzrastał u osób odsłaniających tułów, kończyny dolne lub całe ciało oraz gdy warstwa kremu przeciwsłonecznego nie przekraczała 2 mg/cm². U badanych odsłaniających głowę, szyję i ramiona różnica nie była istotna. Aplikowanie kremu przeciwsłonecznego na całe ciało całkowicie blokowało syntezę witaminy D.[176]

Korzystanie z naświetlania słonecznego, wpływa korzystnie na status witaminy D u osób nie stosujących suplementacji ale również i osób suplementujących. Jednak dostosowywanie ekspozycji na promieniowanie słoneczne tak by uzyskać pożądane stężenie 25(OH)D, przy należytej dbałości o unikanie poparzeń słonecznych i profilaktykę raka skóry może być trudne. Dodatkowo należy brać pod uwagę jakość powietrza i stopień jego zanieczyszczenia. Czynniki takie jak pyły zawieszone składające się z cząstek stałych, ozon, oraz dwutlenek siarki są elementami, które efektywnie absorbują promieniowanie UVB, przez co zmniejszają skórą syntezę witaminy D.[177] Dlatego, szczególnie w Polsce, ze względu na zmiany sezonowe w intensywności promieniowania UVB, niestabilność intensywności w lecie związaną z warunkami

pogodowymi i zanieczyszczeniem powietrza oraz dość powszechne stosowanie ochrony przed słońcem należy zalecać monitorowanie stężenia witaminy D u wszystkich pacjentów, nie tylko po leczeniu onkologicznym, zarówno zimą jak i latem.

5.3 WPŁYW DIETY NA STĘŻENIE WITAMINY D

Znaczącym źródłem witaminy D jest dieta. Do produktów bogatych w witaminę D należą przede wszystkim produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego, m.in. tłuste ryby, oleje rybne, jaja. Jednak wielu autorów uważa, że ilość naturalnie znajdującej się w produktach witaminy D, jest za mała w stosunku do zapotrzebowania i typowa dieta ma niewielki wpływ na osoczowe stężenia witaminy D.[178, 179, 180, 181]

Dlatego w wielu państwach, w tym w krajach Unii Europejskiej, ale także w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Jordanii czy Indiach produkty spożywcze, najczęściej mleko, wzbogacane są witaminą D.[149,182] Wyjątkiem są Niemcy, w których dodawanie witaminy D jest ograniczone do margaryn. Z kolei w Finlandii wprowadzono fortyfikację zarówno mleka jak i margaryn do smarowania pieczywa.[181] Określone przez polski Instytut Żywności i Żywienia Człowieka zapotrzebowanie na witaminę D u osoby dorosłej wynosi 15 µg/dobę (600 IU). Szacuje się, iż z diety pochodzi od 100 do 200 IU witaminy D na dobę (2,5–5,0 µg/dobę), co stanowi 15–30% dobowego zapotrzebowania.[183, 184] Analiza dostępnego piśmiennictwa z lat 2012–2016 dotycząca spożycia witaminy D w wybranych grupach ludności polskiej wykazała w każdym przypadku jej niewystarczającą konsumpcję.[185, 186, 187, 188, 189, 190] W Polsce dobrym źródłem witaminy D są obligatoryjnie wzbogacane tą witaminą tłuszcze do smarowania (z wyjątkiem masła, które ją naturalnie zawiera).[191] W ostatnich latach widoczne jest rosnące zapotrzebowanie na żywność o obniżonej kaloryczności. Obniżanie zawartości tłuszczu, pociąga za sobą usuwanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, w tym witaminy D.[173] Wyniki badań populacji zamieszkującej Europę Środkową opracowane przez Jenab i wsp. wykazały, że średnie dobowe spożycie witaminy D w grupie kobiet w wieku 35-74 lat wynosi 3,4 µg (136 IU), [192] co jest zbliżone z wynikami opracowanymi przez Novakovića i wsp. którzy określili, że średnie dobowe spożycie witaminy D w pokarmach przez dorosłe mieszkanki Europy Środkowo - Wschodniej wynosi 3 µg.[193] Z badań Haafa i wsp. wynika, że dobowe spożycie witaminy D u osób w podeszłym wieku zamieszkujących Niderlandy wynosi średnio 4,0 +/- 1,9 µg, i witamina D przyjmowana z pożywieniem nie miała wpływu na surowicze stężenie 25(OH)D w przebadanej populacji.[194] Badania populacji australijskiej wykonane przez Fayest-Moore i wsp. wykazały,

że spożywanie tłustych ryb było jednym z głównych predyktorów stężenia 25(OH)D pod koniec zimy.[163]

Jak wynika z moich badań, w grupie A w zimie (pierwsze pobranie) wśród pacjentek, u których jedynym źródłem witaminy D była dieta (nie przyjmowały farmakologicznej witaminy D, a działanie światła słonecznego było nieefektywne dla endogennej produkcji witaminy D), niedobór witaminy D (<20 ng/ml) stwierdzono u 58,06% badanych. Poziom suboptymalny (20-30 ng/ml) uzyskało 25,81% badanych. Na podstawie badań ankietowych oceniono spożycie pokarmów bogatych w witaminę D tj. ryb (węgorza, śledzia, łososia, dorsza), mleka i jego przetworów, oleju roślinnego oraz wątróbki w badanych grupach. Zaskakujący jest fakt, że w grupie pacjentek badanych w zimie odnotowano istotnie niższy poziom witaminy D u kobiet spożywających mleko 1-2 razy na tydzień w porównaniu do tych, które mleka nie spożywały w ogóle lub sporadycznie (odpowiednio 23,10 i 30,74 ng/ml, $p=0,0145$). Z kolei w grupie badanej pierwszy raz w lecie, pacjentki spożywające jajka 1-2 razy na tydzień miały wyższe wartości witaminy D w porównaniu do tych, które jajek nie jadły lub jadły je sporadycznie (odpowiednio 29,43 i 17,40 ng/ml). Powyższa różnica była na granicy istotności ($p=0,0522$). Żaden z pozostałych, analizowanych składników diety nie wpływał istotnie statystycznie na poziom witaminy D u badanych pacjentek.

Dodatkowo zanalizowano wpływ diety na stężenia witaminy D, przy kolejnej wizycie, po edukacji pacjentek. Żadna z kobiet ($n=6$), które nie zdecydowały się na suplementację farmakologiczną, tylko wzbogacenie diety naturalnymi produktami bogatymi w witaminę D w badaniu przeprowadzonym zimą nie uzyskała wyniku > 30 ng/ml. Ponadto w tej podgrupie stwierdzono wzrost odsetka osób z poziomem suboptymalnym witaminy D, w stosunku do badania pierwszorazowego w lecie (odpowiednio 75% i 22,22%).

Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają opisane powyżej badania, że zaopatrzenie organizmu w szerokości geograficznej Polski we właściwą ilość witaminy D tylko za pomocą diety w miesiącach zimowych, gdy brak jest syntezy skórnej, jest niemożliwe.

Brak statystycznie istotnej korelacji pomiędzy dietą a stężeniem witaminy D w surowicy ($R=0,041$; $p=0,585$) może wynikać z powszechnego wzbogacania różnych pokarmów jak np. oleje roślinne, margaryny, mleko itp. w witaminę D, na co uczestniczki badania mogły nie zwrócić uwagi lub nie wiedzieć.

Pomimo, że dieta nie ma istotnego znaczenia dla statusu witaminy D w organizmie, należy dążyć do rozszerzania diety o pokarmy bogate w witaminę D ponieważ właściwie zbilansowana

dieta ma korzystny wpływ na całokształt funkcjonowania organizmu. Dieta jest też najłatwiejszym do zmodyfikowania czynnikiem wpływającym na zdrowie człowieka. Właściwa dieta w onkologii może istotnie wpływać między innymi na wyniki leczenia przeciwnowotworowego, skuteczność profilaktyki pierwotnej i wtórnej (mniejsza częstość powikłań, lepsze gojenie ran, szybsza rekonwalescencja, sprawniejsze działanie układu odpornościowego). Niestety, w Polsce nie więcej niż 10% wszystkich chorych na nowotwory otrzymuje odpowiednie wsparcie z zakresu poradnictwa i leczenia żywieniowego. Równocześnie badania wskazują, że 50–80% chorych na nowotwory wykazuje objawy niedożywienia o różnym nasileniu ze względu na stosowaną u nich terapię, która często powoduje utratę łaknienia.[195] Wg badania przeprowadzonego w Hiszpanii wśród pacjentów z nowotworem lokalnie zaawansowanym lub nowotworem z przerzutami 52% pacjentów było niedożywionych w stopniu od umiarkowanego do poważnego. 97,6% z tych pacjentów wymagało interwencji żywieniowej lub co najmniej przekazania rekomendacji.[196] Również Genton i wsp. na podstawie swoich badań określili, że 70% pacjentek z rakiem sutka było zainteresowanych uzyskaniem informacji na temat właściwego żywienia.[197] Według World Cancer Research Fund i American Institute for Cancer Research odpowiednia dieta obok utrzymania właściwej masy ciała i aktywności fizycznej jest czynnikiem, który może być związany z dłuższym przeżyciem pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem.[198] Ocena diety 110 Amerykanek ze zdiagnozowanym rakiem sutka przeprowadzona przez Karavasiloglou i wsp. wykazała, że stosowanie diety o wyższej jakości było powiązane ze zmniejszeniem śmiertelności w okresie 16 letniej obserwacji po leczeniu. Jakość diety była określana za pomocą Indeksu Zdrowej Żywności (Healthy Eating Index), stworzonego przez Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych w celu analizy ogólnej jakości diety.[199] Do podobnych wniosków doszli Schwedhelm i wsp. którzy przeprowadzili metaanalizę 117 badań kohortowych, z których 41 dotyczyło pacjentek po przebytych raku sutka, mającą na celu określenie zależności pomiędzy rodzajem spożywanych pokarmów, a całkowitą śmiertelnością. Stosowanie diety o wysokiej jakości oraz przestrzeganie wzorców zdrowego żywienia jest odwrotnie skorelowane z całkowitą śmiertelnością wśród pacjentek po przebytych raku sutka.[200]

Dlatego istnieje uzasadniona potrzeba edukacji pacjentów onkologicznych przez osoby kompetentne biorące udział w procesie diagnostyczno - terapeutycznym na temat wpływu diety na ogólny stan zdrowia chorych na nowotwory w tym zasadności i konieczności zdrowego odżywiania, oraz wprowadzania do codziennej diety produktów bogatych w witaminę D.

5.4 WPŁYW SUPLEMENTACJI NA STĘŻENIE WITAMINY D U KOBIET PO LECZONYM RAKU SUTKA

Niewielka w stosunku do zapotrzebowania podaż witaminy D z dietą powoduje konieczność korzystania z alternatywnych źródeł tej witaminy. Suplementacja preparatami farmakologicznymi jest stosunkowo łatwym i niedrogim sposobem uzupełniania zapotrzebowania na witaminę D. Kampanie reklamowe, szeroko rozpowszechnione w ostatnich kilku latach w środkach masowego przekazu, zachęcające do suplementacji witaminy D, są dodatkowym bodźcem, który skłania pacjentów do ich stosowania. Wydaje się, że w ostatnich latach problem konieczności suplementacji witaminy D został dostrzeżony przez lekarzy i pacjentów. Zaobserwowano wzrost odsetka kobiet suplementujących witaminę D z 40% w latach 1999-2000 do 47% w 2011-2012 roku.[201] Również zaobserwowano wzrostowy trend średniego stężenia 25(OH)D. W badaniach populacyjnych National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) średnie stężenie 25(OH)D w latach 2003-2004 (niezależnie od pory roku u kobiet powyżej 35 roku życia) wynosiło 24,4 ng/ml, podczas gdy w badaniach przeprowadzonych w latach 2011-2012 średnie stężenie wyniosło 31,0 ng/ml.[202]

Wiele badań wykazuje na znaczenie suplementacji witaminą D w prewencji antynowotworowej. W 2019 roku Zhang i Niu wykonali metaanalizę badań z randomizacją dotyczących wpływu suplementacji witaminy D na częstość występowania nowotworów oraz śmiertelność z przyczyn nowotworowych, opracowanie to wykazało pozytywne efekty suplementacji witaminą D. Korzyści z suplementacji stwierdzono szczególnie w subpopulacji, która nie miała rodzinnych obciążeń chorobami nowotworowymi. Wykazano znamienne statystycznie różnicę w odsetku osób które zmarły z powodu nowotworu pomiędzy grupą osób suplementujących witaminę D a grupą która otrzymywała placebo, oraz znaczącą redukcję ryzyka śmiertelności (RR=0,87, 95%, CI:0,79-0,95, p=0,003). Nie wykazano natomiast znamienych statystycznie różnic w zapadalności na raka sutka pomiędzy osobami z grupy suplementujących i niesuplementujących witaminę D.[203] Podobne wnioski zaprezentowali Keum i wsp. którzy również w 2019 roku przeprowadzili metaanalizę randomizowanych badań dotyczących wpływu suplementacji witaminy D na całkowitą liczbę zachorowań na nowotwory oraz na śmiertelność z przyczyn nowotworowych. Autorzy potwierdzili wyniki metaanalizy z 2014 roku odnoszącej się do tego samego problemu i wykazali, że suplementacja witaminy D była powiązana z 13% redukcją śmiertelności z przyczyn nowotworowych w okresie od 3-10 lat od czasu rozpoczęcia badania. Autorzy tej metaanalizy nie potwierdzili wpływu suplementacji witaminy D na częstość występowania schorzeń nowotworowych w grupie suplementujących w odniesieniu do

niesuplementującej grupy kontrolnej.[204] Jednak metaanaliza 22 badań obserwacyjnych wykazała bezpośrednią zależność pomiędzy niedoborem 25(OH)D a ryzykiem raka sutka (RR=1,91, 95% CI: 1,51-2,41, p<0,001). Słabą ujemną korelację wykazano dla całkowitej ilości spożywanej witaminy D z dietą i z suplementów a rozwojem raka sutka (RR=0,99, 95%, CI:0,97-1,00, p=0,022). Podobną korelację wykazał Hossain porównując grupę kobiet suplementujących witaminę D względem nie suplementujących.[205] Dodatkowo według Madden i wsp. w przypadku osób, które przed diagnozą raka sutka nie suplementowały witaminy D czas jaki upływa od momentu zdiagnozowania nowotworu do włączenia takiej suplementacji jest czynnikiem wpływającym na śmiertelność. Określili oni, że śmiertelność z powodu raka sutka u pacjentek, które rozpoczęły suplementację po zdiagnozowaniu u nich nowotworu była o 20% niższa w porównaniu do grupy niesuplementującej witaminę D oraz, że redukcja śmiertelności wyniosła 49% w przypadku pacjentek, które włączyły taką suplementację w czasie nie dłuższym niż 6 miesięcy od postawienia diagnozy.[132] Z kolei badania 332 Szwajczerek po leczonym raku piersi wykazały, że tylko 133 pacjentki przyjmowały suplementację wapnia z witaminą D lub samej witaminy D. Jednak u wielu pacjentek pomimo zastosowanej suplementacji (800 IU) poziom witaminy D pozostawał suboptymalny.[154] Z kolei we wspomnianym powyżej badaniu O'Sullivan i wsp. stwierdzili, że suplementacja 2000 IU witaminy D wiązała się ze wzrostem stężenia 25(OH)D średnio o 23 nmol/l (p<0,0001).[166]

W moich badaniach wykazałam, że w trakcie włączenia do badania suplementację witaminy D₃ stosowała mniej niż połowa pacjentek (grupa A 48,4%; n=30, grupa B 43,8%; n=14). Wpływ suplementacji witaminy D widać w uzyskanych średnich wartościach stężeń 25(OH)D - pacjentki, które nie suplementowały witaminy D₃ miały znacząco niższe stężenia witaminy D, niezależnie od pory roku (grupa A: suplementujące w pierwszym pobraniu (zima) i w drugim pobraniu (lato) odpowiednio 34,6 +/- 14,2 ng/ml i 38,9 +/- 12,2 ng/ml, niesuplementujące odpowiednio 22,4 +/- 11,9 ng/ml i 34,8 +/- 12,1 ng/ml; w grupie B pierwsze pobranie (lato) i drugie pobranie (zima) suplementujące odpowiednio 36,8 +/- 15,4 ng/ml i 35,3 +/- 13,7 ng/ml; niesuplementujące odpowiednio 24,0 +/- 9,0 ng/ml i 22,75 +/- 5,3 ng/ml). Dodatkowo niedobór witaminy D w grupie A w zimie wykazano tylko u co dziesiątej osoby suplementującej preparaty witaminy D (10,34%) oraz u sześciu na dziesięć pacjentek niesuplementujących witaminę D (58,06%).

Analizując wpływ suplementacji w poszczególnych grupach badanych można zauważyć, że suplementacja zapewniła wysoki odsetek osób, u których stężenie 25(OH)D przekraczało 20 ng/ml (odpowiednio dla pierwszego i drugiego badania grupa A 89,65% i 93,61%, grupa B 85,71% oraz 87,49%). Przy czym należy zauważyć, że polskie rekomendacje dotyczące suplementacji

witaminy D w grupach ryzyka zalecają by dążyć do uzyskania surowiczego stężenia 25(OH)D w zakresie 30-50 ng/ml, podobnie jak wytyczne francuskie.

5.5 ZNAJOMOŚĆ REKOMENDACJI DOTYCZĄCYCH ZALECANYCH STĘŻEŃ WITAMINY D W SUROWICY I SUPLEMENTACJI WITAMINĄ D₃ W POPULACJI KOBIET Z RAKIEM SUTKA

Jak już wspomniano powyżej, liczne publikacje naukowe wskazują na istnienie zależności pomiędzy surowiczym stężeniem witaminy D, a ryzykiem raka sutka, jego zaawansowaniem w czasie zdiagnozowania i odległym rokowaniem. Jednakże nie ma jednolitych wytycznych jakie dawki witaminy D oraz jakie stężenia w surowicy należy uznać za docelowe w tej grupie chorych. Jest to pochodną braku globalnego konsensusu dotyczącego zalecanych populacyjnych stężeń witaminy D. Amerykańska Narodowa Akademia Medycyny (IOM) podobnie jak Niemieckie Towarzystwo Żywieniowe definiują niedobór witaminy D jako jego surowicze stężenie wynoszące poniżej 20 ng/ml, podczas gdy Amerykańskie Towarzystwo Endokrynologiczne i Amerykańskie Stowarzyszenie Endokrynologii Klinicznej (AAACE) zaleca rozpoznawanie niedoborów przy stężeniach poniżej 30 ng/ml.[118, 119, 120, 121]

Należy tu podkreślić, że definicja niedoboru opracowana przez IOM odnosi się do zachowania prawidłowego funkcjonowania witaminy D - zależnej gospodarki mineralnej kości, a nie do wszystkich aspektów zdrowia, w tym zmniejszania ryzyka chorób nowotworowych. Onkolodzy sugerują, aby dla pacjentów z chorobami nowotworowymi implementować wytyczne, które będą uwzględniały zakresy stężeń witaminy D, w których ma ona działanie profilaktyczne na rozwój chorób onkologicznych. NCCN (National Comprehensive Cancer Network) rekomenduje, aby pacjenci onkologiczni utrzymywali stężenie witaminy D powyżej 30 ng/ml jedynie w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania gospodarki kostnej.[206] Grant na podstawie analizy badań epidemiologicznych ryzyka wystąpienia nowotworu, jego progresji i śmiertelności wyciągnął wniosek, że suplementacja u pacjentów onkologicznych powinna być tak prowadzona, aby utrzymać surowicze stężenie witaminy D powyżej 40-50 ng/ml.[207] Również inni autorzy wskazują, że optymalnym poziomem witaminy D w kontekście zapobiegania chorobom nowotworowym w tym rakowi sutka, a u pacjentów onkologicznych w celu poprawy rokowania oraz wydłużenia czasu remisji jest surowicze stężenie witaminy D w zakresie od 30-40 ng/ml do 60 ng/ml.[129, 150, 206]

Tabela 8. Definicja niedoboru oraz poziomów optymalnych według poszczególnych towarzystw naukowych.[146, 208, 209, 210]

Stężenie 25(OH)D ng/ml	Institute of Medicine (IOM), 2011 Stany Zjednoczone i Kanada	Endocrine Society, 2011 Stany Zjednoczone	European Food Safety Authority (EFSA), 2016 Europa	Scientific Advisory Committee on Nutrition, (SACN) 2016 Wielka Brytania	European Calcified Tissue Society, (ECTS), 2019 Europa
10-12	Niedobór	Niedobór	Niedobór	Niedobór	Ciężki niedobór
12-20	Poziom niewystarczający (suboptymalny)	Niedobór	Niedobór		Niedobór
20-30	Poziom optymalny	Poziom niewystarczający (suboptymalny)	Poziom wystarczający (optymalny)		Poziom wystarczający (optymalny)
>30		Poziom wystarczający (optymalny)			

Również brak jest jednolitych wytycznych odnośnie dawki suplementowanej witaminy D. Amerykańska Narodowa Akademia Medycyny (NAM, poprzednio IOM – Institute of Medicine) rekomenduje przyjmowanie 600 IU/dobę witaminy D u osób poniżej 70 roku życia i 800 IU/dobę dla osób powyżej 70 roku życia i starszych. W wytycznych brak jest szczegółowych zaleceń dotyczących suplementacji witaminy D u osób z chorobami nowotworowymi. Z kolei Amerykańskie Towarzystwo Endokrynologiczne sugeruje, że w konkretnych przypadkach konieczne są dawki do 2000 IU/dobę w celu utrzymania optymalnego stężenia witaminy D w organizmie, a osoby z podniesionym wskaźnikiem masy ciała ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) wymagają dawek potrojonych w stosunku do tych zalecanych dla osób z prawidłowym BMI.[206] Najniższą dobową dawkę (400 IU) rekomenduje brytyjski Naukowy Komitet Doradczy ds. Zaleceń Żywnościowych dla populacji ogólnej w wieku > 4 lat zamieszkującej w Wielkiej Brytanii.[132] Wnioski badań naukowych nie zawsze są zbieżne z rekomendacjami organizacji medycznych.

Przeprowadzona przez Mo i wsp. metaanaliza 136 randomizowanych badań oceniających efekt suplementacji różnymi dawkami witaminy D na surowicze stężenie 25(OH)D w populacjach stratyfikowanych względem wieku wykazała oczywistą zależność pomiędzy przyjmowaną dawką a stężeniem 25(OH)D. Autorzy dla europejskiej populacji osób dorosłych zalecają przyjmowanie witaminy D w dawce 2519 i 797 IU/dobę odpowiednio dla osób w wieku 18-64 i 65-85 lat.[211] Z kolei autorzy szwajcarskiego badania uważają, że rekomendowana dla mieszkańców Australii, Azji, Europy i Ameryki Północnej dawka 1000 IU/dobę jest właściwa do utrzymania optymalnego stężenia 25(OH)D w surowicy, ale jest niewystarczająca dla osób z jej niedoborem. W takim przypadku zazwyczaj zalecaną dawką jest 2000-3000 IU/dobę. Ilość ta w sposób bezpieczny podnosi stężenie 25(OH)D do poziomu optymalnego oraz normalizuje poziom parathormonu (PTH) w miesiącach zimowych u mieszkańców półkuli północnej.[154]

Suplementacja witaminą D w populacji chorych z rakiem sutka często jest wyodrębniona w rekomendacjach wielu towarzystw onkologicznych z uwagi na wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia niedoborów witaminy D u takich pacjentek. Jednocześnie również tutaj nie zostały wypracowane jednolite wytyczne. Towarzystwa amerykańskie (American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology) rekomendują suplementację witaminy D u pacjentek z rakiem sutka począwszy od 50 roku życia w dawce 600-1000 IU/dobę[121], z kolei Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ESMO) zaleca wyższe dobowe dawki witaminy D w tej grupie pacjentek wynoszące 1000-2000 IU/dobę.[118, 122] Należy zaznaczyć, że obydwie towarzystwa rekomendują powyższe dawki w celu zapobiegania utracie masy kostnej związanej z samym charakterem choroby i skutkami ubocznymi leczenia, a nie prewencją wznowy.

Obowiązujące od 2018 roku rekomendacje polskiej grupy ekspertów, w której uczestniczyli konsultanci krajowi różnych dziedzin i prezesi medycznych towarzystw naukowych odnośnie suplementacji i leczenia witaminą D dla populacji polskiej, odnoszą się zarówno do populacji ogólnej jak i zawierają wytyczne dla osób z poszczególnych grup ryzyka zagrożonych niedoborami witaminy D. W grupach ryzyka, a więc również w populacji chorych na raka sutka suplementację witaminy D należy prowadzić pod kontrolą stężenia w surowicy, tak by utrzymywało się ono między 30-50 ng/ml. Jest to również optymalne stężenie w surowicy wg polskich zaleceń. Suplementację należy prowadzić przy użyciu dobowych dawek witaminy D między 800 a 2000 IU dla osób dorosłych, zróżnicowanych w zależności od jej podaży w diecie i aktualnej masy ciała.[115]

W moich badaniach stwierdziłam wzrost odsetka kobiet stosujących suplementację witaminą D po leczonym raku sutka, po przeprowadzeniu badania stężenia 25(OH)D i omówieniu uzyskanego wyniku. W przypadku niedoboru przedstawiono konsekwencje zdrowotne deficytu

witaminy D. Wszystkim pacjentkom zalecano uzyskanie porady lekarza odnośnie szczegółowych rekomendacji, w tym zalecanych dawek suplementacji i laboratoryjnego monitorowania stężeń witaminy D. Przy włączeniu do badania ponad połowa pacjentek grupy badanej A i B nie suplementowała witaminy D₃ (odpowiednio 51,6% i 56,2%), natomiast przy ponownej kontroli (w trakcie drugiego badania) odsetek osób suplementujących witaminę D₃, wzrósł do ponad 75% w obydwóch grupach badanych (odpowiednio 75,85 i 76,9%). Wyższy odsetek kobiet suplementujących witaminę D₃ przy drugim pobraniu w grupie ze zdiagnozowanym rakiem sutka niż w grupie kontrolnej (44,08%) można tłumaczyć większą świadomością pacjentek odnośnie roli witaminy D oraz konsekwencji jej niedoborów na układ kostny ale też odpornościowy i ryzyko wznowy. Należy wziąć pod uwagę również większą motywację i dbałość o ogólnie pojęte zdrowie.

Odsetek pacjentek znających rekomendacje w zakresie suplementacji witaminy D u kobiet z rakiem sutka przed włączeniem do mojego badania był niski i wynosił 22,6 % i 12,5% odpowiednio dla grupy badanej A i B. W trakcie powtórnego badania stężenia witaminy D odpowiednio 62,9% i 56,3% kobiet w grupie A i B deklarowało znajomość rekomendacji dotyczących suplementacji witaminą D. Oznacza to, informacje przekazane pacjentkom po pierwszym badaniu skłoniły je do poszukiwania szczegółowych wytycznych dotyczących suplementacji witaminą D. Jednocześnie wzrósł odsetek osób stosujących suplementację witaminy D₃ w grupie deklarujących znajomość rekomendacji (w trakcie pierwszego badania w grupie badanej A 71,42%, drugiego 92,3%). W grupie B nie wszystkie pacjentki, które zapoznały się z rekomendacjami, je stosowały, pomimo zimowej pory roku. Przy pierwszym badaniu odsetek suplementujących wśród pacjentek znających rekomendacje wynosił 100%, przy drugim badaniu tylko 83,3%. Pacjentki które nie знаły rekomendacji i nie stosowały suplementacji miały niższe średnie surowicze stężenia 25(OH)D w porównaniu do osób z grupy B znających rekomendacje i suplementujących jak i znających rekomendacje i niesuplementujących witaminę D₃. W grupie A przy drugim pobraniu stężenia witaminy D wśród pacjentek które nie znały rekomendacji i nie stosowały suplementacji były podobne do średnich surowiczych stężeń 25(OH)D u kobiet znających rekomendacje i suplementujących jak i znających i niesuplementujących witaminę D₃. Brak różnic może wynikać z syntezy endogennej witaminy D, ponieważ badanie to wykonano w lecie.

Większość badanych przeze mnie kobiet uzyskała informację na temat rekomendowanych zasad suplementacji witaminą D od lekarzy w tym w 35% lekarzy specjalistów oraz w 30% lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej. Farmaceuci doradzali suplementację co dziesiątej badanej przeze mnie pacjentce. Co czwarta badana decyzję o suplementacji podjęła samodzielnie. Ponad połowa

badanych (56,6%) miała dawkowanie ustalone przez lekarza, co czwartej pacjentce dawkowanie poradził farmaceuta a pozostałe 23,3% pacjentek, samodzielnie dobrało sobie dawkę witaminy D.

Podobne badania przeprowadził w Irlandii Madden i wsp. Wykazano w nich, że w 2005 r porównywalny odsetek, jak w moich badaniach, pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem sutka (15,5%) był pouczony przez lekarza o konieczności suplementacji i otrzymał receptę na preparat witaminy D. Sześć lat później odsetek ten wzrósł do 36,9% pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem sutka. Średnia zlecona dobową dawką witaminy D wynosiła 857 IU.[212] W USA na początku XXI wieku aż 56% pacjentek z rakiem sutka po indukowanej chemioterapii menopauzie otrzymało informację na temat zalecanej suplementacji witaminą D i wapniem.[213] Najlepsze wyniki w zakresie informowania o konieczności suplementacji witaminą D kobiet po leczeniu raka sutka raportowano w Chorwacji. Wyniki prospektywnego badania trwającego 3,5 roku przeprowadzonego przez Bosković i wsp. wykazały, że w tym kraju 75,7% pacjentek z rakiem sutka otrzymało od lekarza onkologa receptę na preparat witaminy D i wapń.

Niestety są też doniesienia, że spora grupa pacjentek po leczeniu raka sutka - 40-80% w zależności od ośrodka w którym były leczone kobiety - nie stosuje się do zaleceń lekarskich w zakresie suplementacji witaminą D.[214] Często winą za brak pełnej współpracy pomiędzy pacjentami leczonymi z powodu nowotworów a lekarzami onkologami obwinia się terapeutów medycyny alternatywnej. Okazuje się jednak, że terapie medycyny alternatywnej nie wpływają na suplementację witaminą D. Andersen i wsp. ocenili stosowanie suplementów witaminy D wśród kobiet ze zdiagnozowanym rakiem sutka, które podzielili na dwie grupy – leczone konwencjonalnie i korzystające dodatkowo z medycyny alternatywnej. Stwierdzili oni, że w obydwóch grupach stosowanie suplementacji witaminy D było szeroko rozpowszechnione, przy czym wyższy odsetek kobiet korzystających z medycyny alternatywnej deklarował stosowanie suplementacji zarówno przed jak i po zdiagnozowaniu raka sutka. Pacjentki leczone konwencjonalnie w większości deklarowały uzyskanie informacji nt. stosowania suplementów witaminy D od lekarza prowadzącego. Z kolei pacjentki korzystające dodatkowo z medycyny naturalnej częściej deklarowały uzyskiwanie rekomendacji na temat stosowania witaminy D od naturopatów i „lekarzy” medycyny alternatywnej niż od lekarza prowadzącego (46,9% vs 26,9%). Znajomi i rodzina byli źródłem wiedzy na temat suplementacji witaminy D dla 33% korzystających i 21% niekorzystających z medycyny alternatywnej, co jest wynikiem porównywalnym odsetkiem pacjentek (25%) z mojego badania, które uzyskały taką informację od rodziny i/lub znajomych.[155]

Z przedstawionych danych wynika, że w Polsce ciągle wiele pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem sutka nie uzyskuje informacji na temat zasad suplementacji witaminą D

od lekarzy sprawujących opiekę nad tą grupą chorych (onkologów, endokrynologów, ginekologów i lekarzy POZ). Badanie przeprowadzone przez Kimiafara i wsp. jednoznacznie wykazało, że pacjentki z rakiem sutka oczekują informacji o chorobie, jej przebiegu, rokowaniu, procesie rehabilitacji i możliwych wariantach postępowania diagnostyczno - terapeutycznego. Jednakże najbardziej chciałyby uzyskać informację o szeroko rozumianej terapii i jej ewentualnych skutkach ubocznych, oraz o tym w jaki sposób powinny się odżywiać w trakcie leczenia. Pomimo rosnącej świadomości lekarzy odnośnie potrzeb pacjentów onkologicznych, wielu chorych nadal ma odczucie, że nie otrzymują wystarczającej ilości informacji lub otrzymują informację, która jest niejasna lub niezrozumiała. Nawet gdy informacje były przekazywane pacjentom w formie ulotek, twierdzili oni, że użyty język był zbyt trudny (fachowy) i nie byli w stanie zrozumieć (w ich opinii) wystarczająco dobrze kluczowych kwestii. Dlatego pacjenci często korzystają z alternatywnych źródeł informacji takich jak internet, książki, inni pacjenci, aby uzyskać informacje jak stosować parafarmaceutyki, suplementy czy skomponować właściwą dietę najkorzystniejszą dla swojego stanu zdrowia.[196]

Powyższe dane wskazują na potrzebę szerszej edukacji zarówno pacjentów jak i lekarzy z zakresu korzyści płynących z utrzymania optymalnego stężenia 25(OH)D, szczególnie w grupie leczonych z powodu raka sutka. Problem ten powinien być rozwiązany systemowo i należy jasno określić czy suplementacja witaminą D u pacjentów onkologicznych jest domeną specjalistów onkologii czy lekarzy POZ.

5.6 MONITOROWANIE STĘŻENIA WITAMINY D U PACJENEK LECZONYCH Z POWODU RAKA SUTKA I WPLYW BADANIA STĘŻENIA WITAMINY D NA STATUS WITAMINY D

Dokonujący się w ostatnich dekadach dynamiczny rozwój medycyny, w tym medycyny laboratoryjnej, daje lekarzom i pacjentom szerokie możliwości w zakresie diagnozowania, a następnie monitorowania efektów leczenia. Dotyczy to również oceny wdrożonych działań mających na celu poprawę stanu zdrowia i komfortu życia pacjentów po zakończeniu leczenia onkologicznego. Wzrost zainteresowania wpływem witaminy D na organizm człowieka, przyczynił się do wprowadzenia na rynek usług laboratoryjnych tanich i wiarygodnych testów służących do pomiaru stężenia 25(OH)D uznawanego za najlepszy wskaźnik zasobów witaminy D w organizmie.

Dawkowanie witaminy D wg ustalonego ogólnego schematu nie zawsze się sprawdza. Jak wynika z moich badań, jak i innych autorów suplementacja witaminy D musi być dostosowana do

pory roku, stylu życia i indywidualnej charakterystyki danej osoby, w tym osobniczej zdolności do wchłaniania witaminy D.[146] Nawet zaawansowane algorytmy pozwalające zindywidualizować dawkowanie witaminy D np. w zależności od wieku, pory roku, czy masy ciała nie zawsze przynoszą spodziewane efekty. Uważa się np., że każde 100 IU przyjmowanego suplementu witaminy D, powoduje wzrost surowiczego stężenia 25(OH)D o 1 ng/ml.[21] Inni eksperci stoją na stanowisku, że wymagana jest suplementacja w dawce > 1000 IU/dobę, aby uzyskać optymalne surowicze stężenie 25(OH)D wynoszące > 30 ng/ml.[215] Wynika to z trudności w ustaleniu optymalnego dawkowania ze względu między innymi na podaż witaminy D w diecie i endogenną produkcję po ekspozycji na promieniowanie słoneczne, stosowaniem kosmetyków z filtrami, ilości tkanki tłuszczowej i pigmentację skóry oraz zanieczyszczeniem powietrza.[216] Na przykład Baumann i wsp., podawali jednorazowo pacjentkom po leczonym raku sutka, u których wykryto niedobór 25(OH)D, wysokie dawki witaminy D (300000 IU) a potem stosowali dawkę podtrzymującą w wysokości 800 IU/dobę. Suplementację dawką 800 IU/dobę zalecano również pozostałym pacjentkom biorącym udział w badaniu. W trakcie kolejnego pomiaru stężenia 25(OH)D u części pacjentek ponownie stwierdzono niedobór witaminy D.[154] Potwierdza to liczne inne spostrzeżenia, że suplementacja witaminy D w oparciu o wytyczne, bez wiarygodnego laboratoryjnego monitorowania stężenia tej witaminy u kobiet po leczonym raku sutka nie zabezpiecza przed niedoborami.

Wg zaleceń ekspertów, w tym konsultantów krajowych i prezesów medycznych towarzystw naukowych wydanych dla populacji polskiej w grupach ryzyka deficytów witaminy D suplementacja powinna być prowadzona pod kontrolą laboratoryjną, w oparciu o oznaczenie stężenia w surowicy 25(OH)D.[115] Dodatkowo w Standardach Leczenia Żywnościowego w Onkologii z 2015 roku nakazano suplementację witaminy D w przypadku udokumentowanego niedoboru tego składnika we krwi.[116] Podobne zalecenia zostały wydane w 2018 roku przez Hiszpańskie Towarzystwo Medycyny Onkologicznej (SEOM)[217] oraz w 2016 przez Europejskie Towarzystwo Żywnościowego i Dojelitowego (ESPEN).[218]

Z mojej pracy wynika, że jedynie 14,5% i 18,7% kobiet odpowiednio z grupy badanej A i B miało wykonane oznaczenie stężenia witaminy D przed włączeniem do programu badawczego. W grupie kontrolnej odsetek ten był porównywalny do tego obserwowanego w grupach badanych (15,1%).

Podobne wyniki uzyskał Andersen i wsp. w populacji 553 amerykańskich kobiet, u których zdiagnozowano raka sutka nie później niż 2 lata przed włączeniem do badania. Oceniono czy lekarze medycyny konwencjonalnej jak i praktykujący medycynę alternatywną monitorują stężenie 25(OH)D w grupie pacjentek leczonych konwencjonalnie, ale z uzupełnieniem terapiami

medycyny alternatywnej. Stwierdzono, że kobiety korzystające dodatkowo z uzupełniających terapii medycyny alternatywnej miały częściej wykonywane badania poziomu witaminy D w porównaniu do pacjentek korzystających jedynie z medycyny konwencjonalnej (30% vs. 16%).[155] Można sądzić, że lekarze medycyny naturalnej przywiązują większą wagę do suplementowania i holistycznego prowadzenia pacjenta niż lekarze zlecający celowane leczenie farmakologiczne.

Ponadto z badań wynika, że pacjentki po leczonym raku sutka częściej sięgają po suplementy witaminy D w sytuacji gdy zostanie przeprowadzone laboratoryjne oznaczenie poziomu 25(OH)D, co wpływa na zwiększenie ich świadomości odnośnie zasadności suplementacji. O' Brien i wsp. w tzw. Sister Study, dużym prospektywnym badaniu przeprowadzonym w USA zanalizowali 1598 kobiet (827 w grupie badanej, u których rozwinął się rak sutka i 771 w grupie kontrolnej, u których nie wykryto raka sutka). Pacjentkom dwukrotnie oznaczono stężenia 25(OH)D w surowicy. Każda z kobiet biorących udział w badaniu była poinformowana o kolejnym planowanym kontrolnym badaniu stężenia witaminy D po paru latach. W chwili włączenia do badania średnie stężenie 25(OH)D w grupie badanej i w kontrolnej wynosiło odpowiednio 31,6 ng/ml i 32,3 ng/ml. Podczas drugiego pomiaru stężenia 25(OH)D (4-10 lat od pierwszego badania) stężenia witaminy D były wyższe w obu grupach, (40,4 ng/ml grupa kontrolna i 43,5 ng/ml grupa badana). Wzrost średniego stężenia 25(OH)D zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej wynikał z większej liczby kobiet, które deklarowały stosowanie suplementów witaminy D. Przy pierwszym badaniu odsetek ten wynosił 56% dla obu grup, z kolei w trakcie drugiego oznaczenia stężenia witaminy D regularne stosowanie suplementacji w grupie kontrolnej deklarowało 77% kobiet, a w grupie badanej nawet 84%. [219]

Wykonanie pierwszego pomiaru stężenia 25(OH)D w trakcie tej pracy, a następnie omówienie wyniku z pacjentkami i wskazanie przy niedoborze konieczności kontaktu z lekarzem prowadzącym w celu uzyskania porady wpłynęło wśród badanych kobiet na zainteresowanie swoimi zasobami witaminy D i jej suplementacją. Uzyskana przez pacjenta informacja z pomiaru stężenia witaminy D świadcząca o jej niedoborze skłaniała więc do podjęcia działań mających na celu wyrównanie deficytów. W efekcie stwierdzono zmniejszenie o 26,73% liczby osób z niedoborem witaminy D w kolejnym badaniu w grupie A i o 19,04% w grupie B, niezależnie od pory roku wykonywania pierwszego i drugiego badania. Równolegle stwierdzono wzrost o około 30% odsetka pacjentek, które w czasie kolejnego badania zastosowały suplementację witaminy D w drugim pomiarze. Efekt wdrożonej suplementacji widoczny był także w wyższych średnich stężeniach 25(OH)D uzyskanych w grupie A i B. Również wśród pacjentek niesuplementujących

witaminę D₃ zauważono zmniejszenie odsetka osób z niedoborem tej witaminy (dla grupy A z 58,06% do 28,57% dla grupy B z 44,44% do 25

Obserwowany w moich badaniach, we wszystkich grupach ok. 25% odsetek pacjentek u których poziom 25(OH)D był suboptymalny pomimo suplementacji witaminą D₃ świadczy o zalecanej zbyt niskiej dawce. Żadna z pacjentek, u której w pierwszym badaniu wykryto niedobór witaminy D nie deklarowała wprowadzenia przez lekarza terapii wyższymi dawkami, których celem byłoby wyrównanie niedoborów, a następnie wprowadzenie dawki podtrzymującej celem utrzymania optymalnego poziomu witaminy 25(OH)D w surowicy krwi. Zgodnie z polskimi rekomendacjami dotyczącymi Zasad Suplementacji i Leczenia Witaminą D z 2018 roku, w grupach ryzyka dawkowanie witaminy D w przypadku potwierdzonego laboratoryjnie jej niedoboru wymaga stosowania dawek zależnych od stężenia 25(OH)D i wieku, z uwzględnieniem charakterystyki schorzenia, stosowanych leków i masy ciała.[115]

Choć optymalna wydaje się suplementacja witaminą D pod kontrolą oznaczeń laboratoryjnych jej stężenia w surowicy, to należy pamiętać, że badania laboratoryjne są niewygodne dla pacjenta i zwiększają koszt leczenia. Jednak cena oznaczeń witaminy D jest wręcz śladowa z kosztami leczenia onkologicznego przy wznowie i tzw. stratą społeczną.

Skuteczna diagnostyka i leczenie raka sutka jest determinowana przez wiele czynników, a jakość i efektywność leczenia pacjentów onkologicznych w znacznym stopniu zależy od sposobu funkcjonowania systemu opieki zdrowotnej w danym kraju. W Polsce, pomimo coraz popularniejszych badań przesiewowych, nadal obejmują one niezadawalająco niską liczbę kobiet z grupy największego ryzyka zachorowania, w wieku 50-69 lat. Jest to jedna z przyczyn rozpoznawania raka sutka w Polsce w stadium znacznego zaawansowania klinicznego, w których niejednokrotnie choroba jest niewyleczalna. Dlatego kierując się wynikami badań świadczących o protekcyjnym wpływie optymalnego stężenia witaminy D w organizmie, należy rozważyć wprowadzenie laboratoryjnego oznaczenia stężenia witaminy D w surowicy w zakres badań profilaktycznych wśród pacjentów po leczeniu onkologicznym, w tym u kobiet po leczeniu raka sutka. Brak takich badań wynika z niewystarczających nakładów na badania prewencyjne w polskim systemie ochrony zdrowia, braku jednoznacznych wytycznych której specjalności lekarz powinien objąć pacjentkę profilaktyką w kontekście możliwych niedoborów witaminy D, oraz w pewnym stopniu z nieuregulowanej w polskich realiach sytuacji odpłatności za badanie stężenia 25(OH)D, które do chwili obecnej nie zostało włączone do koszyka świadczeń gwarantowanych POZ.

6. WNIOSKI

1. Kobiety po leczonym raku piersi są bardziej narażone na niedobór witaminy D niż populacja nie leczona onkologicznie.
2. Wykazano wpływ pór roku na stężenie 25(OH)D u kobiet po leczonym raku sutka, oraz zależność stężenia 25(OH)D od czasu i powierzchni skóry ekspozowanej na promieniowanie słoneczne.
3. Dieta nie ma istotnego znaczenia w utrzymaniu prawidłowego stężenia witaminy D u kobiet po leczonym raku sutka.
4. Suplementacja witaminą D₃ znacząco poprawia jej status u kobiet po leczonym raku sutka, dlatego onkolodzy jak i lekarze POZ powinni zalecać podaż tej witaminy.
5. Znajomość rekomendacji na temat suplementacji witaminy D wśród pacjentek po leczonym raku sutka jest bezpośrednio związana z częstszym stosowaniem suplementacji i rzadszym niedoborem 25(OH)D.
6. Monitorowanie stężenia witaminy D korzystnie wpływa na utrzymanie optymalnego stężenia witaminy D u kobiet po leczeniu raka sutka.
7. Należy rozważyć wprowadzenie badania stężenia witaminy D do panelu badań profilaktycznych raka sutka, szczególnie w grupach wysokiego ryzyka.

7. SPIS TABEL I RYCIN

7.1 SPIS TABEL

Tabela 1. Kluczowe różnice w pozyskiwaniu endo- i egzogennej witaminy D.

Tabela 2. Charakterystyka demograficzno - antropometryczna grup badanych i grupy kontrolnej.

Tabela 3. Charakterystyka demograficzno - kliniczna grup badanych i grupy kontrolnej.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna grup badanych i grupy kontrolnej związana z chorobą nowotworową.

Tabela 5. Średnie stężenia 25(OH)D w zależności od suplementacji witaminy D₃.

Tabela 6. Częstość spożywania produktów bogatych w witaminę D w grupach badanych i grupie kontrolnej.

Tabela 7. Spożywanie produktów bogatych w witaminę D przed pierwszą i drugą serią oznaczeń witaminy D w grupie badanej.

Tabela 8. Definicja niedoboru oraz poziomów optymalnych według poszczególnych towarzystw naukowych.

7.2 SPIS RYCIN

Rycina 1. Wzór strukturalny witaminy D₂ (ergokalcyferolu), po lewej i witaminy D₃ (cholekalcyferolu), po prawej.

Rycina 2. Źródła witaminy D.

Rycina 3. Uproszczony schemat przemian witaminy D.

Rycina 4. Biologiczne działanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Rycina 5. Efekty niedoboru witaminy D w działaniu klasycznym i nieklasycznym.

Rycina 6. Wpływ witaminy D na pierwotną odpowiedź immunologiczną i mikrobiom jelitowy.

Rycina 7. Wpływ witaminy D na wtórną odpowiedź immunologiczną.

Rycina 8. Mechanizmy przeciwnowotworowego działania witaminy D.

Rycina 9. Hamowanie proliferacji komórek przez witaminę D.

Rycina 10. Schemat procesu karcenogenezy u ludzi.

Rycina 11. Schemat działań profilaktycznych w przypadku raka gruczołu piersiowego.

Rycina 12. Względne przeżycia pięcioletnie po zdiagnozowaniu raka sutka w Polsce, a średnia w Europie w grupach wiekowych kobiet chorych na raka sutka (%).

Rycina 13. Kryteria włączenia pacjentów do grupy badanej.

Rycina 14. Kryteria włączenia pacjentów do grupy kontrolnej.

Rycina 15. Schemat metody oznaczania witaminy D.

Rycina 16. Schemat procedury badania - pobrań krwi oraz wypełniania ankiet.

Rycina 17. Średnie stężenia $25(\text{OH})\text{D}$ (+/- SD) uzyskane w badaniach przed i po włączeniu do programu oznaczeń witaminy D w poszczególnych grupach. Porównanie wyników grupy kontrolnej (uzyskanych zimą), do wyników grup z okresów zimowych.

Rycina 18. Stratyfikacja stężeń witaminy D w grupie A w zimie i w lecie. Zielonym kolorem zaznaczono odsetek badanych z prawidłowym stężeniem witaminy D (>30 ng/ml.), żółtym z poziomem suboptymalnym (20-30 ng/ml) i czerwonym z niedoborem (<20 ng/ml).

Rycina 19. Odsetek kobiet po leczonym raku sutka ze stężeniami witaminy $25(\text{OH})\text{D}$ poniżej zakresu wartości referencyjnych oraz odsetek kobiet z wartościami w granicach wartości referencyjnych w grupie badanej B (pierwsze badanie - lato, drugie badanie w zimie).

Rycina 20. Stratyfikacja stężeń witaminy $25(\text{OH})\text{D}$ w grupie kontrolnej.

Rycina 21. Odsetek pacjentek z niedoborem, poziomem suboptymalnym i prawidłowym stężeniem witaminy D w zależności od suplementacji w grupie A w pierwszym badaniu (zima) i w drugim badaniu (lato).

Rycina 22. Odsetek pacjentek z niedoborem, poziomem suboptymalnym i prawidłowym stężeniem witaminy D w zależności od suplementacji w grupie B w pierwszym badaniu (lato) i w drugim badaniu (zima).

Rycina 23. Odsetek kobiet grupy kontrolnej z niedoborem, poziomem suboptymalnym i prawidłowym stężeniem witaminy D w zależności od suplementacji.

Rycina 24. Średnie stężenia witaminy 25(OH)D w surowicy w grupie badanej A w pierwszym i drugim badaniu w zależności od znajomości wytycznych suplementacji witaminą D₃ i jej stosowania.

Rycina 25. Średnie stężenia witaminy 25(OH)D w surowicy w grupie B uzyskane z pierwszego i drugiego badania w zależności od znajomości wytycznych suplementacji witaminą D₃ i jej stosowania.

Rycina 26. Źródło informacji na temat suplementacji witaminy D wśród pacjentek grupy badanej (A i B) przed włączeniem do programu oraz grupy kontrolnej.

Rycina 27. Rozkład stężenia witaminy D w zależności od wieku w grupie badanej i w grupie kontrolnej. Grupa badana kropki niebieskie, grupa kontrolna kropki pomarańczowe.

Rycina 28. Wykres zależności iloczynu czasu i powierzchni skóry ekspozowanej na promieniowanie słoneczne od stężenia witaminy D.

8. STRESZCZENIE

Witamina D jest prohormonem wykazującym działanie plejotropowe, którego podstawową rolą jest utrzymanie homeostazy wapniowo - fosforanowej oraz regulacja gospodarki kostnej. Wykazano też ujemną korelację pomiędzy surowiczym stężeniem witaminy D, a częstością występowania nowotworów, w tym raka sutka. Źródłami witaminy D u ludzi są synteza skórna pod wpływem promieniowania słonecznego (UVB) oraz dieta. Niedobór witaminy D jest szeroko rozpowszechnionym problemem zdrowia publicznego co związane jest m.in. z zabezpieczaniem się przed promieniowaniem słonecznym, zmniejszoną ilością czasu spędzanego w warunkach ekspozycji na UVB oraz niską zawartością 25(OH)D w przeciętnej diecie. Jednocześnie zmiany w stylu życia zachodzące przez ostatnie dziesięciolecia uznawane są za jedne z przyczyn wzrostu zachorowań na nowotwory. Wśród kobiet jednym z najczęściej występujących nowotworów jest rak sutka. Wyniki badań eksperymentalnych *in vitro* jak i badania *in vivo* przeprowadzone w minionych dekadach wskazują na protekcyjny wpływ witaminy D w onkogenezie, w tym raku sutka. Prawdopodobnie największe znaczenie ma działanie anty - proliferacyjne i pro - apoptotyczne witaminy D. Utrzymanie optymalnego stężenia witaminy D przyczynia się w istotny sposób do zmniejszenia ryzyka rozwoju raka sutka, u kobiet z rakiem sutka podczas prowadzonej terapii wpływa korzystnie na rokowanie, a po zastosowanej terapii zmniejsza ryzyko wznowy i wydłuża czas przeżycia. Dane na temat niedoborów witaminy D wśród Polek po leczonym raku sutka, należących do pacjentek szczególnie narażonych na niedobory witaminy D są ograniczone. Dlatego biorąc pod uwagę korzyści z utrzymania optymalnego stężenia witaminy D w badanej przeze mnie populacji celem pracy doktorskiej była ocena stężenia witaminy D w surowicy kobiet po leczonym raku sutka, w odniesieniu do wielu czynników jak pory roku, nawyki żywieniowe i społeczne, suplementacja witaminą D, oraz znajomość rekomendacji dotyczących suplementacji witaminy D, a także wpływ oznaczeń stężenia witaminy D na poprawę statusu witaminy D w

kolejnych badaniach i na zmianę zachowań mających na celu uzyskanie i utrzymanie zalecanego surowiczego stężenia witaminy D.

Badanie przeprowadzono wśród 94 kobiet po radykalnym leczeniu raka piersi podzielonych na dwie grupy A i B. Badanie polegało na dwukrotnym pomiarze surowiczego stężenia witaminy D i badaniu ankietowym, w którym pytano o dane demograficzne i antropometryczne, kliniczne dotyczące choroby nowotworowej, układu rozrodczego, nawyków żywieniowych, ekspozycji na promieniowanie UV, znajomość rekomendacji nt. znajomości suplementacji witaminą D u pacjentów onkologicznych, zaleceń udzielonych przez lekarza prowadzącego nt. suplementacji witaminą D, stosowania suplementacji witaminą D.

Grupę A do której zakwalifikowano 62 pacjentki, włączono do badania zimą 2016/2017, a powtórne badanie wykonano latem 2017. Do grupy B zakwalifikowano 32 pacjentki, którym pierwsze badanie wykonano latem 2017, powtórne zimą 2017/2018. Grupę kontrolną stanowiły 94 kobiety w podobnym wieku, z ujemnym wywiadem onkologicznym. Oznaczenia stężenia witaminy 25(OH)D w surowicy krwi wykonano kompetycyjną metodą immunochemiczną na analizatorze Integra cobas e411.

W populacji kobiet po leczonym raku sutka niedobór 25(OH)D występował znacznie częściej niż w populacji ogólnej. Przy pierwszorazowym badaniu dotyczył 33% pacjentek w obu grupach badanych oraz 19% w grupie ogólnej. Średnie stężenia witaminy D w grupach badanych zależały od pory roku, w której dokonano oznaczenia. Najniższe średnie stężenie 25(OH)D uzyskano przy pierwszorazowym badaniu kobiet badanych zimą. Były one znamienne niższe niż średnie stężenie witaminy D w drugim badaniu tej grupy wykonanym latem oraz znamienne niższe niż średnie stężenie witaminy D w grupie kontrolnej. Tylko niespełna połowa pacjentek stosowała suplementację witaminy D w czasie włączenia do badania. Uzyskanie wyników stężenia 25(OH)D z pierwszego pobrania oraz pozyskanie informacji na temat zasad suplementacji witaminy D wpłynęły na wzrost odsetka suplementujących w obydwu grupach o około 30%. Wzrosła też średnia dawka suplementowanej witaminy D w obydwu grupach. Żadna z osób niesuplementujących witaminę D u których powtórne badanie wykonano zimą nie uzyskała optymalnego stężenia 25(OH)D. Znajomość rekomendacji odnośnie suplementacji witaminy D u kobiet po leczonym raku sutka była słaba, jak również nieliczne osoby miały wcześniej oznaczone stężenie witaminy D. Jednocześnie znajomość zasad suplementacji witaminy D przekładała się na wyższe średnie stężenia 25(OH)D. Stężenia 25(OH)D, szczególnie w przypadku wyników świadczących o poziomie suboptymalnym bądź niedoborze skłaniały pacjentki do poszukiwania informacji, nt. suplementacji witaminy D.

Podsumowując, w obecnej pracy wykazano, że odsetek pacjentek z niedoborem witaminy D w grupie po leczonym raku sutka jest wyższy niż w populacji ogólnej. Należy więc poprawić opiekę nad tą grupą pacjentów przez co rozumie się dbałość o osiągnięcie i utrzymanie optymalnego stężenia 25(OH)D, poprzez zapewnienie kompleksowej opieki ze strony personelu medycznego, a więc przekazywanie informacji pacjentkom wpływających na zwiększanie ich świadomości odnośnie korzyści z niej płynących, wdrożenie i laboratoryjne monitorowanie suplementacji witaminy D. Aktualnie lekarze rzadko rekomendują pacjentkom przyjmowanie witaminy D, i znacznie rzadziej monitorują stężenie witaminy D metodami laboratoryjnymi.

9. SUMMARY

Vitamin D is a prohormone exhibiting pleiotropic effects, which fundamental role is to maintain calcium-phosphate homeostasis and regulate bone metabolism. A negative correlation was found between the serum concentration of vitamin D, and the incidence of tumors, including breast cancer. The source of vitamin D in humans is its synthesis in the skin influenced by solar radiation (UVB) and diet. Vitamin D deficiency is a widespread problem of public health which is related to protection from solar radiation, reduced time spent in exposure to UVB, and a low 25(OH)D concentration in an average diet. At the same time, lifestyle changes occurring over the past decades are considered to be one of the causes of an increase in cancer incidence. Among women, one of the most common cancer is breast cancer. The results of experimental *in vitro* studies and the *in vivo* studies conducted in the past decades indicate the protective effect of vitamin D on oncogenesis, including breast cancer. Probably the most significant effects of vitamin D in that cases are the anti-proliferative and pro-apoptotic ones. Maintaining an optimal vitamin D concentration contributes significantly to reducing the risk of developing breast cancer, in women with diagnosed breast cancer during therapy it has a positive effect on prognosis, and after therapy, it reduces the risk of recurrence and extends survival time. Data on vitamin D deficiency among Polish women after breast cancer therapy at risk of vitamin D deficiency are limited. Thus, given the benefits of maintaining optimal vitamin D levels in the studied population, this doctoral thesis aims to evaluate the concentration of vitamin D in the serum of women after breast cancer treatment, considering such factors as seasons, eating and social habits, vitamin D supplementation and knowledge of recommendations on vitamin D supplementation as well as the impact of its measurements on improving the levels of vitamin D in subsequent tests and behavior change.

The study was conducted among 94 women after breast cancer treatment, divided into two groups - A and B. The study consisted of double measurement of serum vitamin D concentration and a questionnaire asking about demographic, anthropometric, and clinical data regarding cancer,

reproductive system, eating habits, exposure to sun radiation, knowledge of recommendations on vitamin D supplementation in oncological patients, recommendations given by the attending physician and the used supplementation of vitamin D.

Group A, to which 62 patients were qualified, was included in the study in the winter of 2016/2017, and a re-examination was performed in the summer of 2017. 32 patients who were qualified for group B were first tested in the summer of 2017, and then in the winter of 2017/2018. The control group consisted of 94 women of similar age with no oncological history. The serum concentration of vitamin 25(OH)D was determined by an immunochemical method using the Integra Cobas e411 analyzer.

In the population of women after breast cancer treatment, 25(OH)D deficiency was much more frequent than in the general population. In the first study, it was 33% in both groups of respondents vs. 19% for the general population. Average vitamin D concentrations in the study groups depended on the season in which the test was performed and whether it was the first or subsequent test for a given group. The lowest average concentration of 25(OH)D was obtained in the first test performed in winter. It was significantly lower than an average vitamin D concentration in the second test among this group performed in summer and significantly lower than the average vitamin D concentration in the control group. Only about half of the patients supplemented vitamin D at the beginning of the study. Obtaining the 25(OH)D concentration results from the first test and obtaining information on the recommendations on vitamin D supplementation increased the percentage of vitamin D supplementation by about 30% in both study groups. The average dose of supplementation also increased in both groups. None of the women that were not supplementing vitamin D and were tested again in winter had optimal 25(OH)D concentration. Knowledge of recommendations regarding vitamin D supplementation in women after breast cancer treatment was weak, as well as the rate of women that had been tested vitamin D level before the study was low. At the same time, the conversance of recommendations on vitamin D supplementation translated into a higher average concentration of 25(OH)D. Obtaining results, especially in suboptimal level or deficiency, prompted patients to seek information, which was evident in an increasing rate of people aware of the recommendations when retaking the test. It was not indicated that any diet component had a statistically significant effect on serum vitamin D levels, only patients consuming more eggs had slightly higher concentrations, but the difference was borderline significant.

In conclusion, the present study has shown that the rate of patients with vitamin D deficiency in the group that underwent breast cancer treatment is higher than in the general population. Therefore care of such patients should be increased to maintain an optimal level of 25(OH)D by providing comprehensive care on the part of medical personnel, and thus providing information to patients that increase their awareness of the benefits of it, implementation and laboratory monitoring of vitamin D supplementation.

Currently, doctors rarely recommend vitamin D intake to patients, and much less frequently monitor their levels with laboratory methods.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Józefowicz O, Rabe-Jabłońska J, Bogaczewicz J, Woźniacka A. Rola witaminy D₃ w patogenezie zaburzeń psychicznych. *Psychiatr Psychol Klin* 2009, 9, 200-206.
2. Wolf G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 2004, 134, 1299-1302.
3. Wicha J. Droga pod słońce. Współczesna historia witaminy D. *Wiad Chem* 2012, 66, 671-696.
4. Rajakumar K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective. *Pediatrics* 2003, 112, 132-135.
5. Chmielewska-Szewczyk D. Kontrowersje wokół witaminy D₃. *Alergia* 2012, 2, 14-19.
6. Russell W.Ch. Theobald Palm and his remarkable observation: how the sunshine vitamin came to be recognized. *Nutrients* 2012, 4, 42–51.
7. Mellanby E. The part played by an “accessory factor” in the production of experimental rickets. *J Physiol* 1918, 52, 11-12.
8. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. *Lancet* 1919, 1, 407–412.
9. DeLuca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep* 2014, 3, 479. doi: 10.1038/bonekey.2013.213.
10. Shampo MA, Kyle R.A. Adolf Windaus—Nobel Prize for research on sterols. *Mayo Clin Proc* 2001, 76, 119. doi: 10.1016/s0025-6196(11)63115-7.
11. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979, 206, 1188 -1190. .
12. Holick MF. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2002, 9, 87–98.
13. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007, 357, 266-281.

-
14. Atoum M, Alzoughool F. Vitamin D and breast cancer: latest evidence and future steps. *Breast Cancer (Auckl)* 2017, 11, 1-8.
 15. Pandolfi F, Franza L, Mandolini C, Conti P. Immune modulation by vitamin D: special emphasis on its role in prevention and treatment of cancer. *Clin Ther* 2017, 39, 884-893.
 16. Marcinowska-Suchowierska E, Walicka M, Tałałaj M, Horst-Sikorska W, Ignaszak-Szczepaniak M, Sewerynek E. Vitamin D supplementation in adults guidelines. *Endokrynol Pol* 2010, 61, 723-729.
 17. Cashman KD, van den Heuvel EG, Schoemaker RJ, Prévéraud DP, Macdonald HM, Arcot JA. 25-Hydroxyvitamin D as a biomarker of vitamin D status and its modeling to inform strategies for prevention of vitamin D deficiency within the population. *Adv Nutr* 2017, 8, 947-957.
 18. Wacker M, Holick MF: Sunlight and vitamin D. *Dermatoendocrinol* 2013, 5, 51-108.
 19. Bandera Merchan B, Morcillo S, Martin-Nuñez G, Tinahones FJ, Macías-González M. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017, 167, 203-218.
 20. Kuryłowicz A, Bednarczuk T, Nauman J. Wpływ niedoboru witaminy D na rozwój nowotworów i chorób autoimmunologicznych. *Endokrynol Pol* 2007, 58, 140-152.
 21. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2014, 110, 2772-2784.
 22. Napiórkowska L, Franek E. Rola oznaczania witaminy D w praktyce klinicznej. *Chor Serca Naczyń* 2009, 6, 203-210.
 23. Szechiński J. Aktywne postaci witaminy D₃ i ich funkcja w leczeniu różnych schorzeń. *Świat Med i Farm* 2007, 23-29.
 24. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D₃: a helpful immunomodulator. *Immunology* 2011, 134, 123–139.

-
25. Chun RF, Shieh A, Gottlieb C, Yacoubian V, Wang J, Hewison M, Adams JS. Vitamin D binding protein and the biological activity of vitamin D. *Front Endocrinol*. 2019, 10, 718. doi: 10.3389/fendo.2019.00718.
26. Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis B W, Gentile M, Haddad JG, Liebhaber SA, Cooke NE. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* 1999, 103, 239-251.
27. Wu X, Zhou T, Cao N, Ni J, Wang X. Role of vitamin D metabolism and activity on carcinogenesis. *Oncol Res* 2014, 22, 129-137.
28. Pełczyńska M, Jaroszewicz I, Świtalska M, Opolski A. Właściwości biologiczne kalcytriolu i jego nowych analogów – potencjalne zastosowania terapeutyczne. *Postepy Hig Med Dosw* 2005, 59, 129-139.
29. Welsh J. Vitamin D and breast cancer: Past and present. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018, 177, 15-20.
30. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011, 25, 585-591.
31. Sommerfeldt W, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001, 10, 86-95.
32. Jolfaie NR, Rouhani MH, Onvani S, Azadbakht L. The association between Vitamin D and health outcomes in women: A review on the related evidence. *J Res Med Sci* 2016, 21, 76. doi: 10.4103/1735-1995.189693.
33. de La Puente-Yagüe M, Cuadrado-Cenzual MA, Ciudad-Cabañas MJ, Hernández-Cabria M, Collado-Yurrita L. Vitamin D: And its role in breast cancer. *KaoHsiung J Med Sci* 2018, 34, 423-427.
34. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator. *Nutrients* 2018, 10, 1656. doi: 10.3390/nu10111656.
35. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, Borregaard N, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol* 2009, 182, 4289-4295.
36. Kuźmińska M. Witamina D a układ oddechowy. *Postępy Nauk Med* 2012, 25, 241-246.

-
37. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JH, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004, 173, 2909–2912.
38. 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* 2005, 19, 1067–1077.
39. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. PPAR γ mediates innate immunity by regulating the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2010, 60, 179–186.
40. Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: Vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 2007, 179, 2060–2063.
41. White JH. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: Past, present and future. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010, 121, 234–238.
42. Wei R, Christakos S. Mechanisms underlying the regulation of innate and adaptive immunity by vitamin D. *Nutrients* 2015, 7, 8251–8260.
43. Ginde A, Mansbach JM, Camargo CA. Vitamin D, respiratory infections, and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009, 9, 81-87.
44. Giraldo DM, Cardona A, Urcuqui-Inchima S. High-dose of vitamin D supplement is associated with reduced susceptibility of monocyte-derived macrophages to dengue virus infection and pro-inflammatory cytokine production: An exploratory study. *Clin Chim Acta* 2018, 478, 140-151.
45. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, Dubnov-Raz G, Esposito S, Ganmaa D, Ginde AA, Goodall EC, Grant CC, Griffiths CJ, Janssens W, Laaksi I, Manaseki-Holland S, Mauger D, Murdoch DR, Neale R, Rees JR, Simpson S Jr, Stelmach I, Kumar GT, Urashima M, Camargo CA Jr. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ* 2017, 356, i6583. doi.org/10.1136/bmj.i6583.

-
46. Charan J, Goyal JP, Saxena D, Yadav P. Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. *J Pharmacol Pharmacother* 2012, 3, 300-303.
47. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol* 2014, 5, 151, doi: 10.3389.
48. Carvalho JTG, Schneider M, Cuppari L, Grabulosa CC. Cholecalciferol decreases inflammation and improves vitamin D regulatory enzymes in lymphocytes in the uremic environment: a randomized controlled pilot trial. *PLoS One* 2017, 12, e0179540, doi: 10.1371.
49. Xie Z, Chen J, Zheng C, Wu J, Cheng Y, Zhu S, Lin Ch, Cao Q, Zhu J, Jin T. 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. *Immunology* 2017, 152, 414–424.
50. Fawaz L, Mrad MF, Kazan JM, Sayegh S, Akika R, Khoury SJ. Comparative effect of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ on Th17 cell differentiation. *Clin Immunol* 2016, 166, 59–71.
51. Şıklar Z, Karataş D, Doğu F, Hacıhamdioğlu B, İkincioğulları A, Berberoğlu M. Regulatory T cells and vitamin D status in children with chronic autoimmune thyroiditis. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2016, 8, 276–281.
52. Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, Robert S, Miani M, Eizirik DL, Gysemans C, Mathieu C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology* 2012, 217, 1292–1300.
53. Hu J, Wan Y. Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology* 2011, 132, 307–314.
54. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014, 14, 342-357.
55. Schwartz GG, Blot WJ. Vitamin D status and cancer incidence and mortality: something new under the sun. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98, 428-430.
56. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980, 9, 227–231.

-
57. Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res* 1990, 10, 1307–1311.
58. Studzinski GP, Moore DC. Sunlight — can it prevent as well as cause cancer? *Cancer Res* 1995, 55, 4014 – 4022.
59. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 2006, 96, 252–261.
60. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98, 451–459.
61. Touvier M, Chan DSM, Lau R, Aune D. Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, 20, 1003–1016.
62. McCullough ML, Zoltick ES, Weinstein SJ, Fedirko V, Wang, M, Cook NR, Eliassen AH, Zeleniuch-Jacquotte A, Agnoli C, Albanes D, Barnett MJ, Buring JE, Campbell PT, ClendenenTV, Freedman ND, Gapstur SM, Giovannucci EL, Goodman GG, Haiman CA, Ho GYF, Horst RL, Hou T, Huang WY, JenabM, Jones ME, Joshu CE, Krogh V, Lee IM, Lee JE, MannistoS, Le Marchand L, Mondul AM, Neuhaus ML, Platz EA, Purdue MP, Riboli E, Robsahm TE, Rohan TE, Sasazuki S, Schoemaker MJ, Sieri S, Stampfer MJ, Swerdlow AJ, ThomsonCA, Tretli S, Tsugane S, Ursin G, Visvanathan K, White KK, Wu K, Yaun SS, Zhang X, Willett WC, Gail MH, Ziegler R, Gand Smith-Warner SA. Circulating vitamin D and colorectal cancer risk: an international pooling project of 17 cohorts. *J Natl Cancer Inst* 2019, 111, 158-169.
63. Weinstein SJ, Yu K, Horst RL, Ashby J, Virtamo J, Albanes D. Serum 25-hydroxyvitamin D and risks of colon and rectal cancer in Finnish men. *Am J Epidemiol* 2011, 173, 499–508.
64. Zhang H, Wen X, Zhang Y, Wei X. Vitamin D deficiency and increased risk of bladder carcinoma: a meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015, 37, 1686–1692.
65. Zhao Y, Chen C, Pan W, Gao M, He W, Mao R, Lin T, Huang J. Comparative efficacy of vitamin D status in reducing the risk of bladder cancer: a systematic review and network meta-analysis. *Nutrition* 2016, 32, 515–523.

-
66. Chen GC, Zhang ZL, Wan Z, Wang L, Weber P, Eggersdorfer M, Qin LQ, Zhang W. Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of lung cancer: a dose-response meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2015, 26, 1719–1728.
67. Zhang L, Wang S, Che X, Li X. Vitamin D and lung cancer risk: a comprehensive review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015, 36, 299–305.
68. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: circulating vitamin D and ovarian cancer risk. *Gynecol Oncol* 2011, 121, 369–375.
69. Bauer S, Hankinson S, Bertone-Johnson E, Ding EL. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Medicine* 2013, 92, 123–131.
70. Shao T, Klein P, Grossbard ML. Vitamin D and breast cancer. *Oncologist* 2012, 17, 36-45.
71. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, Mullie P, Autier P. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. *Int J Cancer* 2011, 128, 1414–1424.
72. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: serum vitamin D and breast cancer risk. *Eur J Cancer* 2010, 46, 2196–2205.
73. 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, 39, 28-48.
74. Cadeau C, Fournier A, Mesrine S, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Boutron-Ruault MC. Interaction between current vitamin D supplementation and menopausal hormone therapy use on breast cancer risk: evidence from the E3N cohort. *Am J Clin Nutr.* 2015, 102, 966-973.
75. Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, Roshangar L, Khan H, Kouhsoltani M, Maleki Dizaj S, Sharifi S. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomed Pharmacother* 2019, 109, 391-401.
76. O'Brien KM, Sandler DP, Taylor JA, Weinberg CR. Serum vitamin D and risk of breast cancer within five years. *Environ Health Perspect* 2017, 125, 077004. doi: 10.1289/EHP943.
77. Takalkar U, Asegaonkar S, Advani S. Vitamin D and prevention of breast cancer. *J Cancer Res Forecast* 2018, 1, 1-4.

-
78. Viala M., Chiba A., Thezenas S, Delmond L, Lamy PJ, Mott SL, Schroeder MC, Thomas A, Jacot W. Impact of vitamin D on pathological complete response and survival following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a retrospective study. *BMC Cancer* 2018,18, 770. doi: 10.1186/s12885-018-4686-x.
79. Sofi NY, Jain M, Kapil U, Seenu V, R L, Yadav CP, Pandey RM, Sareen N. Reproductive factors, nutritional status and serum 25(OH)D levels in women with breast cancer: A case control study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018, 175, 200-204.
80. Pulito C., Terrenato I., Di Benedetto A, Korita E, Goeman F, Sacconi A, Biagioni F, Blandino G, Strano S, Muti P, Mattolese M, Falvo E. Cdx2 polymorphism affects the activities of vitamin D receptor in human breast cancer cell lines and human breast carcinomas. *PLoS One* 2015, 10:e0124894. doi: 10.1371/journal.pone.0124894.
81. Estébanez N, Gómez-Acebo I, Palazuelos C, Llorca J, Dierssen-Sotos T. Vitamin D exposure and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Nature* 2018, *Scientific Reports* 8, 1-13.
82. Campbell M.J, 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* 1997,19, 15–27.
83. Ma Y, Yu WD, Su B, Seshadri M, Luo W, Trump DL, Johnson CS. Regulation of motility, invasion, and metastatic potential of squamous cell carcinoma by 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer* 2013, 119, 563–574.
84. Hsu JW, Yasmin-Karim S, King MR, Wojciechowski JC, Mickelsen D, Blair ML, Ting HJ, Ma WL, Lee YF. Suppression of prostate cancer cell rolling and adhesion to endothelium by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Am J Pathol* 2011, 178, 872–880.
85. Gonzalez-Sancho JM, Alvarez-Dolado M., A. Munoz. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits tenascin-C expression in mammary epithelial cells. *FEBS Lett* 1998, 426, 225-228.
86. Sung V, Feldman D. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ decreases human prostate cancer cell adhesion and migration. *Mol Cell Endocrinol* 2000, 164, 133–143.
87. Nowakowska A, Tarasiuk J. Procesy inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych opornych na chemioterapię. *Postepy Hig Med Dosw* 2017, 71, 380-397.

-
88. Cazzaniga M, Bonanni B. Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol* 2012, ID985620. doi.org/10.1155/2012/985620.
89. Janssens J, Vandeloo M. Rak piersi: bezpośrednie i pośrednie czynniki ryzyka związane z wiekiem i stylem życia. *Nowotwory J Oncol* 2009, 59, 1-159.
90. Wojciechowska U, Czaderny K, Ciuba A, Olasek P, Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. Ministerstwo Zdrowia 2018.
91. Didkowska J, Wojciechowska U, Olasek P. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2015 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. Ministerstwo Zdrowia 2017.
92. Didkowska J, Wojciechowska U, Czaderny K, Olasek P, Ciuba A. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2017 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. Ministerstwo Zdrowia 2019.
93. Tuchowska P, Worach-Kardas H, Marcinkowski J. Najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce – główne czynniki ryzyka i możliwości optymalizacji działań profilaktycznych. *Probl Hig Epidemiol* 2013, 94, 166-171.
94. Sowa M, Smuczyński W, Tarkowski M, Wójcik K, Kochański B. Analiza wybranych czynników ryzyka raka piersi – przegląd piśmiennictwa. *J Educ Health Sport* 2015, 5, 245-250.
95. Romieu II, Amadou A, Chajes V. The role of diet, physical activity, body fatness, and breastfeeding in breast cancer in young women: epidemiological evidence. *Rev Invest Clin* 2017, 69, 193-203.
96. Owiredu WK, Donkor S, Addai BW, Amidu N. Serum lipid profile of breast cancer patients. *Pak J Biol Sci* 2009, 12, 332-338.
97. Iyengar NM, Arthur R, Manson JE, Chlebowski RT, Kroenke CH, Peterson L, Cheng T-YD, Feliciano EC, Lane D, Luo J, Nassir R, Pan K, Wassertheil-Smoller S, Kamensky V, Dannenberg AJ. Association of body fat and risk of breast cancer in postmenopausal women with normal body mass index: a secondary analysis of a randomized clinical trial and observational study. *JAMA Oncol* 2019, 5, 155-163.
98. Kotepui M. Diet and risk of breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2016, 20, 13–19.

-
99. Rossi RE, Pericleous M, Mandair D, Whyand T, Caplin ME. The role of dietary factors in prevention and progression of breast cancer. *Anticancer Res* 2014, 34, 6861-6875.
100. Blackburn GL, Wang KA. Dietary fat reduction and breast cancer outcome: results from the Women's Intervention Nutrition Study (WINS). *Am J Clin Nutr* 2007, 86, 878-881.
101. Chen S, Chen Y, Shenglin Ma S, Zheng R, Zhao P, Zhang L, Liu Y, Yu Q, Deng Q, Zhang K. Dietary fibre intake and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Oncotarget* 2016, 7, 80980–80989.
102. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998, 279, 535-540.
103. Deschasaux M, Souberbielle J, Latino-Martel P, Sutton A, Charnaux N, Druesne-Pecollo N, Galan P, Hercberg S, Le Clerc S, Kesse-Guyot E, Ezzedine K, Touvier M. Weight status and alcohol intake modify the association between vitamin D and breast cancer risk. *J Nutr* 2016, 146, 576-585.
104. NCCN Guidelines in oncology. Breast Cancer Version 2. 2020. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf. Dostęp: 29.01.2020
105. Więckowska B. Proces leczenia w Polsce- analiza i modele, *Onkologia*, tom I. Ministerstwo Zdrowia 2015.
106. Jassem J, Krzakowski M. Rak piersi, *Onkol Prakt Klin Edu* 2018, 4, 209-256.
107. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010, 15, 955-960.
108. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015, 26, 8-30.
109. Spronk, I, Schellevis FG, Burgers JS, Bock GH, de Korevaar JC. Incidence of isolated local breast cancer recurrence and contralateral breast cancer: a systematic review. *Breast*: 2018, 39, 70-79.

-
110. Belkacemi Y, Nivin EH, Besnard C, Majdoul S, Gligorov J. Local and regional breast cancer recurrences: salvage therapy options in the new era of molecular subtypes. *Front Oncol* 2018, doi.org/10.3389/fonc.2018.00112.
111. Mahvi DA, Liu R, Grinstaff MW, Colson YL, Raut CHP. Local cancer recurrence: the realities, challenges, and opportunities for new therapies. *CA Cancer J Clin* 2018, 68, 488–505.
112. <http://onkologia.org.pl/nowotwory-piersi-kobiet/#w>. Dostęp: 17.11.2020
113. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 2 lipca 2018 r. w sprawie zaleceń postępowania dotyczących diagnostyki i leczenia raka piersi. *DZ. URZ. Min. Zdr.* 2018. 53.
114. Gnant M, Dubsy P, Fitzal F, Blaha P, Schoppmann S, Steger G, Marth C, Samonigg H, Hüttner K, Fohler H, Ruecklinger E, Jakesz R, Greil R. Austrian breast and colorectal cancer study group: maintaining bone density in patients undergoing treatment for breast cancer: is there an adjuvant benefit? *Clin Breast Cancer* 2009, 9, 18-27.
115. Rusińska A, Płudowski P, Walczak M, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska D, Dobrzańska A, Franek E, Helwich E, Jackowska T, Kalina M, Konstatntynowicz J, Książyk J, Lewiński A, Łukaszewicz J, Marcinowska-Suchowierska E, Mazur A, Michałus I, Peregud-Pogorzelski J, Romanowska H, Ruchała M, Socha P, Szalecki M, Wielgoś M, Zwolińska D, Zygmunt A. Rekomendacje. Zasady suplementacji i leczenia witaminą D- nowelizacja 2018. *Pospe Neonatol* 2018, 24, 1-24.
116. Kłęk S, Jankowski M, Kruszewski WJ, Fijuth J, Kapala A, Kabata P, Wysocki P, Krzakowski M, Rutkowski P. Standardy leczenia żywieniowego w onkologii. *Onkol Prakt Klin Edu* 2015, 1, 19-36.
117. Pilz S, Hahn A, Schön C, Wilhelm M, Obeid R. Effect of two different multimicronutrient supplements on vitamin D status in women of childbearing age: a randomized trial. *Nutrients* 2017, 9, 1-15.
118. Kotlarczyk MP, Perera S, Ferchak MA, Nace DA, Resnick NM, Greenspan SL. Vitamin D deficiency is associated with functional decline and falls in frail elderly women despite supplementation. *Osteoporos Int* 2016, 12, 1-7.
119. Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Binkley N, Clarke BL, Steven T, Harris ST, Hurley DL, Kleerekoper M, Lewiecki EM, Miller PD, Narula HS, Pessah-Pollack R, Tangpricha V,

Wimalawansa SJ, Watts NB. American Association Of Clinical Endocrinologist and American College of Enocrinology Clinical Practice Guideline for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis – 2016. *Endocr Pract* 2016, 22, 1-42.

120. German Nutrition Society. New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 2012, 60, 241-246.

121. Runowicz CD, Leach CR, Henry NL, Henry KS, Mackey HT, Cowens-Alvarado RL, Cannady RS, Pratt-Chapman ML, Edge SB, Jacobs LA, Hurria A, Marks LB, La Monte SJ, Warner E, Lyman GH, Ganz PA. American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology Breast Cancer Survivorship Care Guideline. *J Clin Oncol* 2016, 34, 611-635.

122. Coleman R, Body JJ, Aapro M, Hadji P, Herrstedt J. ESMO Guidelines Working Group: Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2014, 25, 124-137.

123. Shirazi L, Almquist M, Borgquist S, Malm J, Manjer J. Serum vitamin D (25OHD₃) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: a nested case-control study. *Breast* 2016, 28, 184-190.

124. Palmer J, Gerlovin H, Bethea T, Bertrand KA, Holick MF, Ruiz-Narvaez EN, Wise LA, Haddad SA, Adams-Campbell LL, Kaufman HW, Rosenberg L, Cozier YC. Predicted 25-hydroxyvitamin D in relation to incidence of breast cancer in a large cohort of African American women. *Breast Cancer Res* 2016, 18, 86. doi: 10.1186/s13058-016-0745-x.

125. Janbabai G, Shekarriz R, Hassanzadeh H, Aarabi M, Borhani SS. A survey on the relationship between serum 25-hydroxy vitamin D level and tumor characteristics in patients with breast cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2016, 10, 30-36.

126. Extermann M, Leeuwenburgh C, Samiiian L, Sehovic M, Xu J, Cubitt C, Jacobsen PB, Pahor M, Grobmyer SR, Manini TM. Impact of chemotherapy on medium-term physical function and activity of older breast cancer survivors, and associated biomarkers. *J Geriatr Oncol* 2017, 8, 69-75.

127. Alipour S, Hadji M, Hosseini L, Omranipour R, Saberi A, Seifollahi A, Bayani L, Shirzad N. Levels of serum 25-hydroxy-vitamin d in benign and malignant breast masses. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, 15, 129-132.

-
128. Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A. Association of vitamin D level with clinicopathological features in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015, 16, 4881-4883.
129. Acevedo F, Pérez V, Pérez-Sepúlveda A, Florenzano P, Artigas R, Medina L, Sánchez C. High prevalence of vitamin D deficiency in women with breast cancer: The first Chilean study. *Breast* 2016, 29, 39-43.
130. Williams J, Aggarwal A, Swami S, Krishnan AV, Ji L, Albertelli MA, Feldman BJ. Tumor autonomous effects of vitamin D deficiency promote breast cancer metastasis. *Endocrinology* 2016, 157, 1341-1347.
131. Hu K, Callen D, Li J, Zheng H. Circulating vitamin D and overall survival in breast cancer patients: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *Integr Cancer Ther* 2018, 17, 217-225.
132. Madden J, Murphy L, Zgaga L, Bennett K. De novo vitamin D supplement use post-diagnosis is associated with breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 2018, 172, 179-190.
133. Tocco-Tussardi I, Presman B, Huss F. Want correct percentage of TBSA burned? Let a Layman do the assessment. *J Burn Care Res* 2018;39, 295-301.
134. Jarosz M. Normy żywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. Wyd. IŻŻ. Warszawa, 2012.
135. Stanowisko Zespołu Ekspertów. Polskie zalecenia dotyczące profilaktyki niedoborów witaminy D – 2009. *Ginekol Pol* 2010, 81, 149-153.
136. Apoe O, Jung S, Liu H, Seisler DK, Charlamb J, Zekan P, Wang LX, Unzeitig GW, Garber J, Marshall J, Wood M. Effect of Vitamin D supplementation on breast cancer biomarkers: CALGB 70806 (Alliance) Study Design and Baseline Data. *Am J Hematol Oncol* 2016, 12, 4-9.
137. Youlten D, Cramb S, Dunn N, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol* 2012, 36, 237-248.
138. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZH, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017, 13, 1387–1397.

-
139. Smoleń E, Dobrowolska B. Wiedza pielęgniarek województwa lubelskiego i podkarpackiego w zakresie czynników ryzyka nowotworów piersi. *Med Og Nauk Zdr* 2014, 1, 6-11.
140. Kolak A, Kamińska M, Sygit K, Budny A, Surdyka D, Kukielka-Budny B, Burdan F. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agr Env Med* 2017, 24, 549–553.
141. Chang CCh, Chen SH. Developing a novel machine learning-based classification scheme for predicting SPCs in breast cancer survivors. *Front Genet* 2019, 10, 848. doi: 10.3389/fgene.2019.00848.
142. Welsh JE. Function of the vitamin D endocrine system in mammary gland and breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2017, 453, 88-95.
143. Mohr SB, Gorham ED, Kim J, Hofflich H, Garland CF. Meta-analysis of vitamin D sufficiency for improving survival of patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2014, 34, 1163-1166.
144. Kuzmickiene I, Atkocius V, Aleknavicius E, Ostapenko V. Impact of season of diagnosis on mortality among breast cancer survivors. *J Cancer Res Ther* 2018, 14, 1091-1097.
145. Shi L, Nechuta S, Gao Y-T, Zheng Y, Dorjgochoo T, Wu J, Cai Q, Zheng W, Lu W, Shu XO. Correlates of 25-hydroxyvitamin D among Chinese breast cancer patients. *PLoS One* 2014, 9, 86467, doi: 10.1371/journal.pone.0086467.
146. Lips P, Cashman KD, Lamberg-Allardt CH, Bischoff-Ferrari HA, Obermayer-Pietsch B, Bianchi ML, Stepan J, El-Hajj Fuleihan G, Bouillon R. Current vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent vitamin D deficiency: a position statement of the European Calcified Tissue Society. *Eur J Endocrinol* 2019, 180, 23-54.
147. Płudowski P, Ducki C, Konstantynowicz J, Jaworski M. Vitamin D status in Poland. *Pol Arch Med Wewn* 2016, 126, 530-539.
148. Rabenberg M, Scheidt-Nave Ch, Busch M, Busch MA, Rieckmann N, Hintzpeter B, Mensik GBM. Vitamin D status among adults in Germany – results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health* 2015, 15, 641. doi: 10.1186/s12889-015-2016-7.

-
149. Navarro Valverde C, Quesada Gómez JM. Vitamin D, determinant of bone and extra bone health. Importance of vitamin D supplementation in milk and dairy products. *Nutr Hosp* 2015, 31, 18-25.
150. Karthikayan A, Sureshkumar S, Kadambari D, Vijayakumar Ch. Low serum 25-hydroxy vitamin D levels are associated with aggressive breast cancer variants and poor prognostic factors in patients with breast carcinoma. *Arch Endocrinol Metab* 2018, 62, 452-459.
151. Krusińska B, Wadolowska L, Biernacki M, Slowinska MA, Drozdowski M. Serum Vitamin-Mineral Profiles: Associations with postmenopausal breast cancer risk including dietary patterns and supplementation. A Case-Control Study. *Nutrients* 2019, 11. 2244. doi: 10.3390/nu11092244.
152. McDonnell SL, Baggerly C, French CB, Baggerly LL, Garland CF, Gorham ED, Lappe JM, Heaney RP. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations 40 ng/mL are associated with >65% lower cancer risk: pooled analysis of randomized trial and prospective cohort study. *PLoS One* 2016, 11, e0152441. doi: 10.1371/journal.pone.0152441.
153. Shekarriz-Foumani R, Khodaie F. The correlation of plasma 25-hydroxyvitamin D efficiency with risk of breast neoplasms: a systematic review. *Iran J Cancer Prev* 2016, 9, 1-7.
154. Baumann M, Dani S, Dietrich D, Hochstrasser A, Klingbiel D, Mark MT, Riesen WF, Ruhstaller T, Templeton AJ, Thürlimann B. Vitamin D levels in Swiss breast cancer survivors. *Swiss Med Wkly* 2018, 148, w14576, doi: 10.4414/smw.2018.14576.
155. Andersen MR, Sweet E, Hager S, Gaul M, Dowd F, Standish LJ. Effects of Vitamin D use on health-related quality of life of breast cancer patients in early survivorship. *Integr Cancer Ther* 2019, 18, 1-12.
156. Machado MRM, de Sousa Almeida-Filho B, De Luca Vespoli H, Schmitt EB, Nahas-Neto J, Nahas EAP. Low pretreatment serum concentration of vitamin D at breast cancer diagnosis in postmenopausal women. *Menopause* 2019, 26, 293-299.
157. Woon FC, Chin YS, Ismail IH, Batterham M, Abdul Latiff AH, Gan WY, Appannah G, Mohammed Hussien SH, Edi M, Tan ML, Chan YM. Vitamin D deficiency during pregnancy

and its associated factors among third trimester Malaysian pregnant women. *PLoS One* 2019, 24, 1-12.

158. Oliveira Sedyama CM, Dias MM, Pessoa MC, Queiroz AR, Suhett LG, Freitas RN, De Paula SO, Peluzio MD Lifestyle and vitamin D dosage in women with breast cancer. *Nutr Hosp* 2016, 33, 1179-1186.

159. Krzyścin JW, Jarosławski J, Sobolewski PS. A mathematical model for seasonal variability of vitamin D due to solar radiation. *J Photochem Photobiol B* 2011, 105, 106-112.

160. Guo J, Lovegrove J, Givens D. A Narrative review of the role of foods as dietary sources of vitamin D of ethnic minority populations with darker skin: the underestimated challenge. *Nutrients* 2019, 11, 1-9.

161. Zhang X, Harbeck N, Jeschke U, Doisneau-Sixou S. Influence of vitamin D signaling on hormone receptor status and HER2 expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017, 143, 1107-1122.

162. Fohner AE, Wang Z, Yracheta J, O'Brien DM, Hopkins SE, Black J, Philip J, Wiener HW, Tiwari HK, Stapleton PL, Tsai JM, Thornton TA, Boyer BB, Thummel KE. Genetics, diet, and season are associated with serum 25-hydroxycholecalciferol concentration in a Yup'ik Study Population from Southwestern Alaska. *J Nutr* 2016, 146, 318-325.

163. Fayet-Moore F, Brock K, Wright J, Ridges L, Small P, Seibel MJ, Conigrave AD, Mason RS. Determinants of vitamin D status of healthy office workers in Sydney, Australia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019, 189, 127-134.

164. Eliassen AH, Warner ET, Rosner B, Collins LC, Beck AH, Quintana LM, Tamimi RM, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer in women followed over 20 years. *Cancer Res* 2016, 76, 5423-5430.

165. Kanatani KT, Nakayama T, Adachi Y, Hamazaki K, Onishi K, Konishi Y, Kawanishi Y, Go T, Sato K, Kurozawa Y, Inadera H, Konishi I, Sasaki S, Oyama H. Japan Environment and Children's Study Group high frequency of vitamin D deficiency in current pregnant Japanese women associated with UV avoidance and hypo-vitamin D diet. *PLoS One* 2019, 14, 1-10.

166. O'Sullivan F, Raftery T, van Weele M, van Geffen J, McNamara D, O'Morain C, Mahmud N, Kelly D, Healy M, O'Sullivan M, Zgaga L. Sunshine is an important determinant of vitamin

D status even among high-dose supplement users: secondary analysis of a randomized controlled trial in Crohn's disease patients. *Photochem Photobiol* 2019, 5, 1060-1067.

167. Engel P, Fagherazzi G, Boutten A, Dupré T, Mesrine S, Boutron-Ruault M-Ch, Clavel-Chapelon F. Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, 19, 2341–2350.

168. Mohr SB, Gorham ED, Alcaraz JE, Kane CJ, Macera CA, Parsons JK, Wingard DL, Garland CF. Serum 25-hydroxyvitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *Anticancer Res* 2011, 31, 2939–2948.

169. Tommie J, Pinney S, Nommsen-Rivers L. Serum vitamin D status and breast cancer risk by receptor status: a systematic review. *Nutr Cancer* 2018, 70, 804–820.

170. Park S, Lee DH, Jeon JY, Ryu J, Kim S, Kim JY, Park HS, Kim SI, Park BW. Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency and increased risk of breast cancer among Korean women: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 2015, 152, 147–154.

171. Kim Y, Franke AA, Shvetsov YB, Wilkens LR, Cooney RV, Lurie G, Maskarinec G, Hernandez BY, Le Marchand L, Henderson BE, Kolonel LN, M Goodman MT. Plasma 25-hydroxyvitamin D₃ is associated with decreased risk of postmenopausal breast cancer in whites: A nested case-control study in the multiethnic cohort study. *BMC Cancer* 2014,14, 29.

172. Shaukat N, Jaleel F, Ali Moosa F, Qureshi NA. Association between Vitamin D deficiency and Breast Cancer. *Pak J Med Sci* 2017, 33, 645-649.

173. Zahedirad M, Asadzadeh S, Nikooyeh B, Nezestani TR, Khorshidian N, Zouseti M, Mortayavian AM. Fortification aspects of vitamin D in dairy products: a review study. *Int Dairy J* 2019, 94, 53-64.

174. Hoel GD, de Gruijl FR. Sun exposure public health directives. *Int J Environ Res Public Health* 2018, 15, 1-5.

175. Matsouka LY, Wortsman J, Hanifan N, Holick MF. Chronic sunscreen use decreases circulating concentration of 25-hydroxyvitamin D: a preliminary study. *Arch Dermatol* 1988, 124, 1802-1804.

-
176. Dębska O, Kamińska-Winciorek G, Śpiewak R. Czy stosowanie kosmetyków przeciwsłonecznych wpływa na poziom witaminy D w organizmie? *Pol Med J* 2013, 204, 368-370.
177. Mousavi SE, Amini H, Heydarpour P, Chermahini FA, Godderis L. Air pollution, environmental chemicals, and smoking may trigger vitamin D deficiency: Evidence and potential mechanisms. *Environ Int* 2019, 122, 67-90.
178. Saternus R, Vogt T, Reichrath J. A critical appraisal of strategies to optimize vitamin D status in Germany, a population with a western diet. *Nutrients* 2019, 11, 2682. doi: 10.3390/nu11112682.
179. Grant WB, Fakhoury HMA, Karras SN, Al Anouti F, Bhattoa HP. Variations in 25-hydroxyvitamin D in countries from the Middle East and Europe: the roles of UVB exposure and diet. *Nutrients* 2019, 11, 2065. doi: 10.3390/nu11092065.
180. Dimakopoulos I, Magriplis E, Mitsopoulou AV, Karageorgou D, Bakogianni I, Micha R, Michas G, Chourdakis M, Ntouroupi T, Tsaniklidou SM, Argyri K, Panagiotakos DB, Zampelas A. Association of serum vitamin D status with dietary intake and sun exposure in adults. *Clin Nutr ESPEN* 2019, 34, 23-31.
181. Bischofova S, Dofkova M, Blahova J, Kavrik R, Nevrla J, Rehurkova I, Ruprich J. Dietary intake of vitamin D in the Czech Population: a comparison with dietary reference values, main food sources identified by a total diet study. *nutrients* 2018, 10, 1452. doi:10.3390/nu10101452.
182. Pilz S, März W, Cashman KD, Kiely ME, Whiting SJ, Holick MF, Grant WB, Pludowski P, Hilgsmann M, Trummer C, Schwetz V, Lerchbaum E, Pandis M, Tomaschitz A, Grubler MR, Gaksch M, Verheyen N, Hollis BW, Rejnmark L, Karras SN, Hahn A, Bischoff-Ferrari HA, Reichrath J, Jorde R, Elmadfa I, Vieth R, Scragg R, Calvo MS, van Schoor NM, Bouillon R, Lips P, Iitkonen ST, Martineau AR, Lamberg-Allardt C, Zittermann A. Association between vitamin D deficiency and breast cancer. *Pak J Med Sci* 2017, 33, 645-649.
183. Dyrektywa 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 10 czerwca 2002 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstwa państw członkowskich odnoszącego się do suplementów diety (Dz.U. L 183, 12.07.2002).
184. Dymkowska-Malesa M, Walczak Z. Suplementacja w sporcie. *Now Lek* 2011, 80, 3, 199–204.

-
185. Wierzejska R. Dose of the vitamin D in prenatal supplements and the current prevention its deficiency at mothers and newborns. *Gin Pol Med Project* 2015, 3, 49–53.
186. Thorne-Lyman A, Fawzi WW. Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: A systematic review and metaanalysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012, 26, 75–90.
187. Park S, Bae JH. Probiotics for weight loss: a systematic review and metaanalysis. *Nutr Res* 2015, 35, 566–575.
188. Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring JE, Manson JE. Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease. *JAMA* 2008, 299, 2027–2036.
189. Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briançon S, Blacher J, Harcberg S. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular disease: a randomized placebo controlled trial. *BMJ* 2010, 341, 62–73.
190. Armitage JM, Bowman L, Clarke RJ, Wallendszus K, Bulbulia R, Rahimi K, Haynes R, Parish S, Sleight P, Peto R, Collins R. Effects of homocysteine- lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA* 2010, 303, 2486–2494.
191. Jarosz M. Normy żywienia dla populacji Polski. Instytut Żywności i Żywienia. 2017. Warszawa.
192. Jenab M, Salvini S, van Gils CH, Brustad M, Shakya-Shrestha S, Buijsse B, Verhagen H, Touvier M, Biessy C, Wallström P, Bouckaert K, Lund E, Waaseth M, Roswall N, Joensen AM, Linseisen J, Boeing H, Vasilopoulou E, Dilis V, Sieri S, Sacerdote C, Ferrari P, Manjer J, Nilsson S, Welch AA, Travis R, Boutron-Ruault MC, Niravong M, Bueno-de-Mesquita HB, van der Schouw YT, Tormo MJ, Barricarte A, Riboli E, Bingham S, Slimani N. Dietary intakes of retinol, beta-carotene, vitamin D and vitamin E in the european prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Eur J Clin Nutr* 2009, 63, 150–178.
193. Novaković R, Cavelaars AE, Bekkering GE, Roman-Viñas B, Ngo J, Gurinović M, Glibetić M, Nikolić M, Golesorkhi M, Medina MW, Satalić Z, Geelen A, Serra Majem L, van't Veer P, de Groot LC. Micronutrient intake and status in Central and Eastern Europe compared

with other European countries, results from the EURRECA network. *Public Health Nutr* 2013, 16, 824-840.

194. Ten Haaf D, Balvers M, Timmers S, Eijsvogels TMH, Hopman MTE, Klein Gunnewiek JMT. Determinants of vitamin D status in physically active elderly in the Netherlands. *Eur J Nutr* 2019, 58, 3121–3128.

195. Jarosz J, Kapała A, Kłęk S, Misiak M, Bakinowska B, Czaplińska M, Czarnecki M, Czarnuszewicz M, Doboszyński T, Dziura R, Hetman K, Kalinowska B, Karwowska K, Krawczyk J, Kruczyk I, Lange E, Oczkowski P, Ornat M, Pałamarz-Żarczyńska A, Piesoczyński R, Smoliński P, Stańczyk M, Stryjowska A, Tolińska M, Wikłacz R, Wollak-Lewandowska M, Wyleżał I, Zmarzły A, Jassem J, Krzakowski M. Konferencja uzgodnieniowa: problemy żywieniowe w polskiej onkologii. *Nowotwory J Oncol* 2012, 62, 221-229.

196. Kimiafar K, Sarbaz M, Shahid Sales S, Esmaili M, Javame Ghazvini Z. Breast cancer patients' information needs and information-seeking behavior in a developing country. *Breast* 2016, 28, 156-160.

197. Genton L, Kyle UG, Balmer Majno S, Pichard C. Body Composition changes in breast cancer patients during curative radiation therapy. *Eur E J Clin Nutr Metab* 2006, 1, 2-8.

198. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and breast cancer survivors. [online:dietandcancerreport.org](http://online.dietandcancerreport.org). Dostęp: 22.02.2020.

199. Karavasiloglou N, Pestoni G, Faeh D, Rohrmann S. Post-diagnostic diet quality and mortality in females with self-reported history of breast or gynecological cancers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Nutrients* 2019, 11, 2558. doi: 10.3390/nu11112558.

200. Schwedhelm C, Boeing H, Hoffmann G, Aleksandrova K, Schwingshackl L. Effect of diet on mortality and cancer recurrence among cancer survivors: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutr Rev* 2016, 74, 737–748.

201. Kantor ED, Rehm CD, Du M, White E, Giovannucci EL. Trends in dietary supplement use among US adults from 1999-2012. *JAMA* 2016, 316, 1464-1474.

-
202. National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Examination Survey. <https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm>. Dostęp: 26.01.2018.
203. Zhang X, Niu W. Meta-analysis of randomized controlled trials on vitamin D supplement and cancer incidence and mortality. *Biosci Rep* 2019, 39, BSR20190369. doi: 10.1042/BSR20190369.
204. Keum N, Lee DH, Greenwood DC, Manson JE, Giovannucci E. Vitamin D supplementation and total cancer incidence and mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 2019, 30, 733-743.
205. Hossain S, Beydoun MA, Beydoun HA, Chen X, Zonderman AB, Wood RJ. Vitamin D and breast cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr ESPEN* 2019, 30, 170–184.
206. Griffin N, Dowling M. Vitamin D supplementation and clinical outcomes in cancer survivorship. *Br J Nurs* 2018, 27, 1121-1128.
207. Grant WB. A review of the evidence supporting the Vitamin D-cancer related hypothesis in 2017. *Anticancer Res* 2018, 38, 1121-1236.
208. Institute of Medicine (US). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Committee to review dietary reference intakes for vitamin D and calcium. 2011. Washington. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/> Dostęp: 11.12.2019.
209. Zittermann A, Trummer C, Theiler-Schwetz V, Lerchbaum E, Keppel MH, Grübler MR, März W, Pandis M. Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocr Connect* 2019, 8, 27- 43.
210. Roth DE, Abrams SA, Aloia J, Bergeron G, Bourassa MW, Brown KH, Calvo MS, Cashman KD, Combs G, De-Regil LM, Jefferds ME, Jones KS, Kapner H, Martineau AR, Neufeld LM, Schleicher RL, Thacher TD, Whiting SJ. Global prevalence and disease burden of vitamin D deficiency: a roadmap for action in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci* 1430, 44-79.
211. Mo M, Wang S, Chen Z, Muyiduli X, Wang S, Shen Y, Shao B, Li M, Chen D, Chen Z, Yu Y. A systematic review and meta-analysis of the response of serum 25-hydroxyvitamin D

concentration to vitamin D supplementation from RCTs from around the globe. *Eur J Clin Nutr* 2019, 73, 816-834.

212. Madden JM, Duffy MJ, Zgaga L, Bennett K. Trends in vitamin D supplement use in a general female and breast cancer population in Ireland: a repeated cross-sectional study. *PLoS One* 2018, 13, 1-7.

213. Tham YL, Sexton K, Weiss HL, Elledge RM, Friedman LC, Kramer RM. The adherence to practice guidelines in the assessment of bone health in women with chemotherapy-induced menopause. *J Support Oncol* 2006, 4, 295-298.

214. Bošković L, Gašparić M, Petković M, Gugić D, Lovasić IB, Soldić Ž, Miše BP, Dabelić N, Vazdar L, Vrdoljak E. Bone health and adherence to vitamin D and calcium therapy in early breast cancer patients on endocrine therapy with aromatase inhibitors. *Breast* 2017, 31, 16-19.

215. Heaney RP. Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008, 3, 1535–1541.

216. Gallagher JC, Sai A, Templin T, Smith L. Dose response to vitamin D supplementation in postmenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2012, 156, 425-437.

217. de Las Peñas R, Majem M, Perez-Altozano J, Virizuela JA, Cancer E, Diz P, Donnay O, Hurtado A, Jimenez-Fonseca P, Ocon MJ. SEOM clinical guidelines on nutrition in cancer patients (2018). *Clin Transl Oncol* 2019, 21, 87–93.

218. Arends J, Bachmann P, Baracos V, Barthelemy N, Bertz H, Bozzetti F, Fearon K, Hütterer E, Isenring E, Kaasa S, Krznaric Z, Laird B, Larsson M, Laviano A, Mühlebach S, Muscaritoli M, Oldervoll L, Ravasco P, Solheim T, Strasser F, de van der Schueren M, Preiser JC. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clin Nutr* 2017, 36, 11-48.

219. O'Brien KM, Sandler DP, House M, Taylor JA, Weinberg CR. The association of a breast cancer diagnosis with serum 25-hydroxyvitamin D concentration over time. *Am J Epidemiol* 2019, 188, 637-645.