

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristina Bišof

POVEZANOST C-REAKTIVNOG PROTEINA I VITAMINA D U SHIZOFRENIJI

U Zagrebu, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Nade Vrkić te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. SHIZOFRENIJA	1
1.1.1. Epidemiologija i etiologija	1
1.1.2. Dijagnostički kriteriji	2
1.1.3. Terapija	3
1.2 VITAMIN D	4
1.2.1. Fiziološka uloga	4
1.2.2. Struktura	6
1.2.3. Metabolizam	6
1.2.4. Uloga u psihičkim oboljenjima	7
1.3. C-REAKTIVNI PROTEIN	11
1.3.1. Fiziološka uloga	11
1.3.2. Struktura	12
1.3.3. Metabolizam	13
1.3.4. Uloga u psihičkim oboljenjima	14
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	16
3.1. Ispitanici	17
3.2. Metode	17
3.2.1. Vitamin D	18
3.2.2. CRP	19
3.2.3. Lipidi	20
3.3. Statističke metode	20
4. REZULTATI	22
4.1. Deskriptivna statistika	22
4.2. Usporedba koncentracija vitamina D između skupinama ispitanika	23
4.3. Povezanost vitamina D i CRP-a u ispitanika oboljelih od shizofrenije	26
4.4. Međusobna povezanost vitamina D, CRP-a, lipida, životne dobi i trajanja bolesti SHI ispitanika	27
5. RASPRAVA	29
7. ZAHVALE	34

8. LITERATURA.....	35
9. SAŽETAK	40
10. SUMMARY	42

POPIS KRATICA

AMB	skupina vanjskih pacijenata
CRP	C-reaktivni protein
DUP	trajanje neliječene psihoze (engl. <i>duration of untreated psychosis</i>)
IF	interferon
IFCC	Međunarodna federacija za kliničku kemiju (engl. <i>International Federation of Clinical Chemistry</i>)
IJ	skupina pacijenata na intenzivnom liječenju
IL	interleukin
MARRS	membranski brzo odgovarajući receptor za steroide (eng. <i>membrane associated rapid response steroid binding receptor</i>)
NE-PSIH	heterogena populacija ne-psihijatrijskih pacijenata
NGF	faktor rasta neurona (eng. <i>nerve growth factor</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	dušikov oksid
NSAID	ne-steroidni protuupalni lijekovi (eng. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
PANSS	ljestvica pozitivnih i negativnim sindroma (eng. <i>positive and negative syndrome scale</i>)
PTH	paratireoidni hormon
RANKL	receptor aktivator liganda nuklearnog faktora κ -B (eng. <i>receptor activator of nuclear factor κ-B ligand</i>)
RDA	preporučena dnevna količina (eng. <i>recommended dietary allowance</i>)
SHI	skupina pacijenata oboljelih od shizofrenije
VDR	vitamin D receptor

1. UVOD

1.1. SHIZOFRENIJA

Shizofrenija je mentalni poremećaj obilježen nemogućnošću raspoznavanja stvarnosti, a praćen je prividima i halucinacijama zbog disfunkcije talamičkog filtriranja. Naziv shizofrenija je složenica dviju grčkih riječi koje označavaju razum i rascjep. Zbog izrazite stigme i kroničnog tijeka, bolest je velik teret pojedincu i medicinskoj zajednici, kako zbog nesuradljivosti pacijenta, tako i zbog velike stope komorbiditeta, posljedične socijalne izolacije te nuspojava vezanih uz primjenu antipsihotika koji su najčešća terapijska opcija. Stope kardiovaskularnih i pulmonarnih oboljenja su povišene za populaciju oboljelih od shizofrenije te im je životni vijek snižen u odnosu na generalnu populaciju (First i Ward, 2013). Navedene činjenice upućuju na nužnost istraživanja etiopatogeneze i novih terapijskih pristupa kako bi pacijentima bila pružena adekvatna njega te se izbjeglo traumatiziranje već ugrožene populacije. Karakteristični simptomi shizofrenije uključuju psihozu (gubitak sposobnosti razlučivanja stvarnog od nestvarnog), halucinacije (najčešće auditorne i vizualne), smanjenu kognitivnu sposobnost, neorganiziranost ponašanja i govora kao posljedica kaotičnih misli te abnormalnu motoriku (npr katatoničnost). Tijekom bolesti se izmjenjuju faze akutne psihičke dekompenzacije, najčešće zbog prestanka uzimanja terapije, i faze remisije (potpune ili djelomične).

1.1.1. Epidemiologija i etiologija

Prevalencija shizofrenije se nalazi u rasponu od 0,3% do 0,7%, a varijacije postoje za rasu, etnicitet, geografski položaj te za ishodišta imigranata i njihove potomke (First i Ward, 2013). Do pojave psihotičnih epizoda najčešće dolazi krajem puberteta i prije 30.-ih godina, kod muškaraca ranije nego kod žena. Ispoljavanje bolesti tijekom djetinjstva ili u kasnijoj životnoj dobi je rijetko i tada se naziva parafrenijom. Ranije ispoljavanje bolesti općenito upućuje na lošiju prognozu, a do očitovanja dolazi postepeno - simptomi traju godinama prije dekompenzacije i postavljanja valjane dijagnoze.

Etiopatogeneza shizofrenije nije poznata, ali se smatra da je u podlozi kombinacija genetskih predispozicija i okolišnih faktora, tzv. stresora (kemijskih ili društvenih), koji se smatraju okidačem za pojavu psihoze. Znanstvena istraživanja pokazala su da pacijenti sa shizofrenijom imaju povišene upalne biljege što navodi

na hipotezu da upalni proces ima ulogu u razvoju bolesti. Dokazano je veća pojavnost shizofrenije u područjima udaljenijim od ekvatora, kod novorođenčadi rođene u zimskim mjesecima, boravkom u hladnijim klimama, u urbanim populacijama te u populacijama tamnoputih migranata (Salavert i sur., 2017.). Nadalje, shizofreniju karakteriziraju biološke promjene u arhitekturi mozga poput smanjenog volumena hipokampusa (Shivakumar i sur., 2015), proširenih moždanih komora (Gaser i sur., 2004) te promjene u regulaciji gotovo svih neurotransmiterskih sustava: serotoninski, dopaminski, adrenergički, acetilkolinski, glutamatni te sustav GABA (γ-aminomaslačne kiseline) (Folnegović-Grošić, 2016). Genetski faktori snažno utječu na procjenu rizika od razvoja shizofrenije, ali većina dijagnosticiranih pacijenata nemaju obiteljsku povijest psihoze (First i Ward, 2013). Prilikom razgovora sa pacijentom važno je ispitati hereditet jer je u slučajevima pozitivne obiteljske povijesti psihoze tijekom bolesti teži i simptomi se ranije ispoljavaju. Smatra se da je shizofrenija dio grupe kompleksnih genetskih poremećaja u čiju je patogenezu uključeno mnogo gena, a svaki od njih dijelom sudjeluje u determinaciji fenotipa (Gejman i sur., 2010). Epidemiološke studije pokazuju da je shizofrenija posebno česta kod jednojajčanih blizanaca, ali ni u tom slučaju pojavnost nije 100% što upućuje da nije isključivo genetski determinirana (Folnegović-Grošić, 2016). Traume i stresni podražaji u prenatalnom i perinatalnom razdoblju su također povezani sa povećanim rizikom od bolesti, ali samo mala frakcija djece odrasle u takvim okolnostima kasnije pokazuje znakove shizofrenije (First i Ward, 2013).

1.1.2. Dijagnostički kriteriji

Prema DSM-5 Dijagnostičkom i statističkom priručniku za duševne poremećaje (First i Ward, 2013), za dijagnozu shizofrenije moraju biti prisutna barem dva od navedenih simptoma i jedan od njih mora biti 1.,2. ili 3.:

1. Deluzije
2. Halucinacije
3. Neorganiziranost govora
4. Kaotično ili katatonično ponašanje
5. Negativni simptomi (pr. apatija, anhedonija)

Znakovi uznemirenost moraju perzistirati kroz period od najmanje šest mjeseci, a unutar navedenih šest mjeseci, barem jedan moraju biti prisutni simptomi po iznad

spomenutom kriteriju (simptomi akutne faze). Također je prisutna disfunkcija u najmanje jednom od važnih područja funkcioniranja poput higijene, obavljanja dužnosti na radnom mjestu i interpersonalnih odnosa. Nadalje, potrebno je eliminirati ostale faktore kao uzroke simptoma (zlouporaba droga, lijekovi, nedijagnosticirana bolest).

1.1.3. Terapija

U liječenju shizofrenije, najvažnije je poremećaj otkriti što prije jer se time skraćuje trajanje neliječene psihoze (DUP, duration of untreated psychosis). Ranijom intervencijom dolazi do sekundarne prevencije razvoja negativne psihopatologije. Kraći DUP sprječava eskalaciju negativnih simptoma i kod takvih pacijenata intenzitet deficita ostaje na razini na kojoj je liječenje počelo te pozitivno korelira sa kognitivnim i socijalnim funkcioniranjem pacijenta (Folnegović-Grošić, 2016).

Liječenje shizofrenije se temelji na primjeni antipsihotika, skupini lijekova otkrivenih slučajno u 1950-ima tijekom sinteze novih antiemetičkih i antihistaminskih lijekova iz opioidnog analgetika petidina nakon što je primjećeno da su pacijenti nakon administracije „litičkog koktela“ smireni, opušteni i indiferentni (Ramachandriah, 2009). Prvi takav lijek bio je haloperidol, nakon njega je uslijedio klorpromazin i započela je era psihofarmakologije te su zamijenjene rudimentarne metode poput elektrokonvulzivne terapije, frontalne lobotomije i inzulinske kome. Antipsihotici se ugrubo dijele na tipične (fenotiazidi, butirofenoni) i atipične (benzamidi). Djelovanje antipsihotika razlikuje se prema intenzitetu blokade dopaminskih i drugih receptora, brzini disocijacije te afinitetu spram ostalih neurotransmiterskih sustava. Svi antipsihotici su antagonisti dopaminskih receptora, sukladno teoriji da je pojačana dopaminska aktivnost odgovorna za nastanak simptoma poput psihoze i agresije (Folnegović-Grošić, 2016)

Prilikom administriranja terapije, važno je pratiti balans učinkovitosti terapije i intenziteta nuspojava radi održavanja suradnje između pacijenta i zdravstvenog djelatnika. Nuspojave često navode pacijente da samoinicijativno prekidaju terapiju što dovodi do prekida remisije i povratka simptoma akutne faze. Nadalje, potrebno je redovito kontrolirati krvnu sliku zbog uvida u intenzitet nuspojava, npr. lipidni profil kod korištenja atipičnih antipsihotika (razvoj metaboličkog sindroma), broj leukocita tijekom terapije klopazinom (rizik od agranulocitoze). Od ostalih nepoželjnih reakcija

valja spomenuti ekstrapiramidalni sindrom, odnosno poremećaje u kontroli motorike, te produljenje QT intervala i rizik od iznenadne smrti zbog ventrikularne aritmije (torsades de pointes) (Üçok i Gaebel, 2008).

Populacija shizofrenih pacijenata liječenih klozapinom sa rezidualnim simptomima je posebna skupina pacijenata za koji je proučavano suplementiranje vitamin D kao terapijska opcija. Klozapin se uvodi kao lijek za pacijente koji ne reaguju na druge antipsihotike, ali još uvijek oko 50% pacijenata ima rezidualne simptome koji se ne poboljšavaju prilagodbom doze i kombinacijom lijekova, a doprinose onesposobljenosti pacijenta. Studija vođena hipotezom da suplementacija vitamina D djeluje pozitivno na psihotične, kognitivne, afektivne i metaboličke parametre pacijenata sa parcijalnim odgovorom na terapiju klozapinom pokazala je poboljšanje u kognitivnoj funkciji nakon administracije vitamina D prema rezultatima MoCA testa (engl. *Montreal Cognitive Assessment*) (Krivoy i sur., 2017). Koncentracija vitamina D je također značajno snižena kod suicidalnih pacijenata u usporedbi za onima koji nisu suicidalni i zdravim kontrolama. Istraživanje je pokazalo da je 58% suicidalnih pacijenata klinički deficijentno za vitamin D za razliku od 30% u skupini depresivnih pacijenata koji nisu suicidalni i skupini zdravih kontrola (Grudet i sur. 2014).

1.2 VITAMIN D

1.2.1. Fiziološka uloga

Vitamini su skupina organskih spojeva heterogenih kemijskih struktura koji pripadaju mikronutrijentima – sastojcima hane koji su u malim količinama nužni za održavanje funkcionalnosti organizma. Čovjek ih ne može sam sintetizirati, a u tijelo ih unosi iz prirodnih izvora ili sintetičkih formulacija. Prema topljivosti, vitamini se dijele na one topljive u vodi i vitamine topljive u mastima. Vitamin D se nalazi u skupini vitamina topljivih u mastima, uz vitamine A, E i K, iako je po svojoj strukturi i mehanizmu djelovanja sličniji hormonima.

Zasluga otkrića vitamina D se pripisuje Elmeru McCollumu koji je u ranim 1920.-ima, izvodeći pokuse na štakorima, zaključio da imaju povećan rizik od razvoja rahitisa ako im se prehrana temelji na jednostavnim žitaricama (zob), dok ulje jetre bakalara djeluje preventivno na razvoj bolesti. U ulju je inaktivirao, tada već otkriveni, vitamin A zagrijavanjem i aeracijom te tako eliminirao navedeni učinak kao jednu od

fizioloških uloga vitamina A. Novootkriveni vitamin je nazvao sljedećim slobodnim slovom abecede – vitamin D. Otkriće vitamina D i eliminacija rahitisa se smatra jednim od najvećih uspjeha medicine. Dakle, prva otkrivena uloga vitamina D se odnosi na mineralizaciju kostiju što se postiže pojačanom apsorpcijom kalcija i fosfora u crijevima i bubrezima te održavanjem njihove homeostaze u krvi.

Zajedno sa paratireoidnim hormonom (PTH), vitamin D čini osjetljivu osovinu regulacije metabolizma minerala. Paratireoidni hormon stimulira sintezu aktivnog oblika vitamina D u bubrezima, a vitamin D negativnom povratnom spregom smanjuje lučenje PTH. Koncentracija kalcija u plazmi se održava konstantnom unutar uskih granica, a odnosi se supersaturacijski prema onoj u kostima. Ukoliko supersaturacija plazme izostane, mineralizacija kosti se neće moći odvijati i dolazi do razvoja rahitisa kod djece i osteomalacije kod odraslih. Dva mehanizma se aktiviraju na sniženu koncentraciju kalcija u plazmi. Prvi mehanizam se odnosi na stimulaciju osteoklasta, posredovanu vitaminom D, koji pojačano eksprimiraju RANKL (receptor activator of nuclear factor κ -B ligand) i potiču osteoklastogenezu i aktivaciju zrelih osteoklasta za resorpciju kosti. Za aktivaciju osteoklastične aktivnosti in vivo su potrebni i PTH i vitamin D. Drugi mehanizam se odnosi na reapsorpciju kalcija u distalnim tubulima bubrega također posredovan interakcijom vitamina D i PTH. (DeLuca, 2004.) Navedeni mehanizmi posebno dolaze do izražaja kada je kalcij nedostupan putem hrane, tj. enterocita, te organizam mobilizacijom osteoklasta i reapsorpcijom mora osigurati konstantnu koncentraciju kalcija u krvi. Ukoliko je koncentracija kalcija u krvi previsoka, C-stanice štitne žlijezde luče kalcitonin koji blokira mobilizaciju kostiju.

Vitamin D svoje učinke postiže preko vitamin D receptora (engl. *vitamin D receptor*, VDR) koji se nalazi ne samo u enterocitima, osteoblastima i stanicama distalnog tubula već i u stanicama paratireoidne žlijezde, keratinocitima, promijelocitima, limfocitima, stanicama kolona, hipofize i jajnika (DeLuca, 2004) što upućuje na multisistemske djelovanje vitamina D. VDR pripada skupini nuklearnih receptora i djeluje kao transkripcijski faktor, a građen je od tri domene: DNA-vezajuća C domena, ligand-vezajuća E domena i aktivirajuća F domena. Djelovanje receptora se očituje preko vitamin D-odgovornih elemenata (engl. *vitamin D response elements*, VDRE) koji se većinom nalaze oko 1 kb od početnog mjesta ciljnog gena, a njihov učinak se najjače ispoljava na regulaciju CYP24 ili 24-hidroksilaze, enzima

koji vitamin D prevodi u neaktivan oblik i eliminira. VDR gen se nalazi na kromosomu 12 (12q13.1) i poznato je mnogo polimorfizama čiji se biološki učinak povezuje sa povećanim rizikom od bolesti (dijabetes, karcinom prostate i kolona, osteoporoza, autoimune bolesti). Osim preko VDR, vitamin D djeluje i na membranske brzo-odgovarajuće steroidne (engl. *membrane-associated rapid response steroid binding*, MARRS) receptore putem kojih regulira citosolnu koncentraciju kalcija oslobađajući ga iz intracelularnih zaliha i influksom kroz kalcijeve kanale. Također regulira aktivnost fosfolipaze C, adenilat ciklaze te biokemijske kaskade Raf i MAP kinaza. (Wrzosek i sur., 2013).

1.2.2. Struktura

Vitamin D je sterolne strukture u kojoj je B prsten otvoren te se pojavljuje u dva oblika: vitamin D2 ili biljni ergokalciferol i vitamin D3 ili životinjski kolekalciferol. Vitamin D3 nastaje iz prekursora 7-dehidrokolesterola, a vitamin D2 iz ergosterola. Steroidna jezgra vitamin D čini hidrofobnim, odnosno topljivim u mastima, a sastoji se od tri šesteročlana prstena (A, B i C) i jednog peteročlanog (D). Na položaju tri prstena A se nalazi hidroksilna skupina. Na prsten D se nastavlja lanac od 6 ugljikovih atoma sa dvije metilne skupine na položaju 20 i 25. Kolekalciferol se u jetri hidroksilira putem enzima 25-hidroksilaze u 25-hidroksikolekalciferol te u tom obliku postaje supstrat 1 α -hidroksilazi u proksimalnim tubulima bubrega gdje nastaje aktivni oblik vitamina D – 1,25-dihidroksikolekalciferol.

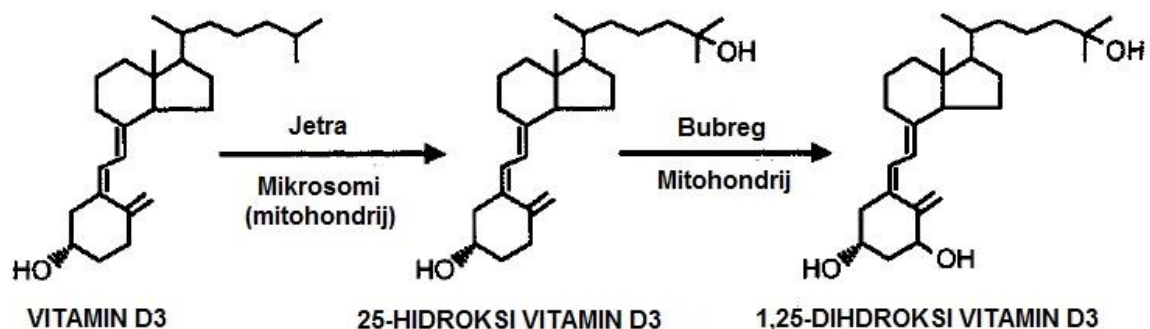
1.2.3. Metabolizam

Dnevna preporučena količina (engl. *recommended daily amount*, RDA) vitamina D iznosi 5-10 μ g, a zdrave osobe dovoljnu količinu dobiju putem hrane ili izlaganjem suncu. UV zračenje putem kože fotolizira 7-dehidroksikolesterol u previtamin D koji spontano izomerizira u vitamin D. Hrana bogata vitaminom D je ulje iz jetre tune i dugih riba, meso tune te manje količine u mesu općenito, maslacu i mlijeku. Vitamin D se iz crijeva resorbira putem limfnog sustava. U krvi se veže na protein koji veže vitamin D (engl. *vitamin D binding protein ili Gc-globulin*, VBP), specifični transportni protein koji visokim afinitetom veže vitamin D i transportira ga u jetru. U jetri se nalazi mikrosomalni enzim 25-hidroksilaza (CYP450 enzim) koji hidroksilira vitamin D u prohormon 25-hidoksi-kolekalciferol (25(OH)D3) koji je u fiziološkim koncentracijama biološki inaktivan. Tragovi vitamina se mogu hidroksilirati

u 25(OH)D₃ i u crijevu i u bubregu. Za hidroksilaciju su potrebni NADPH i molekularni kisik (Čepelak i Čvorišćec, 2009).

Hidroksilirani oblik vitamina odlazi u proksimalne tubule bubrega gdje djelovanjem mitohondrijske 1 α -hidoksilaze prelazi u aktivni oblik 1,25-dihidroksikolekalciferol (1,25(OH)₂D₃). 1,25(OH)₂D₃ je najpotentniji metabolit i medijator većine fizioloških učinaka vitamina D. Osim dva spomenuta metabolita, vitamin D se može metabolizirati i u druge metabolite poput 24,25-dihidroksikolekalciferola (24,25(OH)₂D₃), a njihovo stvaranje je regulirano mehanizmom povratne sprege. Metaboliti sa 24-hidroksi skupinom nisu aktivni i izlučuju se iz tijela. Novija istraživanja upućuju na sinergističko djelovanje 24,25(OH)₂D₃ i 1,25(OH)₂D₃ te nužnost 24,25-dihidroksi metabolita u terapijskim pripravcima za uspješno liječenje rahitičnih životinja.

Hidroksilacija vitamina D u 25(OH)D₃ u jetri je uvjetovana njegovom količinom u organu, a stvaranje aktivnog oblika 1,25(OH)₂D₃ je regulirano potrebama za kalcijem i fosforom. U stanju hipokalcijemije se stvara više 1,25-dihidroksi, a u hiperkalcijemiji više 24,25-dihidroksi metabolita. Potreba za kalcijem aktivira lučenje PTH koji potiče stvaranje aktivnog oblika vitamina D u bubrezima. Iz navedenog se može zaključiti da na patološke promjene uvjetovane nedostatkom vitamina D, osim nedovoljnog unosa ili izlaganja suncu, mogu utjecati i poremećaji u regulaciji njegove hidroksilacije.



Slika 1. Hidroksilacija vitamina D u aktivan oblik (Preuzeto iz: DeLuca, 2004)

1.2.4. Uloga u psihičkim oboljenjima

Pacijenti dijagnosticirani sa shizofrenijom zbog smanjene kvalitete života imaju veću vjerojatnost usvajanja štetnih navika poput pušenja, konzumiranja droga,

neadekvatne prehrane i nedovoljnog kretanja. U kombinaciji sa nuspojavama antipsihotika, stigmom dijagnoze i nezdravim životnim navikama, populacija shizofrenih pacijenata iznimno je podložna izolaciji iz zajednice. Istraživanja su pokazala da pacijenti sa shizofenijom imaju najlošiju dijetu i metaboličko zdravlje te najveću stopu prijevremene smrti u usporedbi sa ostalim psihičkim poremećajima (Firth i sur., 2017). Analizom uzoraka pacijenata sa shizofenijom utvrđeni su nedostaci niza nutrijenata - B vitamina (folata i B12), antioksidativnih vitamina (C i E) te vitamina D (Brown i Roffman, 2014) što otvara pitanje suplementacije s ciljem ublažavanja simptoma. Deficijencija B vitamina je često prisutna i korelira sa težinom simptoma što je objašnjivo neuroprotektivnim svojstvima navedenih nutrijenata i sposobnošću snižavanja koncentracije homocisteina koji ima štetno djelovanje. Dokazano je da suplementacija L-metilfolatom značajno reducira negativne simptome shizofrenije (Roffman i sur., 2017).

Vitamin D je proučavan kao jedan od nutrijenata deficitarnih kod shizofrenih pacijenata. Suplementacija vitamina D primjenjuje se u nizu patoloških stanja poput kardiovaskularnih bolesti, tumora i osteoporoze, ali randomizirani kontrolni pokusi nisu pokazali dovoljnu učinkovitost za potvrdu uzročne hipoteze (Giovannucci i Keum, 2014). Teorija povezanosti nedostatka vitamina D sa psihijatrijskim poremećajima relativno je nova, a u prilog joj ide ranije navedena povećana stopa pojavnosti shizofrenije kod novorođenčadi rođene u zimskim mjesecima, mjestima udaljenijima od ekvatora, u urbanim populacijama te u populacijama tamnopusih migranata. Sinteza aktivnog oblika vitamina D je usko povezana sa izloženošću suncu (uvjetovano godišnjim dobom i geografskom širinom). Kod shizofrenih pacijenata je pronađena deficijencija vitamina D praćena normokalcemijom što upućuje na efekt neovisan o hormonskim putevima regulacije homeostaze kalcija (Salavert i sur., 2017). Pionir proučavanja mehanizma djelovanja vitamina D, Walter Stumpf, je 1979. godine dokazao da učinak nije ograničen na homeostazu kalcija. Detekcijom radioaktivno obilježenog $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je pokazao da aktivni metaboliti iz periferije prelaze u mozak te da postoji regionalna specifičnost preraspodjele što upućuje na transport posredovan receptorima (Stumpf i sur., 1979). Nadalje, u cerebrospinalnoj tekućini su detektirani metaboliti vitamina D (25OHD_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) što otvara prostor za istraživanje lokalne sinteze. (Balbanova i sur., 1984). Prema navedenim činjenicama, vitamin D možemo svrstati u grupu

neuroaktivnih steroida, zajedno sa spolnim steroidima i glukokortikoidima, čiji su mehanizmi djelovanja na funkciju i razvoj mozga detaljno istraženi.

Imunohistokemijskim metodama dokazano je postojanje enzima koji sudjeluju u metaboličkim pretvorbama vitamina D u moždanom tkivu. CYP27B1 (1 α -hidroksilaza) najizraženije signale imunohistokemijskog obilježavanja pokazuje na području supraoptičkih i paraventrikularnih jezgara u hipotalamusu i supstanciji nigri. Također je prisutna u Purkinjeovim stanicama, neuronima cerebralnog korteksa, fetalnom mozgu i glija stanicama (Eyles i sur., 2013). Ekspresija CYP24A1 (24-hidroksilaza) nije detektirana u kulturi stanica de novo, ali je inducirana nakon stimulacije dodatkom 1,25(OH) $_2$ D $_3$ u medij (Naveilhan i sur., 1993). Stoga, potencijal za aktivaciju i eliminaciju vitamina D u mozgu je prisutan.

Prisustvo receptora za vitamin D (VDR) je dokazano u tkivu mozga. Prve takve studije učinili su Southerland i suradnici 1992. koristeći metodu in situ hibridizacije sa radioaktivno-obilježenim cDNA probama. Istraživanja su provodili post-mortem na pacijentima koji su bolovali od Alzheimerove i Huntingotonove bolesti. Kasnije je utvrđeno da su VDR također prisutni u kulturama ljudskih stanica neuroblastoma. Nakon razvoja imunohistokemije, specifičnim antitijelima je izrađena detaljna mapa prisutnosti VDR i CYP27B1 u ljudskom mozgu (Eyles i sur., 2005.). Imunoreaktivnost VDR u humanom hipokampusu je najizraženija u CA1 i CA2 piramidalnim stanicama, a reducirana u CA3. Osim u neuronalnim stanicama, imunoreaktivnost VDR je dokazan i u kulturama glija stanica, astrocita i oligodendrocita (Eyles i sur., 2013).

Nadalje, vitamin D sudjeluje u regulaciji tkivne diferencijacije i razvoja fetalnog mozga. Lokalizirana raspoloživost VDR u područjima diferencijacije podržava teoriju da je razvoj moždanog tkiva podložan regulaciji vitaminom D. Studijama na neonatalnim štakorima je pokazan intenzivan imunohistokemijski signal na endodimskoj površini lateralnih ventrikula, mjestu najintenzivnije diobe stanice post-natalnog mozga. Pojačana ekspresija VDR je usklađena sa smanjenom stopom proliferacije stanica i povećanom eliminacijom stanica putem apoptoze što upućuje da djelovanje vitamina D, posredovano VDR, direktno ili indirektno utječe na proliferaciju i apoptozu u razvoju mozga štakora. Vitamin D ima pro-diferencijacijsko i anti-apoptotičko djelovanje te je njegov nedostatak tijekom razvoja vitamin D-

deficijentnih štakora poveza sa manjim stupnjem diferencijacije mozga i pojačanom proliferacijom u mnogim regijama (Eyles i sur., 2013).

Aktivan oblik vitamina D utječe na stvaranje i oslobađanje neurotrofnih faktora poput faktora rasta neurona (nerve growth factor, NGF), koji je nužan za njihovu diferencijaciju, i neurotrofnog faktora glijalne stanične linije (engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*, GDNF). Neuroprotektivno djelovanje uključuje sintezu proteina koji vežu kalcij (pr. parvalbumin) i održavanje homeostaze kalcija (Ca^{2+}) u stanici što osigurava normalno funkcioniranje neurona. Administracija 1,25-(OH) 2D_3 dokazano smanjuje ekspresiju L-tipa naponskih kalcijevih kanala u hipokampalnim kulturama štakorskih stanica (Wrzosek i sur., 2013). Homeostaza kalcija je posebno važna za neurone jer povišena koncentracija Ca^{2+} potiče otpuštanje glutamatne i aspartatne kiseline koje stimuliraju N-metil-D-aspartatne receptore (NMDA). NMDA receptori djeluju na otvaranje Ca^{2+} kanala što dovodi do depolarizacije stanice i influks Ca^{2+} kroz naponske Ca^{2+} kanale, a povišena koncentracija Ca^{2+} potiče fuziju sinaptičkih vezikula sa presinaptičkom membranom i otpuštanje stimulativnih neurotransmitera. Povišena koncentracija Ca^{2+} također djeluje na metabolizam slobodnih radikala, lipidnu peroksidaciju te aktivira proteaze i lipaze. Pokusima na kulturama štakorskih neurona je dokazano da dodatak 1,25(OH) 2D_3 povećava razinu glutationa u navedenim stanicama. Reducirani oblik glutationa stvaraju astrociti, a djeluje kao antioksidans koji štiti stanicu od reaktivnih kisikovih specija i od apoptoze uzrokovane oksidacijom. Vitamin D također inhibira sintezu inducibilne sintaze dušikovog oksida koja u hipoksičnim uvjetima stvara veliku količinu dušikovog oksida (NO). NO u visokim koncentracija djeluje neurotoksično i uzrokuje smrt neurona (Wrzosek i sur., 2013).

Nadalje, vitamin D, osim neuroprotektivnog, ima i imunomodulatorno djelovanje. Protuupalno djelovanje vitamina D se temelji na stimulaciji sinteze IL-10 što za posljedicu ima smanjenu ekspresiju interferona γ (IF- γ) i interleukina 2 (IL-2). Pokusom je dokazano da administracija 1,25(OH) 2D_3 u kulturu EOC13 mikroglija stanica inhibira sintezu TNF- α , IL-6 i NO što potvrđuje direktno djelovanje na regulaciju upalnog procesa (Wrzosek i sur., 2013). Danas znamo da su depresija i autoimune bolesti povezane sa prekomjernim oslobađanjem upalnih citokina koji stvaraju poremećaje u staničnom metabolizmu, a protuupalno djelovanje vitamina D može se razmotriti kao jedna od terapijskih opcija za ublažavanje simptoma.

Neuroprotektivno djelovanje progesterona nakon traumatskih ozljeda je regulirano vitaminom D. Pokusom je utvrđeno da je protektivno djelovanje progesterona reducirano u životinjama sa deficijencijom vitamina D, a kombinirana terapija vitaminom D i progesteronom pokazuje bolje rezultate od administriranja samog progesterona nakon bilateralnih kontuzija medijalnog frontalnog korteksa. Inducibilno djelovanje vitamina D na sintezu progesterona upućuje na važnost vitamina D u očuvanju neurokognitivnih funkcija tijekom procesa starenja, hipoteza koju je potrebno dodatno istražiti (Wrzosek i sur., 2013). Nadalje, dodatak vitamina D pacijentima sa farmakorezistentnom epilepsijom i sniženom razinom vitamina D dovodi do redukcije broja napadaja za 40%. (Hollo i sur., 2012)

Studije razvoja humanog mozga većinom istražuju efekt razine vitamina D manipulacijom dijete majke. Hipervitainoza D je rijetka, ali hipovitainoza D je relativno česta, posebno u populaciji trudnica, a fetus je potpuno ovisan o majčinom unosu. Najvažniji korak u liječenju hipovitainoze je vrijeme dodatka vitamina D, koje odlučuje hoće li morfološke promjene mozga perzistirati u odraslu dob. Na pokusima sa štakorima, povećani lateralni ventrikuli su ostali trajno promijenjeni jedino ako se dodatak vitamina D odgađao do prestanka sisanja (Eyles i sur., 2003). McGarth i sur. su proveli istraživanje u Danskoj na 400 shizofrenih pacijenata i usporedivih kontrola proučavajući uzorke seruma sa neonatalnim uzorcima suhe kapi krvi. Rezultati su pokazali da su oni sa najnižim neonatalnim razinama vitamina D imali dvostuko veći rizik od razvoja shizofrenije, ali i oni sa najvišim su također bili rizična skupina. Studije suplementacije vitaminom D u Finskoj su pokazale da dodavanje najmanje 2000 IU/dan kod muške novorođenčadi tijekom prve godine života reducira rizik od razvoja shizofrenije za 77% u usporedbi sa onima koji su dobivali manje od 2000 IU/dan, ali rezultati nisu potvrđeni za ženski spol (Brown i Roffman, 2014)

1.3. C-REAKTIVNI PROTEIN

1.3.1. Fiziološka uloga

C-reaktivni protein (CRP) je serumski protein akutne faze čija se koncentracija povećava kao odgovor na upalni proces u organizmu. Koncentracija CRP-a rapidno raste u slučaju upalnog procesa, traume ili infekcije i jednako naglo se snižava rezolucijom bolesti. Protein je nazvan po činjenici da precipitira somatski C-polisaharid vrste *Streptococcus pneumoniae*. Inicijalno je vladalo mišljenje da je

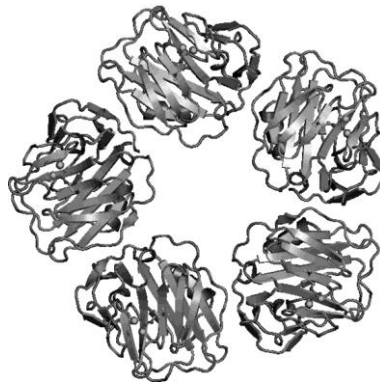
CRP patogena sekrecija, ali pronalaskom mjesta sinteze u ljudskom tijelu zaključeno je da se radi o nativnom proteinu. Sintetizira se u jetri na poticaj upalnih citokina poput interleukina-6 kojeg luče makrofazi i T-limfociti. Veže se na fosforilkolin i fosforiletanolamin te polisaharide bakterije iz oštećenog tkiva te aktivira klasični put komplementa koji počinje s C1q. Također se veže na receptore limfocita, a vezanje je ovisno o kalciju. Interakcijom sa Fc receptorima, CRP djeluje proinflamatorno. Veže se za stimulatorne receptore (FcγRI i FcγRIIa) stimulirajući fagocitozu i otpuštanje inflamatornih citokina i za inhibitorni receptor (FcγRIIb) blokirajući aktivacijske signale. CRP povećava klirens apoptotičkih stanica, veže se za antigene jezgre te ima ulogu u sprječavanju autoimunosti tako što maskira autoantigene i povećava njihovo izlučivanje. Pokusima je dokazano da injiciranje jednokratne doze CRP-a mišjim modelima sistemskog eritemskog lupusa prije pojave proteinurije odgađa nastup bolesti, a nakon pojave proteinurije djeluje reverzibilno (Marnell i sur., 2005). Za razliku od imunoglobulina, koji specifično prepoznaju pojedine antigene epitope, CRP prepoznaje promijenjene vlastite i strane molekule na temelju prepoznavanja uzoraka (engl. *pattern recognition*) te sudjeluje u nespecifičnom imunom odgovoru koji je zaslužan za ranu aktivaciju obrane organizma.

U serumu zdravih osoba i adolescenata koncentracija CRP-a je manja od 5 mg/L, a kod upalnih bolesti može narasti i do 500 mg/L. Određivanje CRP-a je korisna pretraga za razlikovanje bakterijskih od virusnih infekcija, a koncentracija mu je povećana u mnogih stanjima poput kolorektalnog karcinoma, metastaza karcinoma dojke, infarkta miokarda, poslijeoperativnim komplikacijama itd. Porast CRP-a se također može pratiti u aterosklerozi kada označava upalnu reakciju (Čepelak i Čvorišćec, 2009)

1.3.2. Struktura

CRP pripada obitelji malih pentraksina za koju je karakteristična pentraksinska domena i vezanje za ligande posredovano kalcijem. Gen koji kodira CRP se nalazi na kromosomu 1q21-23, sastoji se od 2301 baze. Proteini pentraksinske obitelji su uključeni u nespecifične akutne imunosne odgovore i smatraju se funkcionalnim prethodnicima antitijela. Pentraksinska domena se sastoji od pet identičnih podjedinica građenih od dvije β-nabrane ploče (pentamer). Globularne podjedinice su nekovalentno povezane u simetrični ciklični uzorak oko centralne pore koji proteinu daje karakterističan diskoidni oblik. Molekularna masa

CRP-a je 118 kDa. Opisane su dvije konformacije CRP-a koje posjeduju različita antigena, elektroforetska i biološka svojstva: pentamerna izoforma (pCRP) i monomerna izoforma (mCRP). pCRP je glavni oblik proteina koji se detektira u serumu. Tijekom upalnog procesa, pentamerna struktura disocira na monomerne podjedinice koje se vežu na fosforilkolin na mrtvim stanicama i nekim patogenima te aktiviraju sistem komplementa preko C1q i facilitiraju fagocitozu (Singh i Chaudhuri, 2014).



Slika 2. Pentamerna struktura C-reaktivnog proteina (Preuzeto iz: Shrivastava i sur., 2015)

1.3.3. Metabolizam

CRP se većinom sintetizira u jetri u transkripcijskoj fazi odgovora na proinflamatorne citokine. Najvažniji regulator sinteze je IL-6 koji potiče de novo sintezu CRP-a djelujući na transkripcijske faktore C/EBP β i C/EBP γ . Interleukin-1 β (IL-1 β) i faktor nekroze tumora (TNF, tumor necrosis factor) djeluju sinergistički sa IL-6 na sintezu CRP-a (Salazar i sur., 2014). Osim u jetri, mRNA za CRP je detektirana u nizu ekstrahepatičkih tkiva – adipoznom tkivu, plućima, epitelnim stanicama tubula u bubregu, limfocitima te u makrofagima i stanicama glatkih mišića u slučaju aterosklerotskih lezija. Nakon sinteze, CRP se otpušta u cirkulaciju. Koncentracija u serumu ovisi o brzini sinteze, raste 6-8 sati nakon inicijalnog podražaja, a vrhunac doseže nakon 24-48 sati. Poluvrijeme života CRP-a je 19 sati. Identifikacija ekstrahepatičkih izvora CRP-a je nužna za tumačenje kontinuirano blago povišenih razina u serumu koje se povezuju sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih oboljenja. Lokalno otpušteni CRP potencijalno ima važnu ulogu u aktivaciji endotelne stanice.

1.3.4. Uloga u psihičkim oboljenjima

Ustanovljeno je da infektivni i upalni procesi sudjeluju u etiopatogenezi shizofrenije. Upala je odgovor na ozlijeđenu tkiva i uključuje aktivaciju stanica imunološkog sustava, povećanu prokrvljenost i vaskularnu permeabilnost. Kod shizofrenih pacijenata su utvrđene abnormalne razine proteina akutne faze – haptoglobina, α 1-antitripsina i CRP-a. Potvrđene su povišene serumske koncentracije IL-1 β , IL-6 i TGF- β u populaciji shizofrenih pacijenata sa prvom psihotičnom epizodom ili akutnim relapsom, a IL-6 i IL-1 β induciraju CRP. Možemo zaključiti da će CRP biti povišen u pacijenata sa akutnim psihotičnim relapsom. CRP je povezan sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, disfunkcijama metabolizma, depresijom i kognitivnim nedostacima (Fan i sur., 2007). Kardiovaskularna oboljenja su najčešći uzrok smrti i skraćenja životnog vijeka shizofrenih pacijenata. CRP je identificiran kao neovisan prediktivni marker koronarne arterijske bolesti i drugih dugoročnih patoloških kardiovaskularnih promjena (Dickerson i sur., 2007). Mehanizmi u podlozi djelovanja upalnog procesa na patofiziologiju shizofrenije su nerazjašnjeni, ali pokazano je da shizofreni pacijenti imaju smanjen regionalni protok krvi u pojedinim moždanim regijama poput frontalnog i temporalnog režnja što je povezano sa negativnim simptomima poput apatije, katatonije, anhedonije te kognitivnih i socijalnih nedostataka. Pretpostavlja se da kronična upala dovodi do mikro-vaskularnih oštećenja i povećane propusnosti krvno-moždane barijere te poremećaja cerebralnog krvotoka. Navedene promjene u homeostatskim mehanizmima potencijalno vode do razvoja psihotičnih simptoma (Fan i sur., 2007).

Kliničke studije povezuju adjunktivnu terapiju ne-steroidnim protuupalnim lijekovima (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) uz primjenu antipsihotika sa poboljšanjem sveukupnih simptoma, a početne razine upalnih markera su povezane sa stupnjem odgovora na dodatak NSAIDs (Miller i sur., 2014.). Dokazano je da celekoksib (selektivni inhibitor ciklooksigenaze-2) u kombinaciji sa risperidonom kod pacijenata sa akutnom egzacerbacijom shizofrenije značajno umanjuje psihopatologiju prema PANSS ljestvici (engl. *Positive and negative syndrome scale*) (Fan i sur., 2007.). Potencijalni mehanizam za povezivanje upalnog procesa i psihoze je promijenjen metabolizam triptofana te posljedično povišena razina kinurenične kiseline koja djeluje kao antagonist NMDA receptora i

dovodi do disfunkcije neurotransmisije glutamata (Miller i sur., 2014). Dakle, u ovom radu se razmatra hipoteza da vitamin D, koji ima neuroprotektivna i protuupalna svojstva, inverzno korelira sa CRP-om kod pacijenata sa dijagnosticiranom shizofrenijom.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Vitamin D povezan je s razvojem i funkcijom mozga. Nedostatak vitamina D jedan je od čimbenika u etiopatogenezi neuropsihijatrijskih poremećaja i shizofrenije. Istraživanja su pokazala niski sadržaj vitamina D u shizofreniji te njegovu povezanost s aktivnošću bolesti i proinflamatornim statusom bolesnika. Nekoliko studija pokazalo je inverznu povezanost vitamina D sa sistemskom upalom.

Ovo istraživanje usmjereno je na ispitivanje hipoteze da je u bolesnika oboljelih od shizofrenije vitamin D inverzno povezan sa C-reaktivnim proteinom koji je biokemijski biljeg sistemske upale. Rezultati istraživanja mogli bi poduprijeti tezu da dodatak preparata vitamina D može pridonijeti uspješnosti liječenja.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Izmjeriti koncentraciju vitamina D i CRP-a u serumu skupine bolesnika oboljelih od shizofrenije.
2. Usporediti koncentracije vitamina D kod bolesnika u odnosu na heterogenu populaciju bez psihijatrijskog poremećaja te u odnosu na preporučene vrijednosti vitamina D.
3. Povezati koncentracije vitamina D i CRP-a u bolesnika oboljelih od shizofrenije.
4. Povezati koncentracije vitamina D, CRP-a i lipida s trajanjem bolesti i životnom dobi.
5. Povezati koncentracije vitamina D, CRP-a i lipida s trajanjem bolesti i životnom dobi u odnosu na utjecaj spola, poremećaja spavanja, obiteljskog naslijeđa i terapije psihofarmacima.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje se provelo na 90 ispitanika koji su u razdoblju od srpnja 2017. do siječnja 2018. primljeni na Kliniku za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice zbog akutne epizode shizofrenije, neovisno o tome je li to bila prva epizoda ili akutizirana epizoda ranije uspostavljene dijagnoze shizofrenije. Uključeni su pripadnici oba spola (47 muškaraca i 43 žene), stariji od 18 godina. Uzorci venske krvi su dobiveni natašte u jutarnjim satima u proceduri uzorkovanja za rutinske pretrage koje liječnik ordinira hospitaliziranim bolesnicima na Klinici za psihijatriju. Venepunkciju i uzorkovanje 3 mL krvi bez antikoagulansa u standardnim epuvetama s podtlakom (Greiner Bio-one, Austrija) obavile su medicinske sestre. Potom su se uzorci centrifugirali na sobnoj temperaturi, uz centrifugalnu silu od 2000xg, 10 minuta i odvojili od krvnih stanica, a serum se zamrznuo na -20°C u plastične mini epruvete (Eppendorf, Njemačka) volumena 1,5 mL do dana analiziranja u serijskom postupku.

Podaci o koncentracijama vitamina D iz istog razdoblja od srpnja 2017. do siječnja 2018. preuzeti su iz arhive Kliničkog zavoda za kemiju za polikliničke ispitanike i bolesnike s odjela Klinike za unutarnje bolesti, Klinike za neurologiju, Klinike za bolesti srca i krvnih žila, Klinike za kožne bolesti i Klinike za reumatologiju i fizikalnu medicinu. Ukupno je na odjelima i poliklinikama određen vitamin D za 4182 pacijenta starijih od 18 godina, od čega za 903 muškarca i 3379 žene.

Obrada krvi i analitička ispitivanja provedena su u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre Milosrdnice.

Etičko povjerenstvo KBC Sestre Milosrdnice i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrili su istraživanje.

3.2. Metode

Istraživanje je provedeno s komercijalnim reagensima standardnih svojstava prema preporukama IFCC-a (The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). Vitamin D kao oblik totalnog vitamina (D2 i D3) određivao se u serumu imunokemijskom kemiluminescentnom metodom s IVD (in vitro diagnostic) reagensijama (Abbott, SAD) na automatskom imunokemijskom analizatoru Architect

i2000SR (Abbott, SAD), a CRP imunoturbidimetrijskom metodom s IVD reagensijama (Abbott, SAD) na biokemijskom analizatoru Architect c8000 istog proizvođača.

3.2.1. Vitamin D

Architect 25-OH Vitamin D test je kvantitativni kompetitivni test za dokazivanje prisutnosti vitamina D u humanom serumu i plazmi metodom kemiluminiscencije. U prvo koraku se miješaju uzorak, reagens i paramagnetične čestice impregnirane sa anti-vitamin D antitijelom (zečja monoklonalna antitijela). Vitamin D prisutan u uzorku se odvaja od proteina koji veže vitamin D i stvara antigen-antitijelo kompleks sa paramagnetičnim česticama. Nakon inkubacije, dodaje se konjugat koji sadrži vitamin D označen akridinijem koji zauzima slobodna mjesta na anti-vitamin D impregniranim česticama. Slijedi još jedna inkubacija i ispiranje, nakon čega se mjeri kemiluminiscencija koja je u odnosu sa 25-OH vitaminom D prisutnim u uzorku. Rezultati se izračunavaju automatski na temelju kalibracijske krivulje. Interval pouzdanosti (linearnosti) za Architect 25-OH Vitamin D test je od 8,5 do 389.8 nmol/L. Granica kvantifikacije iznosi 6,0 nmol/L.

Ograničenja testa:

1. Ako uzorci pacijenata kod kojih je dominantan oblik vitamina D₂ pokazuju niske vrijednosti vitamina D, rezultat je potrebno potvrditi drugom metodom (pr. LC-MS/MS) prije nego što ga koristimo za savjetovanje pacijenta.
2. Ako rezultati nisu skladni sa kliničkom prezentacijom, dodatno testiranje je potrebno.
3. Uzorci pacijenata koji su uzimali preparate zečjih monoklonalnih antitijela mogu pokazivati lažno povišene ili snižene vrijednosti prilikom mjerenja ovim testom.
4. Heterofilna antitijela u humanom serumu potencijalno mogu reagirati sa imunoglobulinima iz reagensa i producirati abnormalne vrijednosti rezultata. Uzorci pacijenta koji su izloženi pripravcima životinjskog seruma su podložni ovoj interferenciji.
5. Reumatoidni faktor može reagirati sa imunoglobulinima iz reagensa.
6. Trigliceridi viši od 12,95 mmol/L interferiraju sa metodom.

Referentni intervali za vitamin D su karakteristični za pojedinu populaciju zbog varijacija u geografskom položaju, godišnjem dobu, dijete, okolišnim faktorima itd. Preporučene vrijednosti vitamina D su >75 nmol/L.

3.2.2. CRP

Multigent CRP Vario test se koristi za kvantitativno imunoturbidimetrijsko dokazivanje CRP-a u humanom serumu i plazmi. Metoda se temelji na reakciji antigena i antitijela između CRP-a u uzorku i anti-CRP antitijela (zečja poliklonalna antitijela) koja su impregnirana na lateks čestice. Rezultat reakcije je aglutinacija koja se očituje kao promjena apsorbancije na 572 nm i proporcionalna je količini CRP-a u uzorku. Tri različite metode su dostupne kako bi sa sigurnošću mjerili veliki raspon vrijednosti: visoko osjetljiva (CRP16), standardna (CRP32) i metoda širokog raspona (CP48). Intraindividualne varijacije koncentracije CRP-a (30-60%) su bitno ograničenje ovog testa kada se koristi za usmjeravanje terapije te su potrebna serijska mjerenja kako bi se odredila odgovarajuća vrijednost za određeni terapijski smjer pojedinog pacijenta.

Ograničenja metode:

1. Screening cijele odrasle populacije nije preporučen.
2. CRP nije zamjena za tradicionalne kardiovaskularne markere te se praćenje akutnog koronarnog sindroma ne smije zasnivati na vrijednostima CRP-a.
3. Pacijenti sa dugotrajnim neobjašnjenim razinama CRP-a iznad 10 mg/L trebaju biti evaluirani za bolesti koje nisu kardiovaskularne etiologije.
4. Metode sekundarne prevencije se ne trebaju zasnivati na vrijednostima CRP-a.
5. Prosječna vrijednost dvije vrijednosti CRP-a, ponovljene u razmaku od dva tjedna, bi se trebale koristiti za metabolički stabilne pacijente.
6. U vrlo rijetki slučajevima, gamopatija (posebno monoklonalnog IgM tipa, pr. Waldenströmova makroglobulinemija) uzrokuje nepouzdana mjerenja.

Područje linearnosti za metodu visoke osjetljivosti iznosi od 0,1 do 160 mg/L, za standardnu metodu od 0,2 do 320 mg/L, a za metodu širokog raspona 0,2 do 480 mg/L. Granica kvantifikacije za metodu visoke osjetljivosti iznosi 0,1 mg/L, a za ostale dvije 0,2 mg/L. Preporučena vrijednost za razinu CRP-a iznosi <5 mg/L.

3.2.3. Lipidi

Lipidi su mjereni samo u skupini psihijatrijskih bolesnika na biokemijskom automatskom analizatoru (Architect c8000, Abbott, SAD) iz uzorka seruma s originalnim reagensima isto proizvođača.

- a) Kolesterol – enzimatska kolorimetrijska metoda s kolesterol-esterazom i kolesterol-oksidadom čiji produkt hidrogen-peroksid oksidira 4-aminopirin (PAP) u kromogen optimalne apsorpcije od 500 nm.
- b) Trigliceridi – enzimatska kolorimetrijska metoda s glicerolfosfat-oksidadom čiji produkt hidrogen-peroksid oksidira PAP u kromogen optimalne apsorpcije od 500 nm.
- c) LDL-kolesterol – kalkulirani podatak prema Friedwaldu (Friedwald i sur., 1972.); empirijska jednadžba: LDL-kolesterol (mmol/L) = kolesterol – HDL-kolesterol – (trigliceridi/2,2).
- d) HDL-kolesterol – homogena enzimatska kolorimetrijska metoda s detergentima akceleratorom reakcije između ne-HDL-kolesterola i kolesterol-oksidade te kolesterol-peroksidade. S nastalim hidrogen-peroksidom oksidira se PAP optimalne apsorpcije od 500 nm.

3.3. Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2007, Microsoft office (Microsoft, USA) i MedCalc v12.5.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Primjenom deskriptivne statistike opisane su skupine ispitanika s podacima o varijablama – aritmetičkoj sredini, medijanu, minimalnim i maksimalnim vrijednostima, interkvantilnim rasponom, standardnoj devijaciji, 95%-tnom intervalu pouzdanosti i testiranju normalnosti distribucije Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Na temelju tipa distribucije odabrani su parametrijski ili neparametrijski testovi. Svi rezultati interpretirani su na razini značajnosti $p < 0,05$.

Za usporedbu varijabli koje ne slijede Gaussovu raspodjelu ili je uzorak mali ($n < 30$) koristio se U-test koji je inačica studentovog t-testa za nezavisne uzorke. Za ispitivanje korelacije između varijabli koristio se Pearsonov ili Spearmanov test u ovisnosti o distribuciji, a koeficijent korelacije r s pridruženom statističkom značajnosti p interpretiran je prema Coltonu (Tablica 1.)

Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije prema Coltonu (Colton, 1974.)

Koeficijent korelacije (r)	Povezanost
0 do $\pm 0,25$	Nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	Slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	Umjereno do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do $\pm 1,00$	Dobra do izvrsna povezanost

Za grafičke prikaze rezultata koristili su se histogrami frekvencija, dijagrami rasprostiranja te tzv. *box and whisker* dijagrami. Za usporedbu više varijabli korištena je ANOVA analiza, odnosno Kruskal-Wallisov test kao neparametrijska inačica.

4. REZULTATI

4.1. Deskriptivna statistika

U tablicama 2. i 3. prikazani su podaci mjerljivih veličina (kontinuirana skala) CRP-a, vitamina D, lipida, dobi ispitanika i trajanja bolesti u odnosu na spol. Izračunate su mjere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijan, interkvartilni raspon), mjere raspršenja (standardna devijacija, interkvartilni raspon), 95%-tni intervali pouzdanosti te maksimalna i minimalna vrijednost.

Tablica 2. Opisna statistika skupine bolesnika oboljelih od shizofrenije

N=90 (47 M; 43 Ž)	CRP (mg/L)	Dob (godine)	HDL (mmol/L)	Kolesterol (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Trajanje bolesti (godine)	Trigliceridi (mmol/L)	VitaminD (nmol/L)
Aritmetička sredina (\bar{x})	4,1	40,9	1,2	4,8	3,0	9,9	1,359	53
95% CI	2,88 - 5,38	37,9 - 43,9	1,12 - 1,26	4,61 - 5,07	2,84 - 3,22	7,50 - 12,45	1,22 - 1,49	46,9 - 59,2
SD	5,96	14,46	0,30	1,05	0,88	11,81	0,63	29,2
Medijan (M)	1,9	39	1,1	4,7	2,9	5,0	1,2	46,0
95% CI	1,30 - 2,83	34,0 - 43,7	1,10 - 1,20	4,46 - 5,04	2,70 - 3,04	3,0 - 10,0	1,10 - 1,40	38,0 - 60,9
Minimum	0,2	19,0	0,6	3,2	1,5	0,03	0,4	7
Maksimum	31,7	70,0	2,1	8,2	5,4	50,0	4,8	136
25 - 75 P	0,7 - 4,8	30,0 - 52,0	1,0 - 1,3	4,10 - 5,5	2,4 - 3,4	1,0 - 15,0	1,0 - 1,6	30,0 - 71,0
Normalna distribucija (p)	<0,0001	0,0021	0,0006	0,0108	0,0037	<0,0001	<0,0001	0,0215

95%CI – 95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan; SD-standardna devijacija; 25-75 P - raspon između 25. i 75. percentile; p - vjerojatnost normalne distribucije

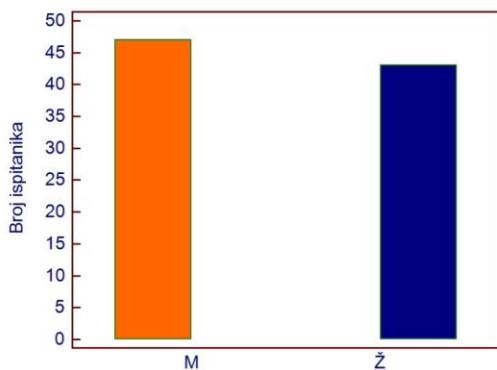
Tablica 3. Koncentracije vitamina D u heterogenoj populaciji i skupini bolesnika oboljelih od shizofrenije

Ispitanici	Dob (godine) p<0,0001		Vitamin D (nmol/L) p=0,0190	
	SHI	NE-PSIH	SHI	NE-PSIH
N	90 (47 M; 43 Ž)	4182	90	4182 (803 M; 3379 Ž)
Aritmetička sredina (\bar{x})	40,9	55,33	53,04	59,03
95% CI	37,93 - 43,99	54,82 - 55,83	46,92 - 59,17	58,15 - 59,92
SD	14,46	16,75	29,23	29,10
Medijan (M)	39	58	46	57
95% CI	34,00 - 43,77	57,00 - 58,00	38,00 - 60,86	56,20 - 57,70
Minimum	19	18	7	7
Maksimum	70	93	136	410
25 - 75 P	30,0 - 52,0	43,0 - 68,0	30,0 - 71,000	40,53 - 73,30
Normalna distribucija (p)	0,0021	<0,0001	0,0215	<0,0001

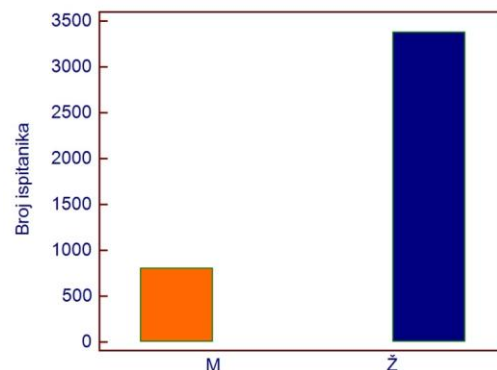
SHI – ispitanici oboljeli od shizofrenije; NE-PSIH – heterogena populacija bez psihijatrijskih poremećaja; 95%CI – 95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan; SD-standardna devijacija; 25-75 P - raspon između 25. i 75. percentile; p - vjerojatnost normalne distribucije

Za ispitivanje normalnosti raspodjele korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test. Testiranje je pokazalo da distribucija mjerenih varijabli ne slijedi Gaussovu normalnu raspodjelu te su u daljnjoj statističkoj obradi korišteni neparametrijski testovi.

Zastupljenost spolova u skupini bolesnika oboljelih od shizofrenija (SHI) i u skupini heterogene populacija (NE-PSIH) prikazana je na Slici 3. i 4. Frekvencija spolova značajno je različita u skupini NE-PSIH (χ^2 test $p < 0,0001$) dok su u skupini SHI podjednako zastupljena oba spola (χ^2 test $p = 0,7518$).



Slika 3. Razdioba spolova u skupini oboljelih od shizofrenije ($p = 0,7518$)



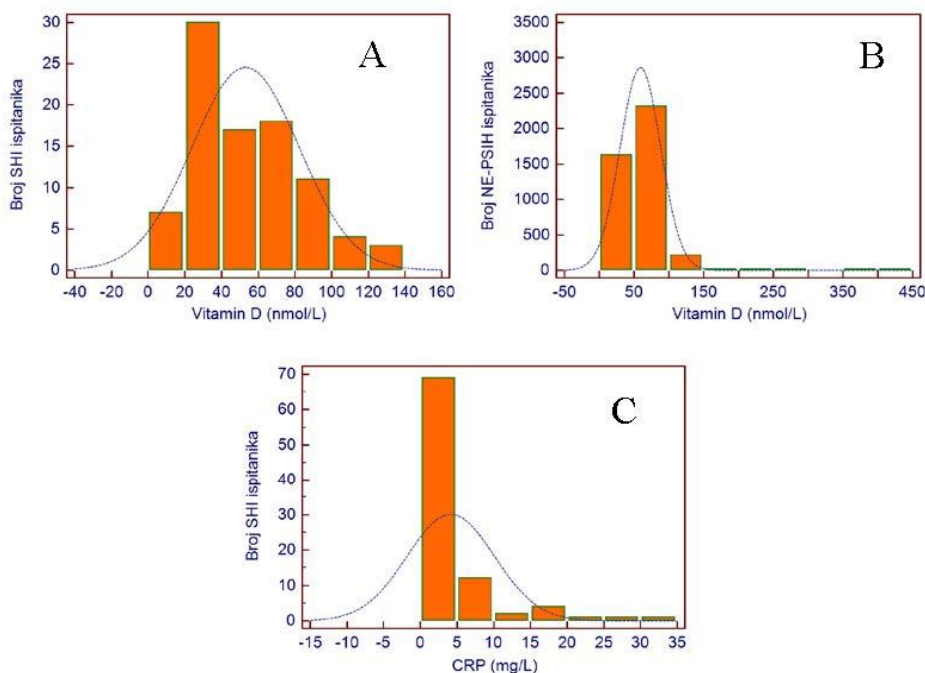
Slika 4. Razdioba spolova u populaciji bez psihijatrijskih poremećaja ($p < 0,0001$)

Na slici 5. prikazani su histogrami raspodjele koncentracije vitamina D i CRP-a u SHI skupini te koncentracije vitamina D u NE-PSIH skupini. CRP skupine NE-PSIH nije bio primjenjiv za usporedbe i interpretaciju jer je uključni kriterij bio samo odsutnost psihijatrijske bolesti, a uključena su bila sva ostala stanja koja imaju širok raspon vrijednosti CRP-a – od niskih do jako visokih koncentracija.

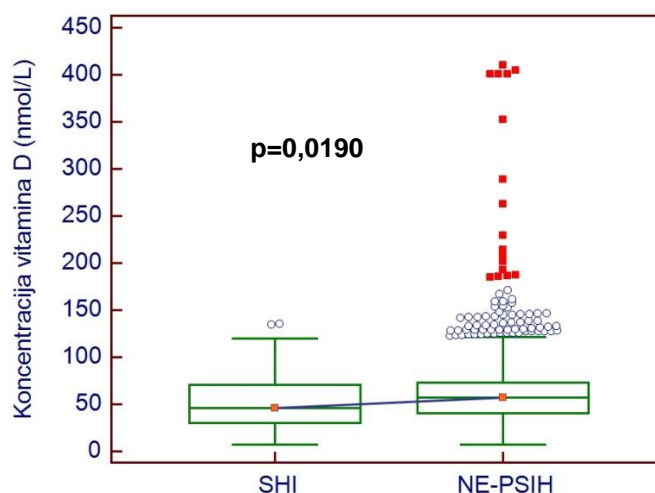
4.2. Usporedba koncentracija vitamina D između skupinama ispitanika

Na slici 6. prikazana je usporedba koncentracija vitamina D između skupina SHI i NE-PSIH ispitanika neovisno o spolu. Koncentracije se statistički značajno razlikuju ($p = 0,0190$), odnosno koncentracije vitamina D niže su u SHI skupini.

Usporedbe SHI bolesnika sa selektiranim specifičnim odjelnim, odnosno polikliničkim NE-PSIH bolesnicima analizirana je Kruskal-Wallisovim testom (Slika 7.) te je značajnost razlike utvrđena na razini $p < 0,0001$.

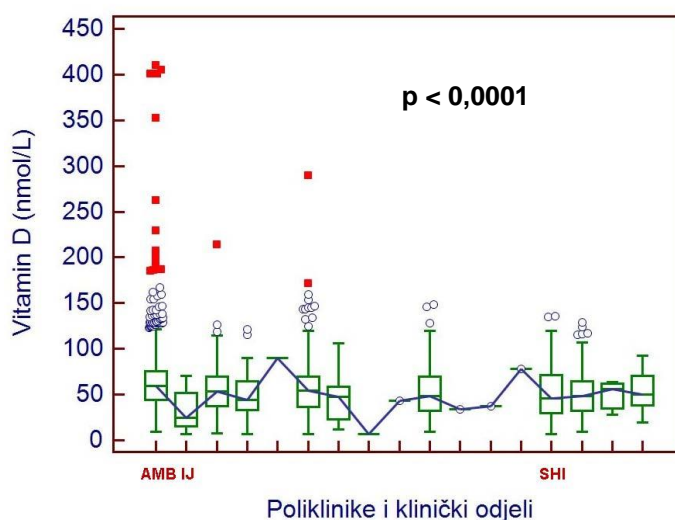


Slika 5. Histogrami raspodjele koncentracija vitamina D i CRP-a u skupinama ispitanika. A – vitamin D u ispitanika oboljelih od shizofrenija (SHI); B – vitamin D u ispitanika bez psihijatrijske bolesti (NE-PSIH); C-CRP u ispitanika oboljelih od shizofrenije (SHI)



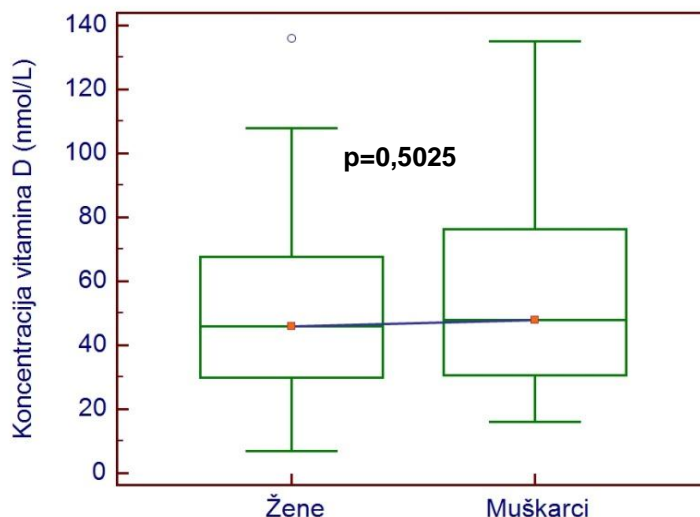
Slika 6. Usporedba koncentracija vitamina D između skupine bolesnika oboljelih od shizofrenije (SHI; N=90) i heterogene populacije (NE-PSIH; N=4182). Centralni zeleni kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartile, središnja zelena linija u kvadratu i crveni kvadratić predstavlja medijan, a linija povezuje medijane dviju skupina. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene udaljene „outside“ vrijednosti (kružići) koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona te jako udaljene „far out“ vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona (crveni kvadratići)

Post-hoc analizom utvrđeno je da je značajnost razlike u koncentracijama vitamina D temeljena na odnosu s polikliničkim (tzv. vanjskim) bolesnicima, a ne na odjelnim (tzv. stacionarnim) bolesnicima. Vanjski bolesnici u najvećoj mjeri načelno su zdravi ljudi, često na kontrolnim pregledima, a ordiniranje je vrlo učestalo pod pritiskom na liječnike obiteljske medicine zbog ozračja popularnosti i medijske razvikanosti o važnosti vitamina D kao panaceje. Oni su pokazali značajno više koncentracije od naše ispitivane SHI skupine dok su nasuprot tomu, za bolesnike iz Jedinice za intenzivnu medicinsku skrb (IJ) utvrđene značajno niže koncentracije vitamina D u usporedbi sa SHI skupinom.



Slika 7. Usporedba koncentracija vitamina D između skupine bolesnika oboljelih od shizofrenije i heterogene populacije raščlanjene prema klinikama i poliklinikama. AMB – vanjski pacijenti (n=2902); IJ – pacijenti iz Jedinice za intenzivnu medicinsku skrb (n=9); SHI – pacijenti oboljeli od shizofrenije. Centralni zeleni kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartile, središnja zelena linija u kvadratu predstavlja medijan, a linija povezuje medijane skupina. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene udaljene „outside“ vrijednosti (kružići) koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona te jako udaljene „far out“ vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona (crveni kvadratići).

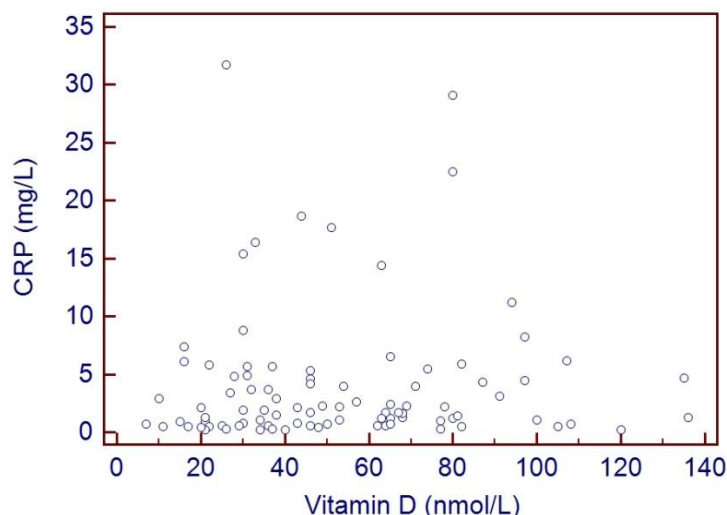
Koncentracije vitamina D unutar skupine SHI ne razlikuju se po spolu (Slika 8.; $p=0,5025$), kao ni unutar skupne NE-PSIH ($p=0,2289$) koja ima značajno neravnomjernu zastupljenost spolova ($p<0,0001$). Stoga se ni medijani koncentracija vitamina D svih žena ne razlikuju od medijana svih muškaraca u ukupnost obje skupine ($p=0,1850$) te zaključujemo da spolne razlike nisu nađene.



Slika 8. Razlike u koncentracijama vitamina D u skupini SHI (oboljeli od shizofrenije, N=90) u odnosu na spol. Centralni zeleni kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartile, središnja zelena linija u kvadratu i crveni kvadratić predstavlja medijan, a linija povezuje medijane dviju skupina. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene udaljene „outside“ vrijednosti (kružići) koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona.

4.3. Povezanost vitamina D i CRP-a u ispitanika oboljelih od shizofrenije

Na slici 9. prikazana je povezanost koncentracija vitamina D i CRP-a u skupini SHI. Korelacijski koeficijent iznosi $r=0,110$, nije statistički značajna ($P=0,3015$) što dokazuje da povezanosti nema te da bi regresijska analiza bila neutemeljena. Uspostava podskupina SHI bolesnika u odnosu na koncentracijske kategorije CRP-a prema rizičnosti od kardiovaskularnih bolesti (niski rizik <1 mg/L; srednji rizik 1-3 mg/L; visoki rizik >3 mg/L; vrlo visoki rizik >10 mg/L) (Myers, 2009) i njihova usporedba sa vitaminom D pokazala je da postoji jedino vrlo slaba negativna povezanost ($r=-0,259$) bez statističke značajnosti ($P=0,5003$). Također, uspostava podskupina u odnosu terapiju (na prisutnost/odsutnost terapije psihofarmacima), u odnosu na naslijedni faktor (iz obiteljske anamneze) ili prisutnost smetnji u spavanju nije polučila značajnu korelaciju. Svi koeficijenti korelacije bili su $< 0,2$ sa statističkom značajnošću iznad $p>0,05$ (od 0,2302 do 0,4688). Zaključno utvrđujemo da nije nađena povezanost CRP-a i vitamina D.



Slika 9. Korelacija koncentracija vitamina D i CRP u skupini SHI (oboljeli od shizofrenije, N=90).

4.4. Međusobna povezanost vitamina D, CRP-a, lipida, životne dobi i trajanja bolesti SHI ispitanika

Povezanosti vitamina D, CRP-a, lipida, trajanja bolesti i životne dobi u SHI skupini ispitana je neparametrijskim Spearmanovim statističkim testom. Mjereni su sljedeći lipidni parametri: ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol i trigliceridi. Analiza je pokazala statistički značajne povezanosti CRP-a sa životnom dobi, trigliceridima i HDL-kolesterolom, dok vitamin D nije korelirao ni s jednom od varijabli. Navedene povezanosti CRP-a, premda statistički značajne, bile su u kategoriji slabih povezanosti. Najviši koeficijent korelacije iznosio je 0,358 ($p=0,001$). Uočene su nešto bolje, također pozitivne povezanosti životne dobi s lipidima ($r=0,424$; $0,456$; uz $p=0,0001$; $<0,0001$) te trajanja bolesti s lipidima ($r=0,338$; $0,313$ uz $p=0,0019$; $0,0042$). Povezanosti upućuju na zaključak da dulje trajanje bolesti i starija životna dob rezultiraju višim razinama CRP-a i lipida, a nižim razinama HDL-kolesterola što se može dovesti u vezu s većim rizicima od kardiovaskularnih bolesti.

Iste povezanosti promatrane su u odnosu na dihotomne kategorijske varijable: spol, prisutnost poremećaja u spavanju, uzimanje terapije i pozitivnu obiteljsku anamnezu (naslijedna komponenta bolesti). Za razliku od korelacijske analize neovisne o spolu, izdvojenost spolova pokazala je da postoji povezanost koncentracije vitamina D s lipidima i životnom dobi. U žena vitamin D negativno korelira s godinama života ($r=-0,296$, $p=0,0543$), a u muškaraca je pozitivno povezan s trigliceridima ($r=0,323$, $p=0,0348$). U oba spola lipidi koreliraju sa životnom dobi, a u

muškaraca je dodatno izražena i povezanost životne dobi s CRP-om te međusobna pozitivna povezanost lipida i CRP-a.

U bolesnika opterećenim naslijeđnom komponentom, odnosno obiteljskom anamnezom nalazimo također povezanost životne dobi i trajanja bolesti s koncentracijom lipidima i CRP-a, a u onih bez naslijeđnog čimbenika snažnije su izražene korelacije između dobi i lipida ($r=0,526$; $0,519$, $p=0,0001$), trajanja bolesti i kolesterola te CRP-a i lipida. Rezultati upućuju na zaključak da je porast razine lipida i CRP-a s godinama života i trajanjem bolesti neovisan o pozitivnoj obiteljskoj anamnezi tj. mogućem naslijeđnom čimbeniku u razvoju shizofrenije.

U bolesnika opterećenih terapijom nalazimo povezanost samo između životne dobi i LDL-kolesterola ($r=0,399$, $p=0,0160$), a gubi se pravilnost odnosa i korelacije životne dobi i ostalih lipida koja je izražena kod bolesnika bez utjecaja terapije. U bolesnika koji se prezentiraju s prvom akutnom epizodom te još nisu izloženi terapiji, nalazimo dodatno i snažne povezanosti između CRP i lipida ($r=0,394$; $0,381$; $-0,327$; $p=0,0043$; $0,0091$; $0,0267$) što navodi na zaključak da terapija mijenja fiziološke metaboličke putove lipida i upalnih molekula. Nađena je negativna povezanost vitamina D s trajanjem bolesti ($r=-0,322$, $p=0,0454$) što ukazuje na to da dugotrajna terapija možemo rezultirati nedostatkom vitamina D.

U bolesnika s nesanicom najviše su izražene povezanosti CRP s lipidima te sa životnom dobi ($r=0,297$; $0,325$; $0,380$; $0,345$; $p=0,0402$; $0,0243$; $0,0077$; $0,0099$), a nisu nađene povezanosti CRP-a s trajanjem bolesti što upućuje na pretpostavku da će starija životna dob s nesanicom imati više razine CRP-a. U obje podskupine u kategoriji poremećaja spavanja koncentracije lipida pozitivno koreliraju sa životnom dobi i trajanjem bolesti.

5. RASPRAVA

Shizofrenija je kompleksni poremećaj nerazjašnjene etiopatogeneze. Novija istraživanja upućuju na upalni proces kao podlogu razvoja psihoze odnosno imunološku reakciju koja uzrokuje patološke promjene krvno-moždane barijere što dovodi do prodora antitijela i citokina u moždano tkivo. Vitamin D ima protuupalna i neuroprotektivna svojstva te kao takav potencijalno može umanjiti psihopatologiju shizofrenije u pacijenata sa povišenom koncentracijom CRP-a. Inverzna korelacija između vitamina D i CRP-a je dosad proučavana u skupinama asimptomatskih odraslih osoba, pretilih osoba i novorođenčadi, ali postoji samo jedna studija koja je rađena na pacijentima sa dijagnosticiranom shizofenijom. Amer i Qayyum su, pručavajući populaciju asimptomatskih odraslih osoba zaključili da postoji statistički značajna inverzna korelacija između vitamina D i CRP-a u slučajevima kada je vitamina D <21 ng/mL (8,4 nmol/L), ali kada je koncentracija vitamina D veća od 21 ng/mL (8,4 nmol/L) popraćena je povišenjem serumskog CRP-a (Amer i Qayyum, 2012). Zaključili su da je suplementacija vitaminom D s ciljem smanjenja upale korisna samo za osobe sa niskim koncentracijama vitamina D u serumu, a poznato je da su pacijenti oboljeli od shizofrenije rizična skupina za deficijenciju vitamina D. U studiji na pretilim osobama, u multivariabilnoj regresijskoj analizi pokazano je da serumska koncentracija vitamina D inverzno korelira sa hsCRP-om, IL-6 i TNF- α nakon ujednačavanja prema dobi, spolu, sezoni testiranja i indeksom tjelesne mase te da u morbidno pretilih osoba vitamin D inverzno korelira sa biomarkerima sistemske inflamacije neovisno o ukupnoj masi masnog tkiva (Bellia i sur., 2013). Novorođenčad rođena u zimsko-proljetnim mjesecima sa koncentracijama vitamina D manjim od 25 nmol/L ima veću vjerojatnost za povišene koncentracije CRP-a (≥ 10 mg/L) nego ona sa koncentracijom vitamina D >25 nmol/L (Tao i sur., 2015).

S obzirom da je mnogobrojnim studijama potvrđeno da su osobe s dijagnosticiranom shizofenijom često vitamin D deficijentne, očekivano je da također imaju povišenu razinu CRP-a u odnosu na zdrave kontrole kao što su pokazali Zhu i suradnici 2015. Rezultati navedenog istraživanja su pokazali razliku i u vitaminu D i u CRP-u između pacijenata sa dijagnosticiranom shizofenijom (n=93) i zdravih kontrola (n=93): medijan vitamina D je iznosio 26,37 nmol/L za pacijente za shizofenijom, a 43,69 nmol/L za zdrave kontrole te 5.72 mg/L i 3.92 mg/L za

vrijednosti CRP-a u navedenim skupinama respektabilno (Zhu i sur., 2015). Navedeni podaci se slažu sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju: medijan vitamina D za skupinu oboljelih od shizofrenije iznosi 46 nmol/L, a za heterogenu populaciju 57 nmol/L. Medijan serumskog CRP-a za skupinu oboljelih od shizofrenije iznosi 1,90 mg/L, ali podaci CRP-a za heterogenu populaciju su klinički neiskoristivi zbog velikog broja pacijenata sa različitih bolničkih jedinica (n=4182) te samim time velikog raspona vrijednosti CRP-a koji je kao upalni marker nespecifičan i povišen u raznim patološkim stanjima poput neoplazmi, infektivnih bolesti, poslijeoperativnim komplikacijama, infarkta miokarda, itd. Međutim, poznata je činjenica da koncentracija CRP-a raste s dobi (Wener i sur., 2000), a medijan dobi heterogene populacije (59 godina) je viši od skupine oboljelih od shizofrenije (38 godina) i možemo očekivati više vrijednosti CRP-a u heterogenoj populaciji. Premda je sezonska varijabilnost vitamina D izbjegnuta odabirom identičnog razdoblja uzorkovanja, nedostatak ovog istraživanja je manjak zdravih kontrola kako bi vrijednosti CRP-a mogli usporediti. S druge strane, velik broj pacijenata u heterogenoj populaciji u kojoj prevladavaju vanjski pacijenti (69,3%) koji nisu u akutnom stanju i mahom su zdravi, pridonosi pouzdanosti statističkoj analizi koncentracija vitamina D.

Rezultati nisu pokazali korelaciju vitamina D i CRP-a u skupini pacijenata dijagnosticiranih sa shizofrenijom ($p = 0,3015$) te je regresijska analiza neutemeljena. Nedostatak istraživanja je manjak isključnih kriterija poput nedavnih oboljenja, operativnih zahvata, infekcija i konzumacije psihoaktivnih supstanci. Nedovoljan broj uzoraka učinio bi takve podskupine premale za statističku obradu te je potrebno daljnje studije učiniti na većoj populaciji pacijenata. Isto vrijedi i za važnost godišnjih doba za uzorkovanje jer se očekuju veće koncentracije vitamina D u ljetnim mjesecima u odnosu na zimske. Potreba za sezonskim, dvosmjernim istraživanjima kod vitamina D pokazuje se nezaobilaznom u donošenju ispravnih zaključaka. Zanimljiva je usporedba vitamina D skupine SHI sa skupinom ambulantnih (vanjskih) ispitanika te sa skupinom najtežih, vitalno ugroženih bolesnika liječenih na odjelu intenzivne skrbi i poglavito na parenteralnoj prehrani. Ambulantni pacijenti imaju značajno više vrijednosti u odnosu na skupinu SHI, vjerojatno zbog boljeg općeg stanja i velike vjerojatnosti da su zdravi. Bolesnici iz Jedinice intenzivnog liječenja imaju snižene vrijednosti u usporedbi sa SHI ispitanicima jer je njihovo akutno stanje najvišeg stupnja bez adekvatne prehrane per os.

Nadalje, uspostava podskupina u odnosu na neprimjenu/primjenu psihofarmaka, u odnosu na pozitivan/negativan hereditet (iz obiteljske anamneze) ili prisutnost smetnji u spavanju nije pokazala značajnu korelaciju, svi koeficijenti korelacije bili su $< 0,2$ sa statističkom značajnošću iznad $p > 0,05$ (od 0,2302 do 0,4688). Zaključno utvrđujemo da nije nađena povezanost CRP-a i vitamina D.

Iz istog uzorka koji se koristio za mjerenje vitamina D i CRP-a, izmjeren je i lipidni profil pacijenta (kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol i trigliceridi). Korelacijska analiza nakon izdvajanja spolova upućuju na povezanost koncentracije vitamina D s lipidima i životnoj dobi, ali različito za muškarce i žene. U žena vitamin D negativno korelira s godinama života ($r = -0,296$, $p = 0,0543$) što je objašnjivo medijanom dobi skupine koji iznosi 58 godina te su moguće hormonski uvjetovane promjene zbog menopauze. U muškaraca je pozitivno povezan s trigliceridima ($r = 0,323$, $p = 0,0348$). U oba spola lipidi koreliraju sa životnom dobi, a u muškaraca je dodatno izražena i povezanost životne dobi s CRP-om te međusobna pozitivna povezanost lipida i CRP-a.

S obzirom na sniženu kvalitetu života osoba oboljelih od shizofrenije i metaboličkim sindromom kao čestom nuspojavom terapije antipsihoticima, očekivan je promijenjen metabolizam lipida te njegova povezanost s inflamatornim statusom, razinom vitamina D, terapijom psihofarmacima kao i trajanjem bolesti. Važno je naglasiti da smo kod bolesnika koji su na terapiji psihofarmacima pronašli povezanost samo između životne dobi i LDL-kolesterola ($r = 0,399$, $p = 0,0160$), a gubi se pravilnost odnosa i korelacije životne dobi i ostalih lipida koja je izražena u skupini koja ne prima terapiju što navodi na zaključak da terapija utječe na metaboličke putove lipida i upalnih molekula, poglavito primjena atipičnih antipsihotika. Na temelju povećanog rizika od kardiovaskularnih oboljenja, koja su najčešći uzrok prijevremene smrti pacijenata oboljelih od shizofrenije, podijelili smo populaciju na koncentracijske kategorije CRP prema rizičnosti od kardiovaskularnih bolesti (niski rizik < 1 mg/L; srednji rizik 1-3 mg/L; visoki rizik > 3 mg/L; vrlo visoki rizik > 10 mg/L) (Myers, 2009) te usporedili sa vitaminom D. Nađena jedino vrlo slaba negativna povezanost ($r = -0,259$) bez statističke značajnosti ($P = 0,5003$), pretpostavljamo zbog nedefiniranih isključnih kriterija poput neoplazmi, nedavnih operativnih zahvata, konzumacije psihoaktivnih supstanci itd. te malog broja uzoraka u pojedinim podskupina jer je ukupan broj pacijenata relativno malen ($n = 90$). Nađena je negativna povezanost

vitamina D s trajanjem bolesti ($r=-0,322$, $p=0,0454$) što ukazuje na to da dugotrajna terapija može rezultirati nedostatkom vitamina D. Moguće je da promijenjen metabolizam lipida zahvaća i metabolizam vitamina D. Sažeto, s porastom životne dobi i trajanjem bolesti rastu i koncentracije lipida i CRP, a s porastom triglicerida povezan je porast koncentracija vitamina D. Budući da je kolesterolska struktura ishodište vitamina D, a ukupni kolesterol nije povezan s koncentracijom vitamina, možemo pretpostaviti da se kolesterol u ovih bolesnika usmjerava na druge metaboličke puteve, koji potencijalno doprinose razvoju hiperlipidemije, i nije povezan s metaboličkim putevima sinteze vitamina D. Povišene razine kolesterola povezane su sa sniženim koncentracijama vitamina D u serumu u generalnoj populaciji te se sniženi vitamin D može smatrati markerom za povišene aterogene lipoproteine (Ooi i sur., 2014).

U bolesnika s nesanicom najviše su izražene povezanosti CRP s lipidima, a neovisne su o trajanju bolesti. U tih bolesnika, kao i u onih koji nemju nesanicu, koncentracija lipida povezana je s životnom dobi i trajanjem bolesti. Sažeto, ponavlja se u svih podskupina povezanost lipida i životne dobi te lipida i trajanja bolesti, dok kod bolesnika s nesanicom dodatno se ističe korelacija CRP sa životnom dobi. Sažeto, što je bolesnik sa smetnjama u spavanju stariji to će biti veća koncentracija CRP koja je indikator upalnog stanja i općenito većeg rizika od komorbiditeta. Dokazano je da na razine medijatora upale utječe gubitak sna te, unatoč malim promjenama, takvi sub-klinički pomaci upalnih citokina doprinose vjerojatnosti razvoja metaboličkog sindroma su inače zdravim, asimptomatskih pojedincima (Mullington i sur., 2010).

. Nedostaci ovog istraživanja uključuju manjak zdravih kontrola kako bi vrijednosti CRP-a bile usporedive, ali s druge strane, velik broj pacijenata u heterogenoj populaciji u kojoj prevladavaju ambulantni pacijenti koji nisu u akutnom stanju, pridonosi pouzdanosti statističke analize vitamina D. Potrebna su daljnja sezonska, dvosmjerna istraživanja za korelaciju vitamina D i CRP-a na većoj populaciji pacijenata dijagnosticiranih sa shizofrenijom kako bi se donijeli ispravni zaključci.

6. ZAKLJUČAK

1. Izmjerena koncentracija vitamina D značajno je niža u usporedbi sa heterogenom populacijom ne-psihijatrijskih pacijenata ($p=0,0190$).
2. Medijan serumske koncentracije vitamina D ($M=46$ nmol/L) u skupine pacijenata je niži od preporučene vrijednosti (>75 nmol/L) što je u skladu s do sada publiciranim studijama o deficienciji vitamina D u takvih bolesnika.
3. Medijan serumske koncentracije vitamina D populacije ($M=57$ nmol/L) bez psihijatrijskog poremećaja ($n=4182$) niži je od preporučene vrijednosti (>75 nmol/L) što je odraz stvarnog stanja u populaciji ovog podneblja.
4. Inverzna korelacija vitamina D i CRP-a u skupini pacijenata sa shizofrenijom nije potvrđena što upućuje na potrebu daljnjih studija na većem broju pacijenata.
5. Korelacijska analiza nakon izdvajanja spolova upućuje na povezanost koncentracije vitamina D s lipidima i životnom dobi, ali različita za muškarce i žene. Ustanovljena je negativna povezanost vitamina D s trajanjem bolesti, a za hereditarne faktore i terapiju psihofarmacima nisu pokazane značajne korelacije.
6. Podjela ispitanika oboljelih od shizofrenije na kategorije CRP-a prema rizičnosti od kardiovaskularnih bolesti pokazala je u rizičnoj skupini tek vrlo slabu negativnu korelaciju vitamina D i CRP-a ($r=0,259$) bez statističke značajnosti ($p=0,5003$), što upućuje na moguću korelaciju na većem broju ispitanika.
7. U bolesnika s nesanicom najviše su izražene povezanosti CRP s lipidima, neovisno o trajanju bolesti što se može povezati s utjecajem upalnog stanja uzrokovanog manjkom sna i većom vjerojatnošću za razvoj metaboličkog sindroma.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na ukazanom povjerenju, bezgraničnom strpljenju i pomoći pri pisanju rada te osoblju Kliničkog zavoda kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice za strpljivo usmjeravanje tijekom eksperimentalnog rada. Nadalje, zahvaljujem se Abbott Laboratories d.o.o. Zagrebu jer su donacijom reagensa omogućili izradu ovog rada. Također velika hvala liječnicima i medicinskim sestrama Klinike za psihijatriju KBC Sestre milosrdnice za odabir bolesnika i pomoć kod uzorkovanja krvi.

8. LITERATURA

Amer M, Qayyum R. Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). *Am J Cardiol.* 2012;109(2):226-230.

Balbanova S, Richter HP, Antoniadis G, Homoki J, Kemmer N, Hanle J et al. 25-hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr.* 1984;62(22):1086-1090.

Bellia A, Garcovich C, D'Adamo M, Lombardo M, Tesauro M, Donadel G et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Intern Emerg Med.* 2013;8(1):33-40.

Brown HE, Roffman JL. Vitamin supplementation in the treatment of shizophrenia. *CNS Drugs.* 2014;28(7):611-622.

Colton T., *Statistics in Medicine.* Boston, Little, Brown and Company, 1974., str. 211.

Čepelak I., Čvorišćec D. *Štrausova medicinska biokemija,* Zagreb, Medicinska naklada, 2009.

DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1689S-1696S.

Dickerson F, Stallings C, Origoni A, Boronow J, Yolken R. C-reactive protein is associated with the severity of cognitive impairment but not of psychiatric symptoms in individuals with shizophrenia. *Shizophr Res.* 2007;93(1-3):261-265.

Eyles DW, Brown J, Mackay-Sim A, McGarth J, Feron F. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience.* 2003;118(3):641-653.

Eyles DW, Burne TH, McGarth JJ. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front neuroendocrinol.* 2013;34(1):47-64.

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGarth JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005;29(1):21-30.

Fan X, Pristach C, Liu EY, Freudenreich O, Henderson DC, Goff DC. Elevated serum levels of C-reactive protein are associated with more severe psychopathology in a subgroup of patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2007;149(1-3):267-271.

First MB, Ward MN. *Diagnostic and statistic manual of mental disorders*, 5th ed., Arlington, American Psychiatric Association., DC. 2013;87-90.

Firth J, Carney R, Stubbs B, Teasdale SB, Vancampfort D, Ward PB et al. Nutritional deficiencies and clinical correlates in first-episode psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Bull.* 2017 Nov 30. doi: 10.1093/schbul/sbx162 (epub ahead of print)

Folnegović-Grošić P., *Objektivnost terapijskog odgovora u liječenju prve epizode shizofrenih bolesnika novim antipsihoticima*, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative centrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.

Gaser C, Nenadic I, Buchsbaum BR, Hazlett EA. Ventricular enlargement in schizophrenia related to volume reduction of the thalamus, striatum, and superior temporal cortex. *Am J Psychiatry.* 2004;161(1):154-156.

Gejman PV, Sanders AR, Duan J. The role of genetics in etiology of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 2010;33(1):35-36

Grudet C, Malm J, Westrin A, Brundin L. Suicidal patients are deficient in vitamin D, associated with a pro-inflammatory status in the blood. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;50:210-9.

Hollo A, Clemens Z, Kamondi A, Lakatos P, Szucs A. Correction of vitamin D deficiency improves seizure control in epilepsy: a pilot study. *Epilepsy Behav.* 2012;24:131-133.

Keum N, Giovannucci E. Vitamin D supplements and cancer incidence and mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014;111(5):976-980.

Krivoy A, Onn R, Vilner Y, Hochman E, Weizman S, Paz A et al. Vitamin D Supplementation in Chronic Schizophrenia Patients Treated with Clozapine: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Clinical Trial. *EBioMedicine*. 2017;26:138-45.

Marnell L, Mold C, Du Clow TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol*. 2005;117(2):104-111.

McGarth JJ, Eyles DW, Pedersen CB, Anderson C, Ko P, Burne TH et al. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: a population-based case-control study. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(9):889-894.

Miller BJ, Culpepper N, Rapaport MH. C-reactive protein levels in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Clin Schizophr Relat Psychoses*. 2014;7(4):223-230.

Mullington JM, Simpson NS, Meier-Ewert HK, Haack M. Sleep loss and inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(5):775-784.

Myers GL. ed. Emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease and stroke. Atlanta, The National Academy of Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine Practice Guidelines, 2009.

Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Ohyama KY, Brachet P, Wion D. Expression of 25(OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuroreport*. 1993;5(3):255-257.

Ooi EM, Afzal S, Nordestgaard BG. Elevated remnant cholesterol in 25-hydroxyvitamin D deficiency in the general population: Mendelian randomization study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(5):650-658.

Ramachandraiah CT, Subramaniam N, Tancer M. The story of antipsychotics: past and present. *Indian J Psychiatry*. 2009;51(4):324-326.

Roffman JL, Petruzzi LJ, Tanner AS, Brown HE, Eryilmaz H, Ho NF et al. Biochemical, physiological and clinical effects of l-methylfolate in schizophrenia: a randomized controlled trial. *Mol Psychiatry*. 2018;23(2):316-322.

Salavert J, Grados D, Ramiro N, Carrion MI, Fadeuilhe C, Palma F et al. Association between vitamin D status and schizophrenia: a first psychotic episode study. *J Nerv Ment Dis.* 2017;205:409-412.

Salazar J, Martinez MS, Chavez-Castillo M, Nunez V. C-reactive protein: an in-depth look into structure, function and regulation. *Int Sch Res Notices.* 2014: 653045. doi: 10.1155/2014/653045.

Shivakumar V, Kalmady SV, Amaresha AC, Jose D, Narayanaswamy JC, Agarwal SM et al. Serum vitamin D and hippocampal gray matter volume in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2015;233:175-9.

Shrivastava AK, Singh HV, Raizada A, Singh SK. C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *The Egyptian Heart Journal.* 2015;2:89-97.

Singh B, Chaudhuri TK. Role of C-reactive protein in schizophrenia: an overview. *Psychiatry Res.* 2014;216(2):277-285.

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(4223):1188-1190.

Tao RX, Zhou QF, Xu ZW, Hao JH, Huang K, Mou Z et al. Inverse correlation between vitamin D and C-reactive protein in newborns. *Nutrients.* 2015;7(11):9218-9228.

Üçok A, Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry.* 2008;7(1):58-62.

Wener MH, Daum PR, McQuillan GM. The influence of age, sex, and race on the upper reference limit of serum C-reactive protein concentration. *J Rheumatol.* 2000;27(10):2351-2359.

Wrzosek M, Lukaszewicz J, Wrzosek M, Jakubczyk A, Matsumoto H, Piathewicz P et al. Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 2013;65:271-8.

Zhu DM, Liu Y, Zhang AG, Chu ZX, Wu Q, Li H et al. High levels of vitamin D in relation to reduced risk of shizophrenia with elevated C-reactive protein. *Psychiatry Res.* 2015;228(3):565-70.

9. SAŽETAK

Kristina Bišof

POVEZANOST C-REAKTIVNOG PROTEINA I VITAMINA D U SHIZOFRENIJI

Shizofrenija je kronični mentalni poremećaj nepoznate etiopatogeneze obilježen deluzijama i halucinacijama. Na razvoj bolesti utječe kombinacija okolišnih i genetskih faktora, a manifestira se izmjenama faza akutnih simptoma i remisije. Zbog velikog tereta pojedincu, što zbog stigme i posljedične izolacije iz društva, tako i medicinskoj zajednici zbog nesuradljivosti pacijenata, cilj je pronaći nove terapijske smjerove koji bi pridonijeli uspješnosti liječenja i kvaliteti života pacijenata. Smatra se da u podlozi mehanizma nastanka psihoze stoji upalni proces te su biomarkeri sistemske upale redovito povišeni u skupini bolesnika oboljelih od shizofrenije. Vitamin D ima protuupalna i neuroprotektivna svojstva, a pacijenti dijagnosticirani sa shizofrenijom su rizična skupina za deficijenciju vitamina D što otvara pitanje suplementacije kao terapijskog smjera za poboljšanje uspješnosti liječenja.

Cilj ovog istraživanja je ispitati hipotezu da su C-reaktivni protein i vitamin D inverzno povezani kod pacijenata oboljelih od shizofrenije. U istom periodu godine prikupljeni su uzorci seruma (n=90) pacijenata na Klinici za psihijatriju KBC Sestre Milosrdnice u kojima je izmjeren C-reaktivni protein, vitamin D i lipidni profil. Rezultati su uspoređeni sa heterogenom populacijom ne-psihijatrijskih pacijenata (n=4182). Medijan serumske koncentracije vitamina D (M=46 nmol/L) za skupinu pacijenata oboljelih od shizofrenije je niži od preporučene vrijednosti (>75 nmol/L) i značajno snižen u odnosu na heterogenu populaciju (p=0,0190) što je u skladu s do sada publiciranim studijama o deficijenciji vitamina D u takvih bolesnika. Podjela ispitanika oboljelih od shizofrenije na kategorije CRP-a prema rizičnosti od kardiovaskularnih bolesti pokazala je u rizičnoj skupini tek vrlo slabu negativnu korelaciju vitamina D i CRP-a (r=0,259) bez statističke značajnosti (p=0,5003), što upućuje na moguću korelaciju na većem broju ispitanika. Korelacijska analiza nakon izdvajanja spolova upućuje na povezanost koncentracije vitamina D s lipidima i životnom dobi, ali različita za muškarce i žene. Nadalje, ustanovljena je negativna povezanost vitamina D s trajanjem bolesti (p=0,0454), a za hereditarne faktore i terapiju psihofarmacima nisu pokazane značajne korelacije. U bolesnika s nesanicom najviše su izražene povezanosti CRP s lipidima (p=0,0099-0,0402), a neovisne su o trajanju bolesti što

se može povezati sa utjecajem upalnog stanja uzrokovanog manjkom sna i većom vjerojatnošću za razvoj metaboličkog sindroma. Daljnja pouzdana istraživanja potrebna su na većem broj pacijenata s usklađenim zdravim kontrolama.

Ključne riječi: shizofrenija, C-reaktivni protein, vitamin D

10. SUMMARY

Kristina Bišof

CORRELATION BETWEEN C-REACTIVE PROTEIN AND VITAMIN D IN SCHIZOPHRENIA

Schizophrenia is a mental disorder of unknown etiopathogenesis characterised by delusions and hallucinations. Development of the disease is governed by a combination of environmental and genetic factors and it manifests as periods of acute symptoms and remission. Since it lays a heavy burden on patients, because of stigma and social isolation, and the medical community because of noncompliant patients, it is important to find new therapeutic paths which would ensure a more successful treatment and better quality of life for patients with schizophrenia. It is speculated that the underlying mechanism responsible for psychosis is inflammation and inflammatory biomarkers have been found to be elevated in schizophrenia patients. Vitamin D has anti-inflammatory and neuroprotective properties and schizophrenia patients are at risk of being vitamin D deficient, which raises the question of supplementation as adjunctive therapy for better outcome.

The objective of this research is to question the hypothesis that C-reactive protein and vitamin D are inversely correlated in patients diagnosed with schizophrenia. Samples of serum, seasonally adjusted, were obtained from patients admitted at the Psychiatry department at Clinical hospital center Sestier milosrdnice (n=90) which were tested for C-reactive protein, vitamin D and lipid profile. Results were compared with a heterogeneous group of non-psychiatric patients (n=4182). Vitamin D serum concentration median (M)46 nmol/L) for patients suffering from schizophrenia measured lower than the recommended value (>75 nmol/L) and was found to be significantly lower compared to non-psychiatric patients (p=0,0190) which is congruent with previous studies done on this subject. Dividing patients suffering from schizophrenia in subgroups based on C-reactive protein levels and cardiovascular risk and correlating them with vitamin D yielded a weak negative correlation (r=0,259) with of no statistical significance (p=0,5003), but opened the possibility of stronger correlation with a bigger sample pool. After adjusting for sex, analysis found a correlation of vitamin D with lipid levels and age, but different for males and females. Furthermore, a negative correlation between vitamin D and duration of disease was

found ($p=0,0454$), but hereditary factors and antipsychotic therapy showed no significant correlation. For patients suffering from insomnia there is a significant correlation of C-reactive protein and lipid concentrations ($p=0,0099-0,0402$), but it is independent of duration of disease which can occur as a result of the inflammatory state induced by a lack of sleep that is associated with higher probability of developing metabolic syndrome. Further research on a larger population of schizophrenia patients with matched healthy controls is needed.

Key words: schizophrenia, C-reactive protein, vitamin D