

# Utjecaj statusa vitamina D u organizmu na tijek infekcije virusom SARS-CoV-2

---

Šimunović, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:556429>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Mia Šimunović**

**Utjecaj statusa vitamina D u organizmu na tijek  
infekcije virusom SARS-CoV-2**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura, na strpljenju i velikoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Najveća zahvala ide mojoj obitelji, posebno roditeljima, koji su mi uvijek pružali neizmjernu podršku.*

*Veliko hvala i svim mojim prijateljima te kolegama koji su uvijek bili tu kad je bilo najteže.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	COVID-19 .....	2
1.2.	Vitamin D .....	3
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	5
3.	MATERIJALI I METODE.....	6
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	7
4.1.	Vitamin D i metabolizam .....	7
4.1.1.	Sinteza vitamina D .....	8
4.1.2.	Aktivacija i transport vitamina D u organizmu .....	9
4.1.3.	Izlučivanje vitamina D.....	12
4.2.	Referentne vrijednosti vitamina D.....	13
4.3.	Virusne infekcije.....	16
4.3.1.	Obrana respiratornog epitela od virusa.....	18
4.4.	Imunopatologija SARS-CoV-2.....	21
4.4.1.	ACE2 receptori .....	22
4.5.	Potencijalni učinci vitamina D u respiratornim virusnim infekcijama uključujući i COVID-19	25
4.5.1.	Djelovanje vitamina D i uloga u organizmu.....	26
4.5.2.	ACE2 receptori i vitamin D.....	31
4.5.3.	Toll-like receptori i vitamin D.....	33
4.5.4.	Neutrofili i vitamin D .....	35
4.5.5.	Makrofagi i vitamin D .....	36
4.5.6.	Ostali učinci vitamina D.....	38

5.	ZAKLJUČCI .....	41
6.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	42
7.	LITERATURA .....	46
8.	SAŽETAK.....	56
9.	Temeljna dokumentacijska kartica .....	58

# 1. UVOD

Pandemija koronavirusne bolesti COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) tekuća je pandemija nove bolesti dišnih puteva. Bolest se prvi put pojavila početkom prosinca 2019. godine u gradu Wuhanu u kineskoj provinciji Hubei. U samim počecima, ljudi su simptome zaraze poistovjećivali sa simptomima gripe ili prehlade, međutim, danas je poznato da je uzročnik ove bolesti novi soj koronavirusa nazvan SARS-CoV-2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). U ljudi uzrokuje simptome poput suhog kašlja, povišene tjelesne temperature, otežanog disanja i nedostatka zraka te nagli gubitak mirisa, okusa ili promjenu okusa. Rjeđe se javljaju i bolovi u mišićima, umor, glavobolja, zimica, povraćanje te proljev ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr), 2021a).

Virus se ubrzo počeo širiti i izvan Kine te su već sredinom siječnja 2020. godine zabilježeni slučajevi zaraze na Tajlandu, u Japanu, Francuskoj, Australiji, Nepal, Maleziji, Južnoj Koreji, Singapuru, Vijetnamu i na Tajvanu. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) je 30. siječnja 2020. godine proglasila epidemiju koronavirusa javnozdravstvenom prijetnjom od međunarodnog značaja zbog brzine širenja epidemije i nedovoljnog broja informacija o samom virusu ([www.who.int](http://www.who.int)).

Iako je Republika Hrvatska relativno rano započela s mjerama nadzora nad povratnicima iz zahvaćenih područja, prvi slučaj koronavirusa u Hrvatskoj zabilježen je 25. veljače 2020. godine ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr), 2021c). 10. ožujka te iste godine, bolest COVID-19 stavljena je na Listu zaraznih bolesti čije je sprječavanje i suzbijanje od interesa za Republiku Hrvatsku ([consilium.europa.eu](http://consilium.europa.eu)).

11. ožujka 2020. godine hrvatski ministar zdravstva Vili Beroš proglasio je epidemiju bolesti COVID-19, a istoga dana je i WHO proglasila pandemiju COVID-19 (narodne-novine.nn.hr).

S obzirom na ozbiljnost novonastale situacije i utjecaja pandemije na sve aspekte života, znanstvenici i stručnjaci diljem svijeta ujedinili su se u borbi protiv pandemije, a broj istraživanja i radova vezanih uz COVID-19 ne prestaje rasti.

## 1.1.COVID-19

COVID-19 je zarazna bolest uzrokovana novim koronavirusom SARS-CoV-2. Koronavirusi su raznolika grupa virusa koja inficira razne životinje, a mogu prouzročiti blage do teške respiratorne infekcije u ljudi. 2002. i 2012. godine, pojavila su se dva visoko patogena koronavirusa sa zoonotskim porijeklom, SARS-CoV (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) i MERS-CoV (engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*), koji su u ljudi uzrokovali fatalne respiratorne bolesti i tako postali novi javnozdravstveni problem 21. stoljeća. Krajem 2019. godine pojavio se novi koronavirus, poznatiji kao SARS-CoV-2, i uzrokovao epidemiju koronavirusne bolesti (COVID-19) koja je po broju zaraženih osoba i prostornom rasponu epidemijom zahvaćenih područja nadmašila i SARS i MERS (Hu i sur., 2021).

Iako je virus potekao od životinja, on se sada širi s osobe na osobu relativno brzo i lako. Uglavnom se prenosi kapljičnim putem uslijed kašljanja i kihanja zaražene osobe, a može i direktno ili indirektno preko zaraženih površina. Također, pokazalo se da SARS-CoV-2 ostaje vijabilan u aerosolu minimalno 3 sata i kao takav može uzrokovati zarazu ljudskog domaćina (Salian i sur., 2021).

Simptomi COVID-19 razlikuju se od pacijenta do pacijenta i nisu specifični, ali su u velikoj mjeri slični simptomima drugih viroza. Nakon inkubacijskog perioda koji većinom traje 4 do 14 dana, većina osoba razvije simptome koji variraju od blagih do vrlo teških, ali također su zabilježeni slučajevi u kojima su pacijenti bili asimptomatski kroz cijeli tijek infekcije virusom SARS-CoV-2 (Salian i sur., 2021). Ipak, najčešći klinički simptomi uključuju povišenu tjelesnu temperaturu, kašalj, otežano disanje, bolove u mišićima, umor itd. U težim slučajevima javlja se teška upala pluća, akutni sindrom respiratornog distresa (engl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS), sepsa i septički šok koji mogu uzrokovati smrt pacijenta. Kao i kod ostalih zaraznih bolesti, određene skupine ljudi imaju povećan rizik od razvoja teže kliničke slike, a osobe kod kojih je taj rizik izražen su starije osobe i osobe s kroničnim bolestima poput hipertenzije, dijabetesa, bolesti dišnih puteva, malignih bolesti, dijabetesa, pretilosti te kronične bolesti bubrega (Decyk i sur., 2022).

Jedna od najtežih komplikacija u pacijenata s COVID-19 je ARDS koji je povezan s prolongiranom hospitalizacijom i visokim mortalitetom, pogotovo u pacijenata kod kojih se razvije zatajenje organa. U takvim stanjima ključna je respiratorna podrška koja varira od terapije s visokim protokom kisika do pružanja neinvazivne te invazivne mehaničke ventilacije (Salian i sur., 2021).

Trenutno nema dovoljno dokaza utemeljenih na randomiziranim kontroliranim kliničkim studijama o učinkovitim i sigurnim lijekovima ili kombinaciji lijekova za liječenje bolesti COVID-19, no osnova liječenja je ublažavanje simptoma, sprječavanje komplikacija i progresije bolesti te simptomatsko i suportivno liječenje, uključujući i mjere intenzivnog liječenja za teže oboljele ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr), 2021b).

## **1.2. Vitamin D**

Vitamini su organske tvari raznovrsne strukture i kemijskih svojstava, potrebne u malim količinama, a esencijalne za normalno funkcioniranje organizma. Također, to su tvari koje se ne mogu u dovoljnim količinama sintetizirati u našem organizmu, nego ih se treba unositi hranom. Vitamin D pripada u grupu vitamina topljivih u mastima, a zahvaljujući UV svjetlosti može se sintetizirati u koži pomoću endogenog kolesterola (7-dehidrokolesterola). Najpoznatiji učinak u tijelu vezan je uz metabolizam minerala i održavanje zdravlja koštano-mišićnog sustava. Vitamin D pospješuje intestinalnu apsorpciju kalcija i fosfata, stimulira diferencijaciju osteoklasta, potiče resorpciju kalcija iz kosti i potiče mineralizaciju koštanog matriksa. Međutim, tijekom proteklih nekoliko desetljeća naše znanje o metabolizmu vitamina D se proširilo, a među važnim otkrićima treba izdvojiti pronalazak receptora za vitamin D (engl. *vitamin D receptor*, VDR) na stanicama izvan koštano-mišićnog sustava i to na stanicama imunskog sustava, crijevnim, pankreasnim te gonadnim stanicama, čime je dokazana raznovrsnija uloga vitamina D nego što se ranije smatralo (Prietl i sur., 2013).

Brojni su nekalcemijski učinci vitamina D, a koji se objašnjavaju imunomodulatornim učinkom aktivnog oblika vitamina D te utjecajem na proliferaciju i diferencijaciju stanica, kao što su: manji morbiditet i mortalitet od malignih bolesti, manji rizik od autoimunih bolesti (npr.



multipla skleroza, Chronova bolest, šećerna bolest tipa I, upalne reumatske bolesti poput reumatoidnog artritisa), manji rizik od kardiovaskularnih bolesti te bolja obrana od infekcija uključujući virusne respiratorne infekcije, bakterijske infekcije i tuberkulozu (Laktašić Žerjavić, 2020).

Upravo zbog velikog značaja vitamina D u ljudskom organizmu zabrinjavaju rezultati brojnih studija koji pokazuju na prisutnu pandemiju nedostatka vitamina D u cijelom svijetu, u raznim populacijama ispitanika te u svim dobnim skupinama, što predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Rizični čimbenici za nedostatak vitamina D su svi oni koji dovode do nedostatne sinteze u koži i nedovoljnog unosa hranom: nedovoljno izlaganje kože suncu, tamnija pigmentacija kože, korištenje krema s visokom UV zaštitom, starija životna dob, debljina, malapsorpcija i neadekvatne prehrambene navike, tj. neuzimanje suplemenata vitamina D. Iako bi se očekivalo da je nedostatak vitamina D veći u zemljama većih geografskih širina (zbog veće udaljenosti od ekvatora), to nije uvijek slučaj, a objašnjava se različitim kulturološkim navikama (izlaganje kože suncu) i stupnjem obogaćivanja hrane vitaminom D. Osim geografske varijacije u koncentraciji vitamina D prisutne su i sezonske varijacije, pri čemu se najniže vrijednosti bilježe zimi i u rano proljeće (Laktašić Žerjavić, 2020).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Izbijanje pandemije bolesti COVID-19 stvorilo je globalnu javnozdravstvenu krizu, stoga su nove preventivne zdravstvene mjere nužne kako bi se smanjio rizik od infekcije, progresije i pogoršanja bolesti. Brojne studije su pokazale da je vitamin D imunomodulatorni hormon s dokazanom učinkovitošću kod akutnih respiratornih infekcija. Suplementacija vitaminom D utječe na imunost sustav, a nedavne studije sugeriraju da nedostatak vitamina D može imati značajan utjecaj na tijek bolesti COVID-19.

S obzirom da su rizične skupine u pandemiji COVID-19 osobe starije životne dobi i polimorbidni bolesnici, a upravo su to one skupine u kojih se ujedno bilježe i niske vrijednosti vitamina D u krvi, održavanje optimalnog statusa vitamina D u krvi predstavlja potencijalnu strategiju koja može doprinijeti obrani od infekcija respiratornog sustava, posebice u starijih osoba i bolesnika s komorbiditetima. Stoga je hipoteza ovog rada da suplementacija vitaminom D može povoljno utjecati na tijek i razvoj bolesti COVID-19, kao i na samu ishod infekcije.

Cilj ovog preglednog diplomskog rada je prikupiti i dati pregled dosadašnjih znanstvenih spoznaja o kompleksnosti funkcija vitamina D, s naglaskom na njegovo imunomodulatorno djelovanje. Također je cilj ovog rada prikupiti najnovija saznanja o povezanosti razine vitamina D, posebice njegovog nedostatka, i tijeka razvoja infekcije COVID-19 te približiti ideju suplementacije vitaminom D kao potencijalnu terapiju u prevenciji i liječenju bolesti COVID-19.

### 3. MATERIJALI I METODE

Tijekom izrade ovog preglednog diplomskog rada korištena je stručna i znanstvena literatura na temu imunomodulatornog djelovanja vitamina D te bolesti COVID-19. U svrhu izrade pregledan je velik broj članaka i radova koji su objavljeni u stručnim i znanstvenim časopisima. Pretraživanje literature odvijalo se elektroničkim putem, a pretražene baze podataka su PubMed, Cochrane Library te Science Direct. Ključne riječi prema kojima se pretraživanje provodilo su: *vitamin D*, *1,25(OH)<sub>2</sub>D*, *immunomodulatory effects of vitamin D*, *COVID-19*, *SARS-CoV-2*, *respiratory diseases*.

U ovaj pregledni diplomski rad uključena su 84 literaturna navoda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Iako trenutno nema dovoljno dokaza na temelju kojih bi se suplementacija vitaminom D preporučila kao terapija za prevenciju i smanjenje rizika od COVID-19, ipak je poznat njegov zaštitni imunomodulatorni učinak u virusnim respiratornim bolestima, pa tako i u COVID-19. Zbog široko rasprostranjenog deficita vitamina D i njegovih protektivnih učinaka, postoji potreba za provođenjem daljnjih studija kako bi se bolje razumjela uzročno-posljedična veza između deficita vitamina D i tijeka bolesti COVID-19.

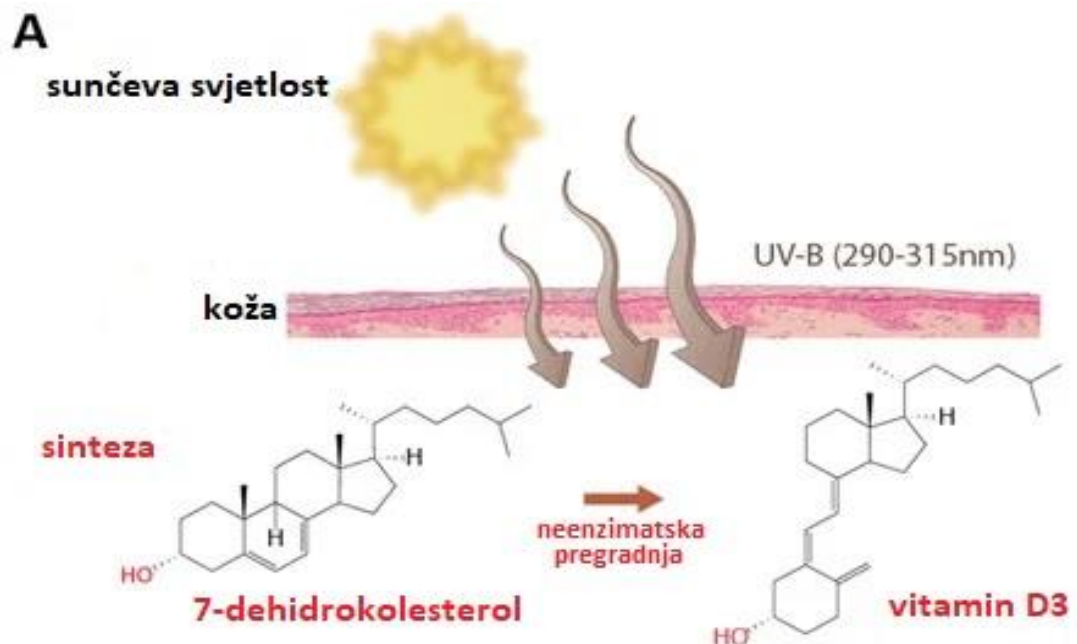
### 4.1. Vitamin D i metabolizam

Vitamin D je liposolubilni vitamin, a njegov najpoznatiji učinak u organizmu vezan je uz regulaciju metabolizma kalcija i fosfata koja ima esencijalnu ulogu u pregradnji kostiju, a samim time i održavanju zdravlja koštano-mišićnog sustava. Dva su osnovna izvora vitamina D. Vitamin D u organizam može biti unesen hranom, nakon čega se pomoću kilomikrona apsorbira u limfu, potom ulazi u cirkulaciju gdje se veže na vitamin D vezujući protein (engl. *vitamin D binding protein*, VDBP) i odlazi u jetru gdje započinje njegov metabolizam. Ipak, glavni izvor vitamina D je endogena sinteza u koži koja opskrbljuje tijelo s 80 – 90 % potrebne količine vitamina D (Laktašić-Žerjavić i sur., 2011).

Dva su osnovna oblika vitamina D, a to su vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) i vitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol). Ergokalciferol nastaje iz ergosterola pod utjecajem UVB zračenja u biljkama, kvascu i gljivama te može biti unesen u organizam putem hrane bogate biljnim izvorima. Kolekalciferol nastaje iz 7-dehidrokolesterola pod utjecajem UVB zračenja u epidermi kože i može biti unesen u organizam putem hrane bogate životinjskim izvorima. Vitamin D koji unesemo hranom, kao i onaj sintetiziran u koži, jest neaktivan oblik vitamina D. Da bi mogao ispoljiti svoje djelovanje, vitamin D se mora aktivirati uz dvije reakcije hidroksilacije, nakon čega može djelovati na ciljne stanice koje na svojoj površini eksprimiraju VDR (Jeon i Shin, 2018).

#### 4.1.1. Sinteza vitamina D

Kao što je već navedeno, vitamin D dolazi u dva osnovna oblika, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>, koja se po kemijskoj strukturi međusobno razlikuju u bočnom lancu. Ta strukturna razlika utječe na njihovo vezanje na VDBP te na metabolizam, međutim, biološka aktivnost njihovih aktivnih metabolita je usporediva. Vitamin D<sub>3</sub> sintetizira se u epidermi kože iz 7-dehidrokolesterola pod djelovanjem UVB zračenja (maksimalna efektivna valna duljina 290 - 310 nm) koje uzrokuje pucanje B prstena 7-dehidrokolesterola i dolazi do formiranja pre-D<sub>3</sub>. Pre-D<sub>3</sub> zatim podliježe toplinom induciranom rearanžmanu pri čemu dolazi do formacije D<sub>3</sub> (**Slika 1**) (Carlberg, 2019). Daljnje izlaganje UVB zračenju dovodi do reverzibilne konverzije pre-D<sub>3</sub> u lumisterol i tahisterol koji su biološki inaktivni i koji se pri prestanku UVB zračenja mogu ponovno konvertirati u pre-D<sub>3</sub> (Bikle, 2021).



**Slika 1.** Sinteza vitamina D<sub>3</sub> iz 7-dehidrokolesterola u epidermi (preuzeto i prilagođeno prema Carlberg, (2019) uz dopuštenje izdavača).

Čimbenici koji utječu na vrijeme potrebno za dostizanje maksimalne koncentracije pre-D<sub>3</sub> su stupanj epidermalne pigmentacije i intenzitet izloženosti, međutim, oni ne utječu na iznos maksimalne koncentracije. Iako koncentracija pre-D<sub>3</sub> doseže svoj maksimum, lumisterol se pri daljnjem izlaganju UVB zračenju akumulira (za razliku od tahisterola) i može opet konvertirati u pre-D<sub>3</sub> ukoliko razina pre-D<sub>3</sub> bude snižena. Upravo ova sposobnost fotokonverzije pre-D<sub>3</sub> u lumisterol i tahisterol štiti organizam od prevelikog izlaganja UVB zračenju i toksičnog učinka vitamina D (Bikle, 2021).

Još jedan mehanizam koji doprinosi kontroli i prevenciji toksičnog djelovanja vitamina D je proizvodnja melanina koja je pojačana pri povećanom izlaganju UV zračenju. Melanin je pigment u epidermi koji apsorbira UV zračenje. Međutim, to može rezultirati i smanjenom koncentracijom 25-hidroksivitamina D, (25(OH)D), koji predstavlja glavni cirkulirajući metabolit vitamina D, u serumu Afroamerikanaca i Hispanaca koji žive na području umjerene geografske širine. Također, bitnu ulogu u efektivnoj proizvodnji vitamina D<sub>3</sub> ima i intenzitet UV zračenja. Sezonske varijacije 25(OH)D mogu biti poprilično izražene, a manifestiraju se visokim razinama tijekom ljetnih mjeseci i nižim razinama tijekom zime. Opseg ove sezonske varijacije ovisi o geografskoj širini, a time i o intenzitetu sunčeve svjetlosti koja pada na izloženu kožu (Brenner i Hearing, 2008).

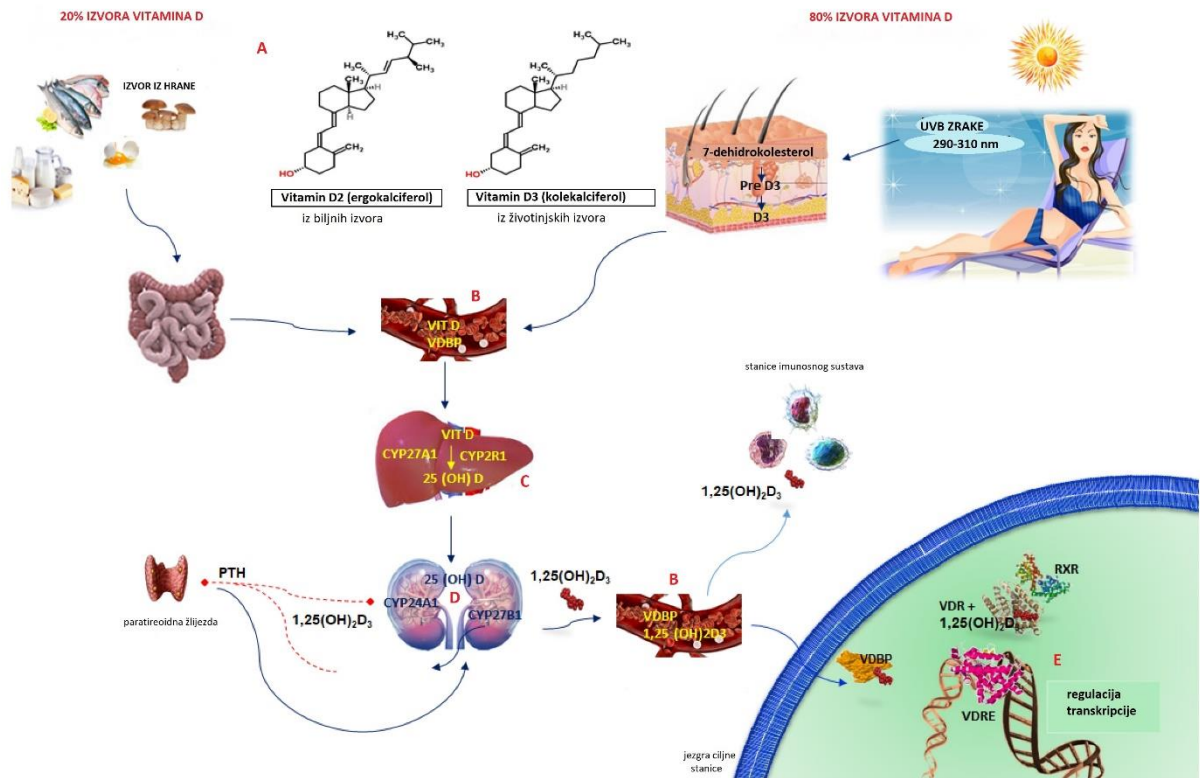
#### **4.1.2. Aktivacija i transport vitamina D u organizmu**

Vitamin D<sub>3</sub> koji je sintetiziran u epidermi biološki je inaktivan i kao takav se veže na VDBP, ulazi u cirkulaciju te se transferira do jetre (**Slika 2**). U jetri se hidroksilira uz pomoć enzima CYP27A1 i CYP2R1 što rezultira nastajanjem inaktivnog oblika 25(OH)D koji je već ranije naveden kao glavni cirkulirajući metabolit vitamina D i kao takav je najpouzdaniji parametar za određivanje statusa vitamina D u ljudi (Carlberg, 2019).

Međutim, kako bi metaboliti vitamina D postigli maksimum biološke aktivnosti, moraju dalje biti hidroksilirani u 1 $\alpha$  položaju. To se odvija uz katalitičku aktivnost enzima 1- $\alpha$ -hidroksilaza (engl. *1- $\alpha$ -hydroxylase*, CYP27B1), pri čemu nastaje biološki najpotentniji metabolit vitamina D, kalcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D), koji je zaslužan za većinu hormonske aktivnosti. Vitamin D i njegovi metaboliti, 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D, također mogu biti hidroksilirani i u položaju C24.

To može dovesti do aktivacije metabolita jer 1,24(OH)<sub>2</sub>D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D imaju sličnu biološku potettnost. Međutim, hidroksilacija na položaju C24 s već postojećom 25(OH) skupinom vodi do daljnjeg katabolizma (Bikle, 2021).

Aktivnost enzima CYP27B1 je pod strogom kontrolom paratiroidnog hormona (PTH) i faktora rasta fibroblasta 23 (FGF-23). Razina kalcitriola je regulirana mehanizmom negativne povratne sprege u bubregu, uključujući inhibiciju CYP27B1 uslijed visokih razina kalcitriola i FGF-23 te stimulaciju CYP24A1 koji katalizira metabolizam kalcitriola u inaktivni, u vodi topljivi oblik, kalcitriolnu kiselinu, koja se onda izlučuje putem žuči. Cirkulirajuće razine kalcitriola su pretežito određene biološkom aktivnošću CYP27B1. Također, neke druge stanice, uključujući i imunosne, eksprimiraju CYP27B1 što im daje sposobnost pretvorbe inaktivnog cirkulirajućeg oblika, 25(OH)D, u aktivni hormon koji onda može ispoljiti autokrino ili parakrino djelovanje (Prietl i sur., 2013).



**Slika 2.** Metabolizam vitamina D i njegovo fiziološko djelovanje. Endogena proizvodnja u koži ili unos prehranom i suplementacijom (A). Transport cirkulacijom u obliku vezanom na VDBP (B). Aktivacija u jetri (C). Aktivacija u bubrezima (D). Ligandom aktivirani VDR se u kompleksu veže na neko od svojih brojnih mjesta unutar genoma te uzrokuje aktivaciju (ili represiju) genskih meta vitamina D, što ima utjecaj na brojne fiziološke procese poput homeostaze kalcija koja je važna za formaciju kosti, regulacije urođene i stečene imunosti, smanjenja kronične upale i prevencije autoimunih bolesti (E) (preuzeto i prilagođeno prema Malaguarnera, (2020) uz dopuštenje izdavača).

Metaboliti vitamina D transportiraju se cirkulacijom primarno vezani na VDBP, ali manjim dijelom i vezani na albumin. Koncentracija VDBP-a u krvi je visoko iznad koncentracije metabolita vitamina D pa je zasićenje VDBP-a u krvi otprilike 2 %. Također, VDBP ima visok afinitet vezanja za metabolite vitamina D što rezultira jako malom koncentracijom slobodnih oblika metabolita vitamina D u normalnim okolnostima. Stanja poput bolesti jetre i nefrotičkog sindroma rezultiraju smanjenim koncentracijama VDBP-a i albumina što dovodi do sniženja razine ukupnog 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D, međutim, to ne mora nužno utjecati na koncentraciju njihovih



slobodnih oblika (Bouillon i sur., 2019). Također, razine VDBP-a su snižene tijekom akutnih bolesti što potencijalno dovodi do pogrešne interpretacije ukupne razine 25(OH)D (Bikle, 2021).

Bikle (2021.) dalje navodi kako metaboliti vitamina D koji su vezani na VDBP nisu dostupni većini stanica. Stoga je koncentracija slobodnih oblika metabolita vitamina D ona koja je kritična za stanični unos. Potpora za takav koncept u kojem je uloga VDBP-a osigurati rezervoar metabolita vitamina D, ali u kojem su njihovi slobodni oblici oni koji ispoljavaju biološku funkciju dolazi od studija koje su provedene na miševima u kojih je gen koji kodira za VDBP izbrisan i na ljudima u kojima je taj gen mutiran. U miševa sa deletiranim genom pretpostavlja se da su svi metaboliti vitamina D slobodni i/ili biodostupni. Ti miševi nisu pokazali znakove deficijencije vitamina D, osim ako su bili stavljeni na dijetu siromašnu vitaminom D, iako su imali jako niske razine 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D u serumu. Razine 1,25(OH)<sub>2</sub>D u tkvima bile su normalne kao i biljezi funkcija vitamina D (Safadi i sur., 1999).

#### **4.1.3. Izlučivanje vitamina D**

Velika potentnost 1,25(OH)<sub>2</sub>D u povećavanju serumskih razina kalcija i fosfata zahtijeva i strogu regulaciju njegovih cirkulirajućih razina. Regulacija serumske razine 1,25(OH)<sub>2</sub>D uključuje i recipročne promjene intenziteta njegove sinteze i degradacije. Metaboliti vitamina D primarno su katabolizirani oksidacijom postraničnog lanca. Glavni katabolički enzim koji sudjeluje u reakciji je član porodice CYP enzima, vitamin D-24-hidroksilaza. Vitamin D-24-hidroksilaza je visoko inducibilna od strane 1,25(OH)<sub>2</sub>D što osigurava mehanizam za prigušivanje odgovora na vitamin D i smanjivanje razina 1,25(OH)<sub>2</sub>D ukoliko su one abnormalno visoke. Miševi kojima nedostaje funkcionalni gen vitamin-D-24-hidroksilaze imaju visoke razine 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u serumu zbog smanjene sposobnosti njegove razgradnje (St-Arnaud i sur., 2000). Oksidacija postraničnog lanca započinje na C-24 ugljiku 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Zatim slijedi daljnja oksidacija na C-24, pri čemu nastaje keton, popraćena oksidacijom ugljika C-23 i posljedično oksidacijsko cijepanje postraničnog lanca. Svaki korak oksidacije uzrokuje progresivan gubitak biološke aktivnosti, a finalni produkt oksidacijskog cijepanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D je kalcitroična kiselina koja je biološki inaktivna (Brown i sur., 1999). Kalcitroična kiselina, sada topljiva u vodi, dalje se izlučuje putem žuči (Prietl i sur., 2013).

## 4.2.Referentne vrijednosti vitamina D

Posljednjih godina zabilježena je visoka prevalencija niskog unosa vitamina D te neadekvatan status vitamina D u Europi. Iako ne postoji dogovor oko optimalne razine vitamina D u plazmi, očito je da su razine 25(OH)D u krvi često ispod preporučenih razina za opću populaciju, a naročito su niske u nekim podgrupama populacije kao što su osobe smještene u institucijama, osobe koje su „vezane“ za kuću te ne-zapadnjački imigranti (Spiro i Buttriss, 2014).

Glavni izvor vitamina D za djecu i odrasle, kako je već navedeno, je izlaganje prirodnoj sunčevoj svjetlosti. Jako malo hrane sadrži ili je obogaćeno vitaminom D, stoga je i glavni razlog deficijencije vitamina D nedovoljno izlaganje sunčevoj svjetlosti. Mazanjem kreme za sunčanje sa zaštitnim faktorom 30 smanjuje sintezu vitamina D u koži za više od 95%. Također, osobe koje su prirodno tamnije puti imaju i prirodnu zaštitu, melanin, pa im je potrebno tri do pet puta duže izlaganje suncu kako bi proizvele jednaku količinu vitamina D kao osobe sa svjetlijom puti. Još jedan česti razlog deficijencije (**Slika 3**) vitamina D je pretilost. Naime, dokazana je inverzna povezanost serumske razine 25(OH)D i indeksa tjelesne mase (BMI) većeg od 30 kg/m<sup>2</sup> (Holick i sur., 2011).

Deficijencija vitamina D povijesno je definirana i preporučena od strane američke Nacionalne medicinske akademije (engl. *National Academy of Medicine*, NAM), kao koncentracija 25(OH)D u serumu manja od 20 ng/mL. Insuficijencija vitamina D definirana je kao koncentracija 25(OH)D u serumu 21-29 ng/mL. Djeca, mladi i sredovječni odrasli pokazuju jednako visoke rizike od deficijencije i insuficijencije vitamina D širom svijeta (Holick i sur., 2011).

Nadalje, Vranešić Bender i sur. (2016) navode kako je adekvatna razina vitamina D u serumu  $\geq 30$  ng/mL, dok su potencijalno povoljni nekalcemijski učinci ostvarivi kod koncentracija 25(OH)D 40 – 50 ng/mL. Suvišak vitamina D prisutan je kod serumskih koncentracija  $> 100$  ng/mL, a intoksikacija je primijećena tek kod koncentracija  $> 150$  ng/mL.

**Tablica 1.** Ekvivalenti izražavanja količine vitamina D (prema Spiro i Buttriss, 2014.)

Ekvivalentne jedinice količine vitamina D	
1 µg	2,5 nmol
1 µg	40 IU (internacionalnih jedinica)
1 ng/mL	2,5 nmol/L

Suvremene preporuke NAM-a savjetuju unos od 400 IU vitamina D na dan kod djece do godinu dana, 600 IU vitamina D na dan za osobe u dobi od 1 do 70 godina te 800 IU vitamina D na dan za starije od 70 godina. Budući da je nedostatak vitamina D vrlo rasprostranjen pa je u riziku velik dio populacije, Američko društvo za endokrinologiju savjetuje da se preporuke NAM-a uzmu kao minimalni preporučeni unos te je donijelo revidirane smjernice za unos vitamina D gdje se za odrasle osobe preporučuje dnevni unos od 1500 do 2000 IU (Vranešić Bender i sur., 2016.).

STATUS VITAMINA D			FAKTORI RIZIKA	
koncentracija 25(OH)D u serumu			<ul style="list-style-type: none"> <li>- geografska širina</li> <li>- boja kože</li> <li>- starost</li> <li>- pretilost</li> <li>- kreme sa zaštitnim faktorom</li> <li>- bolest bubrega</li> <li>- upalne bolesti crijeva</li> </ul>	
< 10 ng/mL	teška deficijencija			
10-20 ng/mL	deficijencija			
20-30 ng/mL	insuficijencija			
≥ 30 ng/mL	optimalna razina			
≥ 150 ng/mL	toksičnost			
DNEVNI UNOS				
dob	preporučeni unos (IU/dan)	gornja granica (IU/dan)		
Nacionalna akademija medicine (NAM)				
djeca (0 - 18 godina)	400 - 600	2500 (1 - 3 godina) 3000 (4 - 8 godina) 4000 (13 do 18 godina)		
odrasli (19 - 70)	600	4000		
stariji (>70)	800	4000		
trudnoća/laktacija	600	4000		
Društvo endokrinologa (ES)				
djeca (0 - 18)	400 - 1000	2500 - 4000		
odrasli (19 - 70)	1500 - 2000	10000		
stariji (>70)	1500 - 2000	10000		
trudnoća/laktacija	600 - 1000 (14 - 18 godina) 1500 - 2000 (19 - 50 godina)	10000		

**Slika 3.** Status vitamina D prema koncentraciji 25(OH)D u serumu, preporučeni dnevni unos te faktori rizika za razvoj deficijencije vitamina D (preuzeto i prilagođeno prema Malaguarnera, (2020) uz dopuštenje izdavača).

Nedostatak vitamina D može se uspješno liječiti njegovim pripravcima kod većine pacijenata s manjkom tog vitamina (**Tablica 2**). Orijentacijski se može izračunati da se za svakih 100 IU unesenog vitamina D koncentracija 25(OH)D u krvi povisi za 1,75 – 2,5 nmol/L (**Tablica 1**). Unatoč bojazni od intoksikacije vitaminom D, pokazalo se da tek doza od 50000 IU vitamina D na dan tijekom nekoliko mjeseci može uzrokovati intoksikaciju (Vranešić Bender i sur., 2016).

**Tablica 2.** Terapijska primjena vitamina D kod dokazanog nedostatka ovisno o dobi i komorbiditetima (prema Vranešić Bender i sur., 2016)

Dob/komorbiditet	Preporuka (IU/dan)
18+ godina	Tijekom 8 tjedana – 6000, potom održavanje s 1500 – 2000
Pretilost, malapsorpcija, lijekovi koji utječu na metabolizam vitamina D	Minimalno 6000 – 10.000 do koncentracije 25(OH)D > 75 nmol/L, potom održavanje s 3000 – 6000
Ekstrarenalna produkcija 1,25(OH) <sub>2</sub> D (npr. sarkoidoza, tuberkuloza, kronične gljivične infekcije)	Terapija vitaminom D do postizanja koncentracije 25(OH)D 50 – 75 nmol/L uz praćenje koncentracije 25(OH)D i kalcija u krvi kako bi se spriječile hiperkalcemija i hiperkalciurija koje se mogu javiti kod koncentracije 25(OH)D > 75 nmol/L
Primarni hiperparatiroidizam	Terapija vitaminom D prema potrebi uz praćenje koncentracije kalcija u krvi. Kod većine pacijenata koncentracija kalcija u krvi neće se povisiti, a PTH u krvi mogao bi se čak sniziti

### 4.3. Virusne infekcije

Na početku imunosnog odgovora na virusne patogene, prvi korak je izlaganje ljudskih stanica virusu. Primarni susret događa se u gornjem dišnom traktu kroz nosni epitel, krajnike i adenoide, gdje dolazi do razvoja početnog imunosnog odgovora u sluznici. Odgovor urođene imunosti započinje djelovanjem putem receptora za prepoznavanje molekularnih obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) na molekularne obrasce povezane s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) (Primorac i sur., 2022). PRR receptori vezani na

unutarnjim membranama stanice te citosolni PRR-ovi, uključeni su u snažne antivirusne odgovore posredovane interferonom tipa I (Boxx i Cheng, 2016). Osim toga, plazmacitoidne dendritičke stanice (engl. *plasmacytoid dendritic cells*, pDCs), prisutne u krvi i sluznicama, su visoko specijalizirane stanice za proizvodnju interferona tipa I (Primorac i sur., 2022). Osim izravnih antivirusnih učinaka, interferon tipa I djeluje kao glavna poveznica između urođenog i stečenog imunskog odgovora. Uspješna aktivacija odgovora urođene imunosti rezultira ograničenim virusnim ulaskom, translacijom, replikacijom i sastavljanjem, što pomaže identificirati i ukloniti zaražene stanice, pružajući sve preduvjete za ubrzani razvoj stečene imunosti (Diamond i Kanneganti, 2022).

Nakon što preživi urođenu obranu, virus se suočava s glavnim kompleksom histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) klase I i II te izravnom aktivacijom prirodnoubilačkih stanica (engl. *natural killer cell*, NK stanica). Molekule MHC-II, ugrađene u membrane antigen prezentirajućih stanica, makrofaga, dendritičkih stanica i B stanica, važne su u aktiviranju, proliferaciji i diferencijaciji B stanica, kao i aktivaciji CD4+ T stanica (Primorac i sur., 2022). Također, ekspresija MHC-II u stanicama može biti inducirana interferonom (engl. *interferon*, IFN)  $\gamma$  i modulirana drugim čimbenicima, kao što su interleukin (engl. *interleukin*, IL) 4, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , faktor nekroze tumora-alfa  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) i glukokortikoidi. Istovremeno, MHC-I se eksprimira na svim stanicama koje sadrže jezgru (uključujući trombocite) i služi uglavnom kao sredstvo za prepoznavanje antigena za CD8+ T stanice (Ting i Trowsdale, 2002). NK stanice predstavljaju 5-20% cirkulirajućih limfocita i 15% ukupnih mononuklearnih stanica periferne krvi u ljudi. Jedinstvena karakteristika NK stanica je sposobnost izravne identifikacije zaraženih stanica, izbjegavajući nužnost prisutnosti MHC-I kompleksa. Takvo djelovanje NK stanica omogućava im uništavanje intracelularnih patogena koji imaju sposobnost izbjegavanja CD8+ stanica ometajući ekspresiju MHC-I molekula (Langers i sur., 2012).

Ono što povezuje antigen prezentirajuće stanice (engl. *antigen presenting cells*, APC) i B stanice koje proizvode specifična protutijela su CD4+ Th stanice. Nakon što se naivne CD4+ Th stanice aktiviraju pomoću APC u limfnim čvorovima, one prelaze iz T-zone u germinalne centre gdje postaju T folikularne pomoćničke stanice (engl. *follicular helper cells*, TFH) te imaju

sposobnost aktivacije B stanica koje onda prolaze kroz nekoliko procesa kao što su promjena izotipa, somatska hipermutacija i brza dioba stanica. B stanice zatim diferenciraju u dugovječne plazma stanice visokog afiniteta koje proizvode antitijela ili memorijske B stanice koje će brže reagirati s antigenom na koji su prethodno bile imunizirane (Chiappelli i sur., 2020).

Ovo se također odnosi na TFH specifične za SARS-CoV-2 koje su visoko ekspanzirane kod pacijenata s blagim ili asimptomatskim oblikom COVID-19. Temeljito ispitivanje CD4+, CD8+ T stanica i B stanica specifičnih za različite SARS-CoV-2 proteine pokazalo je da koordinirana aktivacija humoralnog i staničnog dijela adaptivnog imunskog sustava uglavnom korelira s blažim oblikom COVID-19. Istodobno, nekoordinirani odgovor, opažen u starijoj populaciji, češće se javlja u bolesnika koji razviju teški oblik bolesti. Odgođeni humoralni odgovor i visoke razine imunoglobulina (engl. *immunoglobulin*, Ig) G, IgM i IgA odražavaju neravnotežu imunskog sustava koja korelira s lošim kliničkim ishodima (Primorac i sur., 2022).

#### **4.3.1. Obrana respiratornog epitela od virusa**

Epitelne stanice dišnih putova, koje oblažu sluznicu dišnog sustava, u izravnom su kontaktu s okolinom te su kao takve primarna meta inhaliranih patogena. Zdrava odrasla osoba udahne 7 – 8 L zraka u minuti što znači približno 11 000 L dnevno. Zajedno sa zrakom udišemo i mikroorganizme i onečišćenja iz okoliša te su iz tog razloga pluća opremljena s nekoliko snažnih obrambenih mehanizama. Provodni dišni putovi, koji djeluju kao prolaz za zrak koji ulazi i izlazi iz pluća, imaju ulogu vlaženja, zagrijavanja te filtriranja udahnutog zraka, čime štite alveole koje sudjeluju u izmjeni plinova (Ganjan i sur., 2020).

Epitelne stanice dišnih putova komuniciraju s drugim stanicama imunskog sustava, poput makrofaga, neutrofila i dendritičkih stanica, kako bi pospješile uklanjanje patogena i tako ograničile upalu pluća. Stoga se može zaključiti da epitel dišnih putova kroz formiranje fizičke barijere i poticanje odgovora urođene imunosti igra ključnu ulogu u čišćenju inhaliranih patogena i štetnih onečišćenja iz okoliša te održava homeostazu u plućima. Bolesnici s kroničnim plućnim bolestima poput kronične opstruktivske plućne bolesti (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, KOPB), astme i cistične fibroze češće pokazuju strukturno i funkcionalno promijenjen

epitel dišnih putova. Takve promjene mogu utjecati na imunski odgovor naspram respiratornih infekcija, ponekad ubrzavajući napredovanje plućne bolesti u ovih bolesnika (Ganjian i sur., 2020).

Epitel u proksimalnim dišnim putovima prekriven je površinskom tekućinom, koja se sastoji od tankog sloja manje viskozne pericilijarne tekućine i sloja poluviskozne sluzi. Sekreti klara stanica i submukoznih seroznih stanica pridonose pericilijarnoj tekućini, dok mucini koji formiraju gel, MUC5AC te MUC5B, izlučeni od strane goblet stanica i submukoznih žlijezda pridonose mukoznom sloju te imaju središnju ulogu u normalnoj obrani domaćina od infekcije putem mukocilijarnog klirensa i antimikrobnih svojstava sluzi (Ostedgaard i sur., 2017). Visina i viskoznost pericilijarne tekućine su kritični faktori koji određuju učinkovito jednosmjerno kretanje cilija. Mukozni sloj, koji je poluviskozan, hvata udahnute patogene i druge nečistoće u cilijama, a zatim mukozni sloj svojim jednosmjernim kretanjem pomiče zarobljeni materijal prema ždrijelu kako bi se uklonio iz respiratornog trakta (Knowles i Boucher, 2002). Suprotno tome, kronična hipersekrecija sluzi može oslabiti mukocilijarni klirens i uzrokovati opstrukciju posebno malih dišnih putova začepljenjem sluzi, te tako doprinijeti progresiji kroničnih upalnih bolesti dišnih putova kao što su astma, KOPB i cistična fibroza (Wang i sur., 2020).

Također, postoje i glikoproteinski mucini vezani na staničnu površinu koji stupaju u interakciju s glikozaminoglikanom keratin sulfatom te je pretpostavka da ovaj kompleks djeluje kao pericilijarna četka, stvarajući još jedan sloj zaštite sprječavajući prodor čestica i mikroorganizama. Tekućina na površini dišnog epitela također se sastoji od mješavine obrambenih molekula domaćina kao što su dušikov oksid, laktoferin, lizozim, defenzini i katelicidini (Singh i sur., 2000). Njih izlučuju epitelne stanice, submukozne žlijezde te ostale stanice imunskog sustava u plućima. Ove obrambene molekule domaćina sposobne su ubiti bakterije, viruse i gljivice izravno ili ograničavanjem esencijalnih mikronutrijenata potrebnih za uspješnu kolonizaciju patogena, stoga one funkcioniraju kao kemijski štit protiv udahnutih patogena. Ono što čini fizičku barijeru su, između ostalog, čvrsti i prijanjajući spojevi smješteni na apikolateralnoj granici epitelnih stanica dišnih putova jer svojim postojanjem sprječavaju paracelularnu invaziju inhaliranih patogena (Ganjian i sur., 2020).

Osim što djeluju kao fizička barijera, epitelne stanice dišnih putova aktivno sudjeluju u prepoznavanju patogena različitim receptorima za prepoznavanje molekularnih obrazaca, koji se



dijele na transmembranske receptore i one lokalizirane u unutarstaničnim odjeljcima (Heyl i sur., 2014). Prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih s patogenom putem PRR-a aktivira putove prijenosa signala koji vode do ekspresije antimikrobnih čimbenika kao što su defenzini, katelicidin te dušikov oksid. Ti antimikrobni čimbenici mogu izravno ubiti infektivne patogene bez uplitanja drugih stanica urođene imunosti u plućima (Vareille i sur., 2011). Epitelne stanice dišnih putova nakon prepoznavanja patogena također izražavaju proupalne kemokine i citokine kako bi se regrutirale druge stanice urođene imunosti u dišne putove i time poboljšala eliminacija patogena te riješila upala (Ganjian i sur., 2020).

Alveolarne epitelne stanice tipa II (engl. *alveolar type II epithelial cell*, AECII) održavaju alveolarni integritet formiranjem alveolarne barijere, proizvodnjom surfaktanata i popravljanjem oštećenog epitela (Fehrenbach, 2001). Također se pokazalo kako bi AECII mogle biti sastavni dio urođenog imuniteta pluća, djelujući na pojačavanje funkcije dendritičnih stanica i alveolarnih makrofaga. AECII također mogu obavljati druge važne funkcije kao što je izlučivanje citokina, prezentacija antigena i pojačanje fagocitoze makrofaga (Kannan i sur., 2009).

Kao odgovor na ozljedu ili patogen, akutni upalni odgovor štiti domaćina od sistemske infekcije i obnavlja homeostazu tkiva. Samim time, upala je zaštitna i ključna za zdravlje. Međutim, kada akutna upala nema ograničenja u amplitudi ili trajanju, može dovesti do bolesti. Budući da upala može uzrokovati oštećenje tkiva, česti i trajni upalni odgovori mogu dovesti do remodeliranja dišnih putova i uništavanja tkiva. Kako bi prevladali ovaj učinak, epitelne stanice dišnih puteva također ekspimiraju intrinzične protuupalne molekule kao što su inhibitorni metaboliti arahidonske kiseline, koji uključuju lipoksine, resolvine, prostaglandin E2, protuupalne citokine (IL-10 i transformirajući faktor rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ))... Mnoge od tih molekula su inducirane proupalnim citokinima, što sugerira da se mogu regulirati putevima negativne povratne sprege kako bi se ublažila upala. Stoga, disregulacija ili neravnoteža između upalnog i protuupalnog signaliziranja može rezultirati trajnom upalom pluća, što u konačnici dovodi do nepovratnog oštećenja tkiva (Levy i Serhan, 2014).

Također postoje brojni dokazi da epitelne stanice dišnih putova komuniciraju s drugim stanicama urođene imunosti putem izlučenih molekula kako bi uklonile patogene i održale homeostazu. Pod nestimuliranim uvjetima, bronhijalne epitelne stanice izlučuju TGF- $\beta$ , koji

zauzvrat inhibira TNF- $\alpha$  induciran lipopolisaharidom (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) u monocitima i makrofagima, inducira ekspresiju IL-10 i arginaze-1 u dendritičkim stanicama te inhibira proliferaciju T stanica (Mayer i sur., 2008).

Bronhijalne epitelne stanice eksprimiraju ligand receptora programirane smrti 1 (engl. *programmed death-ligand 1*, PD-L1) kao odgovor na respiratorni sincicijski virus, što aktivira i pospješuje proliferaciju te antiviralnu funkciju CD8<sup>+</sup> T limfocita u kulturi bronhijalnih epitelnih stanica i CD8<sup>+</sup> limfocita (Telcian i sur., 2011). U kulturi bronhijalnih epitelnih stanica i dendritičkih stanica, epitelne stanice izlučuju faktor stimulacije rasta granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF), faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) i vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) kao odgovor na infekciju respiratornog virusa, što pojačava ekspresiju IFN tipa I u plazmacitoidnim dendritičkim stanicama, a to je ključan čimbenik za uklanjanje virusa (Rahmatpanah i sur., 2019).

U alergijskom okruženju, epitelne stanice dišnih putova eksprimiraju timusni stromalni limfopoetin (engl. *thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) i IL-33 kao odgovor na virusnu infekciju i potiču stvaranje TH2 stanica (Hammad i sur., 2009). Ova saznanja pokazuju da interakcije epitelnih stanica dišnih putova s drugim urođenim imunskim stanicama igraju ključnu ulogu u oblikovanju cjelokupnog lokalnog urođenog imuniteta u plućima (Ganjian i sur., 2020).

#### **4.4.Imunopatologija SARS-CoV-2**

Inicijalno mjesto infekcije SARS-CoV-2 su pluća u kojima virus ulazi u stanice preko ACE2 receptora. Međutim, utvrđeno je da SARS-CoV-2 infekcija pokreće odgovor urođene i stečene imunosti koji uzrokuje jaki upalni odgovor koji dovodi do uništenja tkiva te lokalnih i sistemskih komplikacija (Malaguarrera, 2020). Pacijenti s teškim oblikom infekcije imali su značajno smanjen broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita, CD8<sup>+</sup> T-limfocita, B-limfocita i NK stanica (Huang i sur., 2020) te smanjeni broj monocita, eozinofila i bazofila, dok je broj neutrofila te omjer neutrofila i limfocita bio povišen i implicirao je na daljnje pogoršanje bolesti i loš klinički ishod (Qin i sur., 2020). Inače su u SARS-CoV-2 pacijenata povišeni biljezi iscrpljenosti poput receptora NKG2A (engl. *NK group 2 member A*) koji je zapravo zajednički inhibitorni receptor T-limfocita

i NK stanica. Upornom aktivacijom ovih stanica potiče se ekspresija NKG2A što posljedično može rezultirati progresijom kronične infekcije ili karcinomom. U oporavljenih bolesnika broj T-limfocita, B-limfocita, NK stanica te biljega iscrpljenosti se vrati u normalu (Zheng i sur., 2020).

Istraživanja pokazuju kako pacijenti s teškim oblikom infekcije pokazuju povišene serumske razine C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP), D-dimera i proupalnih citokina, uključujući IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-8, IL-17, G-CSF, GM-CSF, interferonom gama inducirani protein 10 (engl. *interferon gamma-induced protein 10*, IP10), monocitni kemoatraktantni protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1) i makrofagni upalni protein 1 $\alpha$  (engl. *macrophage inflammatory protein 1 alpha*, MIP-1 $\alpha$ ) što se naziva i citokinskom olujom. Pretjerana proizvodnja IL-6 jedan je od značajnijih biljega lošeg ishoda infekcije SARS-CoV-2 u pacijenata s ARDS-om (Huang i sur., 2020; Mokhtari i sur., 2020; Xu i sur., 2020).

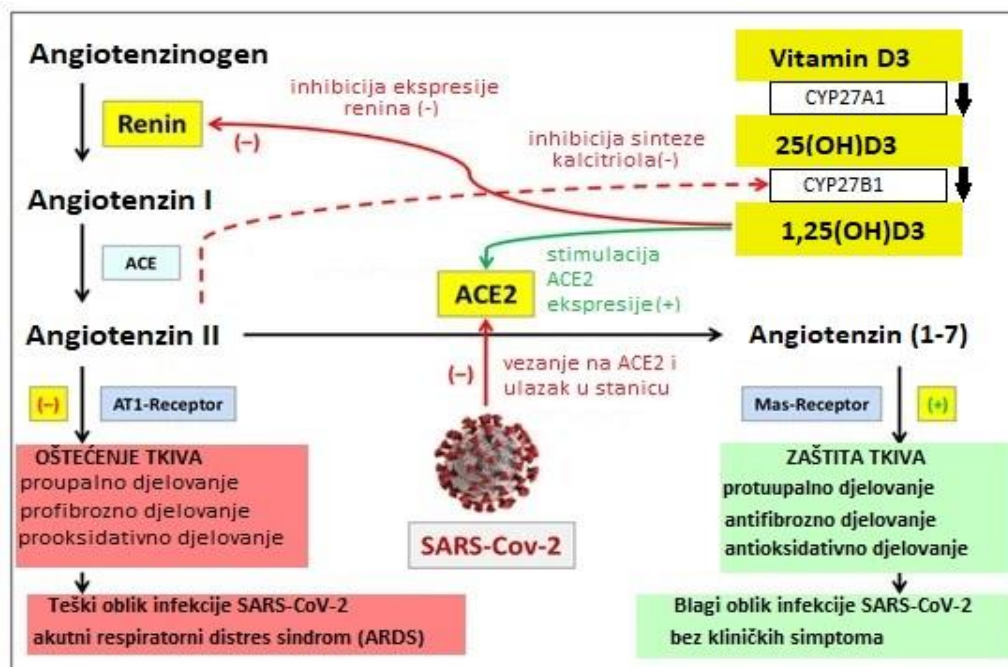
Nadalje, primijećena je atrofija slezene i nekroza limfnih čvorova u preminulih pacijenata što upućuje na štetu posredovanu imunskim sustavom. Citokinska oluja uzrokuje tešku pulmonarnu patologiju s masovnim infiltracijama neutrofila i makrofaga, rezultirajući masovnim oštećenjima alveola uključujući formiranje hijalinske membrane i difuznim zadebljanjem alveolarne stijenke (Xu i sur., 2020). Citokinska oluja uzrokuje još veću proizvodnju proupalnih medijatora od strane stanica imunskog sustava, što dovodi do aktivacije komponenata komplementa, povećava oksidacijski stres i smanjuje ekspresiju endotelne NO sintaze, generira sistemsku upalu i endotelopatiju, rezultirajući tako šokom i ozljedom tkiva srca, jetre, bubrega i višestrukim zatajenjem organa (Malaguarnera, 2020).

#### **4.4.1. ACE2 receptori**

Angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. *angiotensin converting enzyme 2*, ACE2) je membranska proteaza koja se većinski sastoji od NH<sub>2</sub>-terminalne peptidne domene koja uključuje i katalitičko mjesto orijentirano prema izvanstaničnom prostoru. ACE2 je eksprimiran u gotovo svim tkivima, s najvećom aktivnošću u ileumu i bubrezima, a potom u masnom tkivu, srcu, moždanom deblu, plućima, krvožilnom sustavu, želucu, jetri te nosnoj i oralnoj sluznici. ACE2 ima pristup peptidima u cirkulaciji, u tekućini bubrežnih tubula, u cerebrospinalnoj, intersticijskoj

i bronhijalnoj tekućini, a njegova primarna uloga je prevođenje angiotenzina II, efektorskog peptida renin-angiotenzin-aldosteron sustava (RAAS), u angiotenzin (1-7) (South i sur., 2020).

Renin-angiotenzin-aldosteron sustav (RAAS) je endokrini sustav koji ima važnu ulogu u održavanju homeostaze elektrolita, volumena tjelesne tekućine i kardiovaskularnoj regulaciji u perifernoj cirkulaciji. Renin je enzim koji se proizvodi u bubrezima i djeluje na angiotenzinogen, prekursor koji nastaje u jetri, kako bi nastao inaktivni dekaeptid angiotenzin (engl. *angiotensin*, Ang) I koji se kasnije prevodi u angiotenzin II, uz pomoć angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *angiotensin converting enzyme*, ACE) prisutnog u plućnim kapilarama (**Slika 4**). Vezanjem Ang II na receptor angiotenzina II tip 1 (engl. *angiotensin II receptor type 1*, AT1) dolazi do vazokonstrikcije, upale, proliferacije stanica, fibroze, povećane bubrežne apsorpcije natrija, oslobađanja aldosterona i arginin vazopresina. Također, Ang I i II mogu se vezati i na receptor angiotenzina II tip 2 (engl. *angiotensin II receptor type 2*, AT2) čime se sprječava pretjerana stimulacija i poništavaju učinci AT1, a inducira se protuupalni odgovor, vazodilatacija, apoptoza stanica i natriureza. Također, Ang I i Ang II konvertiraju se u Ang (1-7) uz katalitičko djelovanje neutralnih endopeptidaza (engl. *neutral endopeptidase*, NEP) i ACE2, te se potom Ang (1-7) veže na Mas receptor (engl. *Mas receptor*, Mas-R) ostvarujući tako protuupalni, antifibrozni te antihipertenzivni učinak (Borsche i sur., 2021).



**Slika 4.** Uloga renin-angiotenzin-aldosteron sustava (RAAS) te utjecaj vitamina D3 na RAAS (preuzeto i prilagođeno prema Borsche i sur. (2021) uz dopuštenje izdavača).

ACE2 predstavlja ključnu molekulu za ulazak SARS-CoV-2 u stanicu domaćina. SARS-CoV-2 u svom omotaču eksprimira protein šiljak (engl. *spike protein*, S protein) koji u sebi sadrži receptor-vezujuću domenu (engl. *receptor-binding domain*, RBD) koja se veže na ekstracelularnu domenu ACE2 (**Slika 5**). Cijepanjem S proteina od strane transmembranske serinske proteaze 2 (engl. *transmembrane serine protease 2*, TMPRSS2) domaćina, nastaju dvije podjedinice, S1 i S2, što predstavlja kritični korak za fuziju membrana i internalizaciju virusa endocitozom uz pomoć ACE2 u plućnom epitelu (South i sur., 2020). Također, pojačana virulencija SARS-CoV-2 u odnosu na SARS-CoV upućuje na jači afinitet vezanja ektodome S proteina SARS-CoV-2 na ACE2 (Malaguarnera, 2020).

Internalizacija ACE2 zbog interakcije sa SARS-CoV-2 potencijalno rezultira gubitkom ACE2 na površini stanica i tako poništava ključni put kojim stanica razgrađuje Ang II, a stvara kardioprotektivni Ang (1-7). Povećanje ukupnog omjera Ang II i Ang (1-7) može pogoršati oštećenje plućnog tkiva inicijalno izazvano SARS-CoV-2 (South i sur., 2020).

Zbog široke rasprostranjenosti ACE2 u plućima, srcu, na luminalnoj površini epitelnih stanica crijeva, u bubrezima i endotelu, smatra se da su klinički simptomi respiratornog oštećenja, zatajenja jetre, akutnog oštećenja bubrega i dijareje barem djelomično povezani s ekspresijom ACE2 u tim tkivima (Malaguarnera, 2020).

#### **4.5.Potencijalni učinci vitamina D u respiratornim virusnim infekcijama uključujući i COVID-19**

U posljednjih nekoliko desetljeća, mnogi eksperimentalni dokazi upućivali su na to da vitamin D ima značajnu ulogu u regulaciji odgovora urođene i stečene imunosti preko VDR-a koji je eksprimiran u imunskim stanicama. Primijećeno je da su pacijenti koji imaju deficijenciju vitamina D izloženi visokim razinama IL-6, TNF- $\alpha$  te aktiviranim fenotipovima monocita. Stoga se uspješan imunski odgovor može prikladno regulirati endokrinim sustavom vitamina D koji uravnotežuje upalu i protuupalno djelovanje (Malaguarnera, 2020).

Borsche i sur. (2021) istraživali su korelaciju između razine vitamina D kao biljega imunodne obrane i otpornosti pacijenta na COVID-19 i, po njihovom mišljenju, vjerojatno ostale respiratorne infekcije. Uključene studije bile su opservacijske kohortne studije koje su grupirale dvije ili više kohorti prema njihovim vrijednostima vitamina D i popisale stopu smrtnosti za navedene kohorte. Prikupljene studije zatim su podijeljene u populacijsku studiju i sedam bolničkih studija. Značajno je da su ovi izvori podataka bitno različiti, budući da jedan procjenjuje vrijednost vitamina D dugoročno, dok drugi mjeri vrijednosti vitamina D nakon infekcije, prikrivajući tako mogući uzročni odnos između razine vitamina D prije infekcije i smrtnosti. Rezultati studije ojačali su hipotezu u kojoj fatalni ishod infekcije COVID-19, osim o drugim faktorima rizika, snažno ovisi o pacijentovom statusu vitamina D. Regresijske analize sugeriraju da bi donji prag za zdravu razinu vitamina D trebao biti približno 125 nmol/L ili 50 ng/mL 25(OH)D, što bi potencijalno spasilo većinu života, smanjujući utjecaj čak i na pacijente koji imaju niz komorbiditeta.

Borsche i sur. (2021) navode još nekoliko primjera studija koje potkrepljuju njihove rezultate. Jedna od njih je studija koju su proveli Kaufman i suradnici 2020. godine s brojem ispitanika od približno 200 000 koja je potvrdila da broj infekcija jasno korelira s razinom vitamina

D. Iako vitamin D ne štiti fizički od infekcije patogenom u smislu ulaska patogena u stanice, pokazalo se da utječe na trajanje same infekcije jer je broj pozitivnih PCR testova u grupi ispitanika s razinom vitamina D >30 ng/mL upola manji u odnosu na grupu ispitanika s razinom vitamina D <30 ng/mL. Najmanji broj infekcija primijećen je kod koncentracije 25(OH)D u serumu u iznosu od 55 ng/mL, što se dobro slaže s rezultatima prethodne studije. Drugi primjer studije je ona provedena od strane Zhanga i suradnika 2012. godine, koja je pokazala kako jedan od najfatalnijih i najzastrašujućih simptoma, a to je pretjerana upala koja vodi do respiratornog zatajenja, direktno korelira s razinom vitamina D. To su dokazali inkubacijom stanica u 30 ng/mL vitamina D ili više, pri čemu su stanice pokazale značajno manji odgovor na lipopolisaharide, a najjača inhibicija upale pokazana je kod koncentracije vitamina D u iznosu od 50 ng/ml. Također navode postojanje izvještaja trojice ravnatelja iranske bolnice Dubai koji navode svoje iskustvo s 21 pacijentom s razinama vitamina D iznad 40 ng/mL jer su suplementirani vitaminom D kroz proteklih 9 godina iz oftalmoloških razloga, od kojih niti jedan nije hospitaliziran dulje od 4 dana, u nijednog nije došlo do razvoja citokinske oluje, hiperkoagulacije niti disregulacije sustava komplementa (Afshar i sur., 2020).

#### **4.5.1. Djelovanje vitamina D i uloga u organizmu**

Vitamin D ima razne uloge u organizmu, međutim, kako bi ostvario djelovanje mora prijeći u svoj aktivni oblik, kalcitriol, koji ispoljava biološku aktivnost nakon vezanja na VDR, čime inducira heterodimerizaciju VDR-a i retinoidnog X receptora (engl. *retinoid X receptor*, RXR) nakon čega dolazi do vezanja različitih koregulatora te vezanja cijelog kompleksa na specifične regije DNA što rezultira moduliranjem transkripcije gena (Malaguarnera, 2020).

Dobro je poznato da vitamin D ima značajnu ulogu u održavanju koštano-mineralnog metabolizma. Održavanje adekvatne fiziološke razine 25(OH)D ključno je za postizanje homeostaze kalcija i fosfata uz istovremeno održavanje fiziološke razine PTH. Posljedica nedostatka kalcija u tijelu je povišena razina PTH, koja je ujedno i pokazatelj niske koncentracije vitamina D. PTH povećava proizvodnju kalcitriola u crijevima i bubrežima te povećava resorpciju kalcija u bubrežima uz istovremeno smanjenje resorpcije fosfata, što ima negativan utjecaj na

kardiovaskularni sustav i uzrokuje disfunkciju endotela, povećanu krutost aorte, kalcifikaciju aortnih valvula, razvoj hipertenzije i dislipidemije, a pokazalo se i da više razine PTH povećavaju rizik smrti od kardiovaskularnih bolesti (Decyk i sur., 2022).

Vitamin D sprječava eventualni višak aktivnosti PTH, koji je primarno povezan s povećanom resorpcijom kostiju, a također ima ključnu ulogu u osteoblastogenezi te sazrijevanju osteoblasta, kao i posljedičnoj mineralizaciji kostiju. Zbog ovih učinaka vitamin D ima ključnu ulogu u održavanju gustoće kostiju na kralježničnoj i ne-kralježničnoj razini, pogotovo u kukovima, te stoga ima ključnu ulogu u prevenciji i liječenju osteoporoze (Sosa Henríquez i Gómez de Tejada Romero, 2020).

Međutim, kao što je gore navedeno, u zadnjih nekoliko desetljeća, saznanja o mehanizmima putem kojih vitamin D utječe na ljudsko zdravlje dramatično su se povećala. Otkriće prisutnosti VDR-a i CYP27B1 u mnogim stanicama izvan koštano-mišićnog sustava i to u stanicama imunskog sustava, crijevnim, pankreasnim te gonadnim stanicama, indiciralo je puno širi utjecaj vitamina D na zdravlje čovjeka nego što je dotad bilo poznato (Prietl i sur., 2013).

Pokazalo se da je vitamin D snažan epigenetski regulator, koji utječe na više od 2500 gena te na desetine naših najizazovnijih zdravstvenih izazova, uključujući rak, dijabetes melitus, akutne infekcije dišnog sustava, kronične upalne bolesti i autoimunosne bolesti kao što je multipla skleroza (Borsche i sur., 2021).

Vitamin D ima važnu ulogu u lučenju inzulina kada su u tijelu prisutni uvjeti povećane potražnje, što je povezano s prisutnošću VDR-a u beta stanicama gušterače. Nedostatak vitamina D može negativno utjecati na izlučivanje inzulina i toleranciju glukoze u ljudi s dijabetesom tipa II. Vitamin D također pokazuje antikancerogeno djelovanje inhibiranjem prekomjerne proliferacije stanica, stimulirajući apoptozu i diferencijaciju stanica, kao i regulaciju ekspresije mRNA te modeliranje signalnih putova za inhibiciju upalnih procesa. Antikancerogeno djelovanje vitamina D podupire i ekspresija  $1\alpha$ -hidroksilaze u mnogim ekstracelularnim tkivima, kao i činjenica da je sinteza ovog enzima smanjena u tijeku raznih vrsta tumora, što rezultira smanjenim koncentracijama kalcitriola (Decyk i sur., 2022).



#### 4.5.1.1. Uloga vitamina D u urođenoj imunosti

Urođena imunost predstavlja prvu liniju obrane organizma na patogen te je kao takva zadužena za brzi odgovor, što uključuje prepoznavanje i eliminaciju patogena, a za razliku od stečene imunosti, odgovor urođene imunosti isti je pri svakom susretu s antigenom. Urođena imunost između ostalog podrazumijeva aktivaciju Toll-like receptora (engl. *Toll-like receptor*, TLR) na monocitima koja dovodi do indukcije antimikrobnih peptida poput defenzina  $\beta 2$  (engl. *beta-defensin 2*, DEFB-2) i katelicidina (engl. *cathelicidin antimicrobial peptide*, CAMP) te posljedično do smrti patogena (Wei i Christakos, 2015).

Vitamin D, osim što pojačava kemotaksiju i sposobnost fagocitoze stanica imunskog sustava, jedan je od glavnih regulatora CAMP-a (Wang i sur., 2004). Aktivacija signalnih puteva Toll-like receptora (engl. *Toll-like receptor*, TLR) koji se nalaze na makrofagima od strane patogena kao što je *Mycobacterium tuberculosis* rezultira indukcijom transkripcije gena za VDR i CYP27B1 (Liu i sur., 2006). Cirkulirajući 25(OH)D vezan na plazmatski DBP ulazi u makrofage i tamo se prevodi u 1,25(OH)<sub>2</sub>D pomoću mitohondrijskog CYP27B1 te se kao takav veže za VDR unutar stanice. Nakon vezanja na VDR, 1,25(OH)<sub>2</sub>D djeluje kao transkripcijski faktor koji dovodi do povećane ekspresije katelicidina. Uz autokrini učinak na unutarnju antimikrobnu funkciju, CYP27B1 na makrofagima također može inducirati parakrini odgovor u monocitima, kao i u T i B limfocitima putem izlučenog kalcitriola (Prietl i sur., 2013).

Jedini poznati ljudski katelicidin (engl. *the human cationic antimicrobial protein*, hCAP18) kodiran je genom za katelicidin antimikrobni peptid. Iako je primarno nađen u neutrofilima, CAMP je eksprimiran i u monocitima, dendritičkim stanicama, limfocitima, NK stanicama te u epitelnim stanicama kože, respiratornog te gastrointestinalnog trakta. CAMP posjeduje široku antimikrobnu aktivnost naspram Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Način na koji CAMP ispoljava svoje antimikrobno djelovanje je putem interakcije kationskog dijela molekule s anionskim komponentama na površini stanične membrane bakterije. Nakupljanje CAMP-a dovodi do izvijanja lanaca lipidnog dvosloja i translokacije CAMP-a s vanjske na površinu unutarnje strane membrane te dovodi do narušavanja homeostaze bakterijske membrane (Wei i Christakos, 2015).

U teškim infekcijama, postotak granulocita poput neutrofila je jako povišen. Ranija istraživanja su istaknula neutrofile kao glavni izvor katelicidina (Sørensen i sur., 1997), međutim, to se ne slaže sa činjenicom da neutrofil, usprkos eksprimiranom VDR-u, ne pokazuje aktivnost CYP27B1 koji bi preveo 25(OH)D u biološki aktivni oblik koji bi potom inicirao ekspresiju CAMP gena (Hewison, 2012). Međutim, transverzalna istraživanja su pokazala značajno niže razine 25(OH)D u serumu kod septičnih pacijenata u kritičnom stanju, što je povezano sa smanjenim koncentracijama CAMP-a (Jeng i sur., 2009). Ova činjenica podupire teoriju u kojoj vitamin D regulira razinu CAMP-a i eventualno ima ključnu ulogu u kontroli infekcije (Prietl i sur., 2013).

Prietl i sur. (2013) dalje navode kako je niska razina 25(OH)D u serumu također povezana s povećanom stopom smrtnosti uzrokovanom infekcijama u pacijenata u završnoj fazi bubrežnih bolesti, kao što je povezana i s infekcijama gornjeg respiratornog trakta (engl. *upper respiratory tract infections*, URTI), uključujući influencu, KOPB-om i alergijskom astmom. Provedeno nasumično kontrolirano istraživanje (engl. *randomized controlled trial*, RCT) nije uspjelo dokazati redukciju URTI-ja koristeći mjesečne doze vitamina D3 u iznosu od 100000 IU u 322 zdrave odrasle osobe (Murdoch i sur., 2012). Glavno ograničenje istraživanja bili su ispitanici koji su već na početku istraživanja bili popunjeni vitaminom D (prosječna koncentracija 25(OH)D bila je 29 ng/mL). S druge strane, RCT u kojem je korišteno mlijeko obogaćeno vitaminom D u 247 teško deficijentne mongolijske djece (s prosječnom početnom koncentracijom 25(OH)D u serumu od 7 ng/mL) dovelo je do značajnog smanjenja URTI-ja tijekom tromjesečnog istraživanja (Camargo Jr i sur., 2012). Još jedno RCT provedeno u Švedskoj na 140 imunodeficientnih pacijenata, pokazalo je redukciju simptoma infekcije, redukciju ukupnog broja specifičnih patogena u nazalnoj tekućini te smanjenu upotrebu antibiotika u grupi ispitanika koja je primala dnevnu dozu kolekalciferola od 4000 IU, u odnosu na grupu ispitanika koja je primala placebo (Bergman i sur., 2012).

#### 4.5.1.2. Uloga vitamina D u stečenoj imunosti

Prisutnost VDR-a u ljudskim limfocitima bila je jedan od inicijalnih pokazatelja važnosti vitamina D izvan okvira mineralno-koštanog sustava. Istraživanja su dokazala prisutnost nuklearnog VDR-a te enzima koji aktiviraju vitamin D u njegove biološki aktivne oblike i u T-

limfocitima i u B-limfocitima. U uvjetima mirovanja ove stanice pokazuju jako malu ekspresiju VDR-a, međutim, nakon aktivacije i proliferacije, T- i B-limfociti značajno pojačavaju ekspresiju VDR-a, omogućujući tako regulaciju do 500 gena koji reagiraju na vitamin D, a koji utječu na diferencijaciju i proliferaciju tih stanica (Prietl i sur., 2013).

Prietl i sur. (2013) dalje navode kako su antiproliferativni učinci kalcitriola, poput inhibicije diferencijacije, proliferacije, inicijacije apoptoze te smanjene produkcije imunoglobulina, prvotno bili smatrani posljedicama isključivo posredovanog djelovanja T pomoćnih stanica (engl. *T helper cell*, Th stanica). Međutim, kasnija istraživanja pokazala su i direktan učinak kalcitriola na homeostazu B-limfocita, uključujući inhibiciju proizvodnje memorijskih i plazma stanica, kao i samu apoptozu plazma stanica. Takva kontrola aktivacije i proliferacije B-limfocita može imati značajnu kliničku važnost u kontroli i liječenju autoimunskih bolesti u čijoj patofiziologiji pretjerana proizvodnja autoreaktivnih protutijela igra glavnu ulogu.

Predložena su četiri glavna mehanizma putem kojih različiti oblici vitamina D imaju imunomodulatornu ulogu djelujući na T-limfocite. Tri od četiri mehanizma podrazumijevaju direktan učinak na T-limfocite: endokrino putem sistemskog kalcitriola, intrakrino putem konverzije 25(OH)D u kalcitriol u samim T-limfocitima te parakrino pomoću kalcitriola nastalog konverzijom iz 25(OH)D u monocitima ili dendritičkim stanicama. Četvrti predloženi mehanizam predstavlja indirektan učinak na prezentaciju antigena T-limfocitima od strane APC na koje je prethodno djelovao kalcitriol (Prietl i sur., 2013).

Nakon što su T-limfociti izloženi kalcitriolu dolazi do pomaka imunskog statusa s proupalnog na tolerogeniji na način da kalcitriol modulira proizvodnju njihovih citokina te suzbija proliferaciju i diferencijaciju T pomoćnih stanica. Kalcitriol i analozi inhibiraju sekreciju proupalnih citokina koje luče Th1 (IL-2, interferon  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Th9 (IL-9) i Th22 (IL-22), a s druge strane promoviraju produkciju citokina koji djeluju više protuupalno, a koje luče Th2 stanice (IL-3, IL-4, IL-5, IL10). Također, vitamin D utječe i na produkciju IL-17 od strane Th17 stanica. Pokazalo se da inhibicija aktivnosti Th17 stanica ima glavnu ulogu u liječenju autoimunskih bolesti u nepretilih dijabetičkih (engl. *non-obese diabetic*, NOD) miševa (Penna i sur., 2006). Istraživanja su pokazala da kalcitriol direktno suprimira proizvodnju IL-17 na transkripcijskoj razini, a aktivirani ljudski T-limfociti izloženi kalcitriolu proizvode i luče značajno manje razine

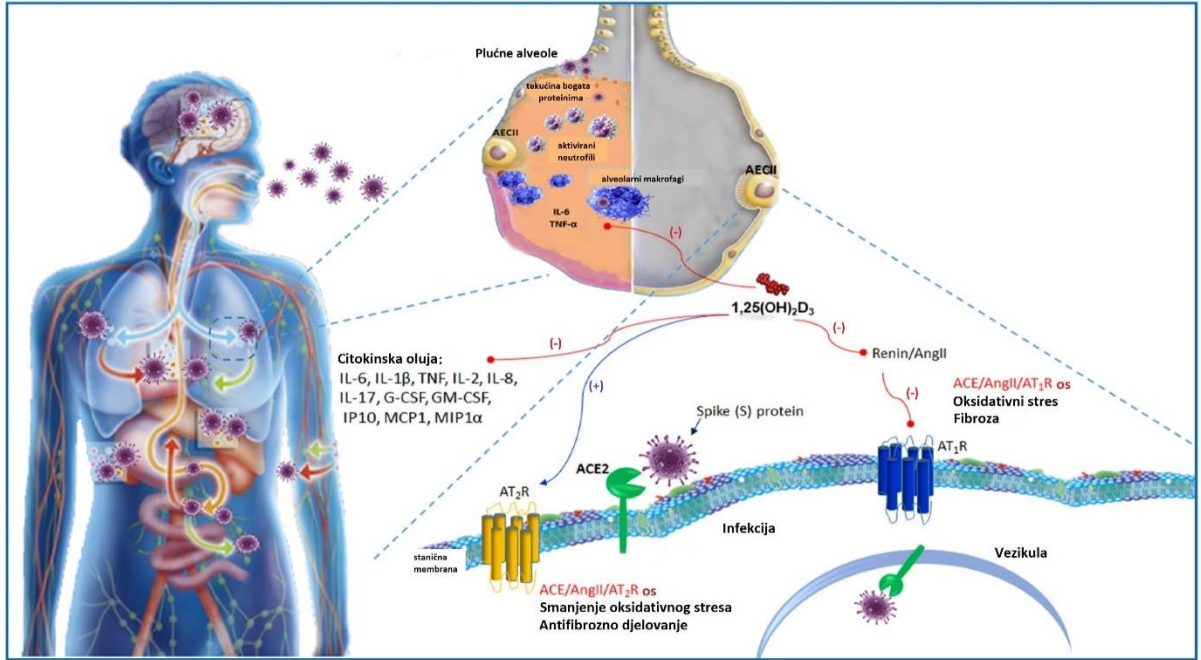
IL-17, IFN- $\gamma$  te IL-21 (Jeffery i sur., 2009). Također, dodavanjem kombinacije kalcitriola i IL-2 ljudskim primarnim kulturama T-limfocita primijećen je pomak prema tolerogenom fenotipu, uključujući ekspresiju gena tipičnih za regulatorne T-limfocite (Adams i Hewison, 2008).

Regulatorni T-limfociti suprimiraju proupalni odgovor drugih stanica imunskog sustava i kao takve sprječavaju pretjerani imunski odgovor ili čak autoimunski odgovor. Regulatorni T-limfociti su indirektno inducirani vitaminom D, preko antigen prezentirajućih stanica, prvenstveno uključujući dendritičke stanice (engl. *dendritic cell*, DC) koje ostaju u nezrelom stanju prilikom izlaganja kalcitriolu zbog čega prezentiraju manje antigena. Dendritičke stanice također ekspimiraju VDR, CYP27A1 i CYP27B1 zbog čega su sposobne proizvesti 1,25(OH) $_2$ D (Hata i sur., 2009). Međutim, to se događa u manjoj količini nego u makrofagima, vjerojatno zato što DC ekspimiraju skraćeni transkript CYP27B1 koji može uzrokovati nedovoljnu aktivaciju vitamina D (Kundu i sur., 2014). Izlaganje kalcitriolu prevenira diferencijaciju i sazrijevanje dendritičkih stanica i posljedično smanjuje efikasnost prezentacije antigena na način da smanji, osim kemotaksije, ekspresiju kostimulatornih molekula te MHC molekula. Primarna funkcija dendritičkih stanica je da pokrene odgovor T-limfocita i kao posljedica, učinak kalcitriola na DC ima snažan utjecaj na T-limfocite. In vitro, kalcitriol inducira stabilne, na sazrijevanje otporne, tolerogene fenotipove DC te povećavaju omjer protuupalnog IL-10 i proupalnog IL-12. Istraživanja su također pokazala da aplikacija antigena zajedno s kalcitriolom može inducirati antigen-specifične tolerogene dendritičke stanice (Unger i sur., 2009). Zbog toga što postaju sposobne izazvati toleranciju na infekciju, mijenjaju aktivnost drugih proupalnih zrelih DC, inducirajući tako antigen-specifične regulatorne T-limfocite i održavajući tolerogeni odgovor (Malaguarnera, 2020).

#### **4.5.2. ACE2 receptori i vitamin D**

ARDS, u kojeg je karakteristično oštećenje endotela i povećana propusnost barijera, vodeći je uzrok morbiditeta i mortaliteta u bolesnika s teškim oblikom infekcije SARS-CoV-2. U mišjem modelu ARDS-a, miševi u kojih je deletiran gen koji kodira za ACE2 razvili su tešku bolest pluća uzrokovanu povećanom vaskularnom permeabilnošću i plućnim edemom (Imai i sur., 2005). Inhibicija receptora za prorenin smanjila je intersticijski edem, krvarenje, broj neutrofila i razinu ne-proteolitički aktiviranog prorenina u plućnom tkivu štakora (Xu i sur., 2017). Budući da

ACE2 može zaštititi od akutnih ozljeda pluća (engl. *acute lung injury*, ALI), njegova inhibicija putem SARS-CoV-2 mogla bi biti usko povezana s ARDS-om. Također, disregulacija lokalnog i cirkulirajućeg RAAS-a, zajedno s povećanom ekspresijom ACE i Ang II te smanjenim razinama ACE2 i Ang (1-7) uzrokovala je ishemijsko-reperfuzijski induciran ALI u miša (Chen i sur., 2013). S druge strane, prekomjerna ekspresija ACE2 smanjila je ARDS izazvan LPS-om putem Ang (1-7) – MasR puta, sprječavajući tako aktivaciju NF- $\kappa$ B i posljedičnu signalizaciju (Li i sur., 2016). Više istraživanja pokazalo je da kalcitriol regulira RAAS, između ostalog, na način da inhibira biosintezu renina. Vitaminom D posredovan signalni put može spriječiti nastanak akutne ozljede pluća. Uočeno je da kalcitriol inhibira ekspresiju renina, ACE i Ang II, a povećava razinu ACE2 u akutnih ozljeda pluća uzrokovanih LPS-om. Stoga vitamin D smanjuje pojavu i jakost akutnih ozljeda pluća uzrokovanih LPS-om, barem parcijalno, pojačavajući aktivnost ACE2-Ang (1-7) osi te istovremeno inhibirajući renin i ACE-Ang II-AT1 os (Li i sur., 2016). VDR je izrazito eksprimiran u plućima, a pokazano je da inaktivacija VDR-a dovodi do deregulirane stimulacije RAAS-a. Kalcitriol i VDR sprječavaju fibrozu u plućima, jetri i bubrezima putem negativne regulacije RAAS-a te inhibiranjem aktivacije NF- $\kappa$ B (**Slika 5**). Upala može oslabiti aktivnost 1 $\alpha$ -hidroksilaze u bubregu, što rezultira smanjenom proizvodnjom kalcitriola (Malaguarnera, 2020). Zanimljivo je da su miševi s nedostatkom 1 $\alpha$ -hidroksilaze pokazali pojačanu aktivnost intrarenalnog RAAS-a koja se smanjila nakon primjene kalcitriola (Vaidya i Williams, 2012). Deficijencija vitamina D često je uočena u pacijenata koji razvijaju ARDS, a smatra se izglednim da ona također promovira plućnu fibrozu aktivacijom RAAS-a. U mnogim poremećajima, kompleks VDR-a i aktivatora VDR-a mogao bi ublažiti aktivnost RAAS-a, smanjiti upalu, pokrenuti autofagiju, kontrolirati funkciju mitohondrija te potaknuti imunosnu toleranciju kroz različite signalne putove, a mnoga eksperimentalna i klinička istraživanja ukazuju na farmakološku aktivaciju VDR-a kao potencijalno značajnu metu u mnogih upalnih bolesti (Malaguarnera, 2020).



**Slika 5.** Interakcija domaćina i SARS-CoV-2 te djelovanje vitamina D (preuzeto i prilagođeno prema Malaguarnera, (2020) uz dopuštenje izdavača).

### 4.5.3. Toll-like receptori i vitamin D

Toll-like receptori su podvrsta PRR-ova i imaju važnu ulogu u prepoznavanju mikrobnih patogena i aktivaciji odgovora urođene imunosti, uključujući i poticanje autofagije. Provedena su brojna istraživanja koja su proučavala ulogu autofagije u odgovoru urođene i stečene imunosti. Stanice imunskog sustava koriste autofagiju kao mehanizam kojim prepoznaju intracelularne patogene putem PRR-a koji prepoznaju specifične molekule patogena, PAMP molekule, koje su zapravo potrebne za njihovo preživljavanje (Campbell i Spector, 2012).

Epitelne stanice dišnih puteva izražavaju TLR koji percipiraju viruse i čiji ligandi aktiviraju epitelne stanice pokrećući brzi imunski odgovor protiv napada virusa. Uz ranu infekciju epitelnih stanica, rezidualni makrofagi te intraepitelne dendritičke stanice koje se nalaze ispod respiratornog epitela, internaliziraju čestice u lumenu dišnih puteva fagocitozom i makropinocitozom, stimulirajući tako PRR što dovodi do aktivacije imunskog odgovora.

Prepoznavanje PAMP molekula od strane receptora TLR odvija se na staničnoj membrani, u endosomima, lizosomima, endocitolizosomima i drugim dijelovima stanice. Receptori TLR prepoznaju proteine, lipoproteine, lipide i nukleinske kiseline virusnog, bakterijskog, parazitskog i gljivičnog porijekla. Mogu biti eksprimirani na površini stanice (npr. TLR2 i TLR4) ili intracelularno (npr. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) najčešće na membrani endoplazmatskog retikuluma. Ono što receptori TLR prepoznaju su zapravo jednolančane RNA (engl. *single-stranded RNA*, ssRNA) koje prepoznaju TLR7 i TLR8, nemetilirane citozin-gvanin dinukleotidne (engl. *cytosine-guanine dinucleotide*, CpG) motive dvolančane DNA viralnog genoma koje prepoznaje TLR9 ili intermedijarnu dvolančanu RNA koja se formira u tijeku viralne replikacije, a koju prepoznaje TLR3. TLR7 koji prepoznaje ssRNA viruse zapravo prepoznaje i SARS-CoV putem identifikacije virusnog genoma, a zatim inducira proupalne citokine poput TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12, privlači stanice imunskog sustava u pluća i promovira nastanak ARDS-a i plućne fibroze u kasnijem stadiju (Malaguarnera, 2020).

Campell i Spector (2012) uočili su da aktivacija TLR8 u ljudskim makrofagima, kao i aktivacija TLR1 i TLR2, inducira ekspresiju VDR-a i CYP27B1, što povećava konverziju 25(OH)D u 1,25(OH) $_2$ D i njegovo vezanje na VDR. To posljedično dovodi do indukcije katelicidina, autofagije i ubijanja intracelularnih patogena poput *M. tuberculosis*. Također su dokazali da kalcitriol inhibira rast mikobakterija i replikaciju HIV-a kroz CAMP-ovisnu indukciju autofagije. To su potvrdili utišavanjem gena koji kodira za CYP27B1 koje je rezultiralo izrazito smanjenom inhibicijom HIV-a, kao i utišavanje gena koji kodira za VDR. Naposljetku su određivali utječe li razlika u dostupnosti vitamina D na sposobnost agonista TLR8 da inhibiraju replikaciju HIV-a na način da su smanjili koncentraciju 25(OH)D u mediju na 45 nmol/L, odražavajući niže razine uočene kod osoba s nedostatkom vitamina D. U ovim uvjetima inhibicija replikacije HIV-a također je bila značajno smanjena, što je pokazalo važnost prisutnosti 25(OH)D i njegovog signalnog puta za ostvarivanje autofagije izazvane TLR8.

Malaguarnera (2020) navodi kako je konverzija 25(OH)D u kalcitriol možda ključna faza za pokretanje TLR signalizacijskog puta jer je poznato da vezanje kalcitriola na VDR omogućava ekspresiju mnogo gena čiji produkti reguliraju funkciju monocita i makrofaga tijekom infekcije.

#### 4.5.4. Neutrofili i vitamin D

Pacijenti zaraženi virusom SARS-CoV-2 često pokazuju izmijenjeni postotak neutrofila u serumu u odnosu na zdrave pojedince. Neutrofili su fagociti specijalizirani za ranu obranu od invazivnih patogena. Oni sudjeluju u odgovoru urođene imunosti te obuzdavaju zarazne bolesti pomoću mikrobicidnih mehanizama kao što su fagocitoza, degranulacija i isporuka neutrofilnih izvanstaničnih zamki (engl. neutrophil extracellular traps, NETs) (Malaguarnera, 2020).

Neutrofilne izvanstanične zamke su izvanstanične strukture nalik mreži koje se sastoje od mitohondrijskih i jezgrinih DNA vlakana u kompleksu s histonima i granuliranim antimikrobnim enzimima. Proces stvaranja klasičnih NETs-a definiran je kao jedinstveni oblik regulirane stanične smrti koji se razlikuje od drugih programiranih staničnih smrti, kao što su nekroptoza, autofagija i apoptoza. NETs igraju ključnu ulogu u patogenezi različitih bolesti kao što su COVID-19, cistična fibroza, vaskulitis malih krvnih žila i karcinomi (Chen i sur., 2022).

Iako stvaranje NETs-a ima značajnu ulogu u odgovoru urođene imunosti, njegova pretjerana produkcija može imati loš utjecaj na tijek same upale. Pošto NETs sadrži i može otpustiti neutrofilnu elastazu (engl. *neutrophil elastase*, NE), mijeloperoksidazu (engl. *myeloperoxidase*, MPO), DNA i histone, također može potencirati oštećenje tkiva koje je uočeno u ARDS-u, dijelom kroz citotoksične učinke na epitelne i endotelne stanice (Potey i sur., 2019).

Malaguarnera (2020) navodi kako kalcitriol ima važnu ulogu u moduliranju aktivnosti neutrofila te da je uočeno supresivno djelovanje kalcitriola na širenje patogena, kao što su virusi, putem indukcije stvaranja NETs-a te povećane ekspresije TLR7 i IFN- $\alpha$ . Međutim, prevelikom indukcijom stvaranja NETs-a doprinosi se otpuštanju proupalnih citokina te inicira kaskada upalnih procesa koji posreduju u nastanku mikrotromboze. Mikrotromboza generira dugotrajno oštećenje organa dišnog i kardiovaskularnog sustava te bubrega. Također je zanimljivo da su ti organi često zahvaćeni u teškom obliku infekcije SARS-CoV-2. Ova zapažanja sugeriraju da bi primjena vitamina D mogla biti neučinkovita ili čak štetna.



#### 4.5.5. Makrofagi i vitamin D

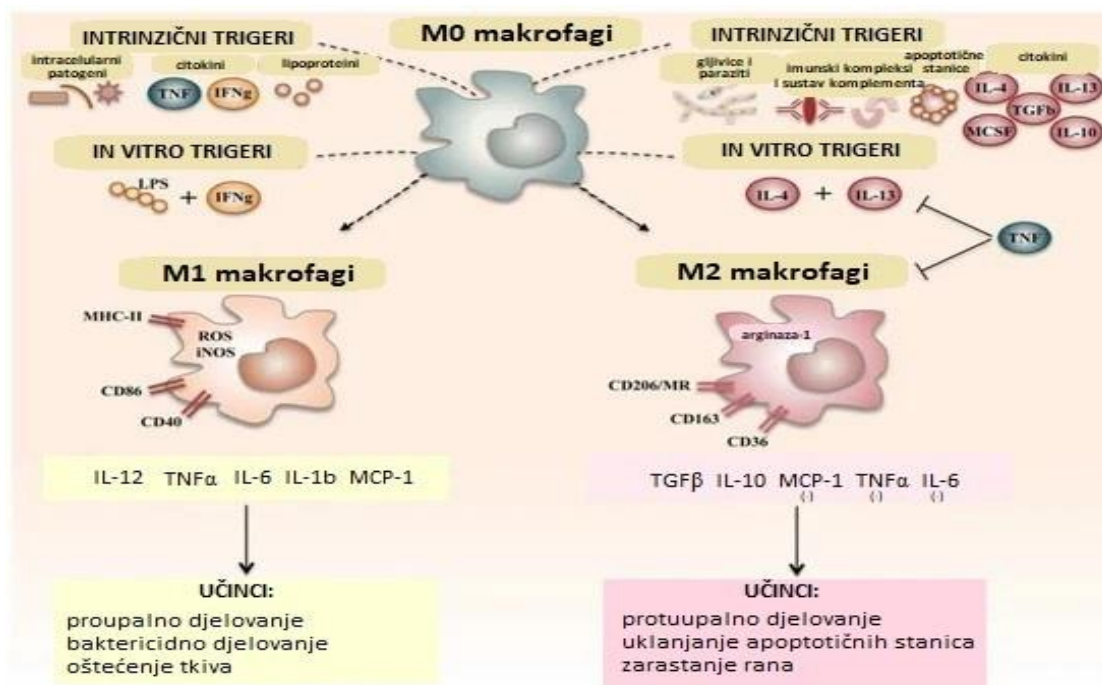
Makrofagi su fagocitne mononuklearne stanice koje imaju značajnu ulogu u imunosti. Otkad je otkiven učinak Th stanica koji omogućuje aktivaciju makrofaga i uloga koju IFN- $\gamma$  ima u toj aktivaciji, makrofagi su opisani u svim tjelesnim tkivima te je otkriveno da pokazuju iznimno svojstvo plastičnosti i da postoje u različitim fenotipovima koji se prilagođavaju okolnom tkivu i organu u kojem se nalaze. Upravo raznovrsna sudbina i potencijal ovih stanica je povezan sa sposobnošću domaćina da uspostavi učinkovit imunski odgovor te su stoga makrofagi meta mnogih upalnih procesa. Većina studija okarakterizirala je makrofage kao nezamjenjive komponente odgovora urođene i stečene imunosti te se općenito smatraju jednom od prvih linija obrane protiv patogena i kao takvi su uključeni u brojne imunski procese (Atri i sur., 2018). Uz njihovu anipatogenu ulogu, makrofagi su opisani kao glavni regulatori upalnih odgovora jer su uključeni i u rješavanje upale, zacjeljivanje rana i homeostazu tkiva nakon infekcije ili ozljede, kao i u prezentaciju antigena. Protiv signala opasnosti, urođeni imunski sustav pokreće zaštitni upalni odgovor koji se odvija u više faza, od uništavanja patogena i uklanjanja staničnih ostataka do popravljivanja tkiva i održavanja homeostaze (Duffield i sur., 2013).

Različite funkcije koje makrofagi ispoljavaju su posljedica njihove polarizacije do koje dolazi uslijed stimulacije LPS-om, IL-1 $\beta$  ili IFN- $\gamma$  koji generiraju klasično aktivirane makrofage (M1) ili generiraju alternativno aktivirane makrofage (M2) uslijed stimulacije od strane IL-4 i IL-13 (Boutillier i Elsawa, 2021). Klasično aktivirani makrofagi čine prvu liniju obrane protiv intracelularnih patogena i potiču Th1 polarizaciju CD4 stanica. M1 makrofagi se pojavljuju u upalnom okruženju u kojem dominira TLR i IFN signalizacija (**Slika 6**). Kako bi se inducirala polarizacija ljudskih makrofaga u M1 i reproducirali ti učinci in vitro, korišteni su faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (GM-CSF) ili IFN tip II i/ili TLR agonisti (Atri i sur., 2018).

M1 makrofagi stimulirani IFN- $\gamma$  nakon izloženosti LPS-u, fagocitiraju patogene i komponente patogena, nakon čega se određeni peptidi antigena procesiraju i vežu na MHC-II molekule kako bi se antigen predstavio T-stanicama. To je povezano s proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) putem aktivacije NADPH oksidaze (engl. *NADPH oxidase*) i povećane proizvodnje inducibilnih sintaza dušikovog oksida (engl. *inducible*

*nitric oxide synthase*, iNOS) te proizvodnjom citotoksičnih citokina uključujući IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , kao i oslobađanjem različitih matriksnih metaloproteinaza koje razgrađuju izvanstanični matriks. Kombinacija ovih učinaka čini ih moćnim oružjem protiv patogena, ali također mogu uzrokovati jaka oštećenja tkiva (Schraufstatter i sur., 2012).

Čimbenici koji utječu na polarizaciju makrofaga u M2 fenotip su M-CSF, IL-4, IL-10, IL-13 ili njihova kombinacija. Postoji više podskupina M2 makrofaga, M2a, M2b, M2c, a svima im je zajednička proizvodnja visokih razina IL-10 te niska ili nikakva proizvodnja proupalnih citokina kao što je IL-12. Za razliku od klasično aktiviranih M1 makrofaga, M2 makrofagi imaju modulatornu aktivnost, negativno reguliraju proupalne citokine te induciraju proizvodnju protuupalnih medijatora poput IL-10 i TGF- $\beta$ . Visoko su endocitne i djelomično fagocitne stanice uključene u razne funkcije uključujući mehanizme popravka, homeostaze, metaboličke procese i patogenezu (Atri i sur., 2018).



**Slika 6.** Glavni stadiji polarizacije makrofaga (preuzeto i prilagođeno prema Atri i sur., (2018) uz dopuštenje izdavača).

1,25(OH)<sub>2</sub>D utječe na polarizaciju makrofaga, pri čemu usmjerava proces u nastanak M2 fenotipa. M2 makrofagi lučenjem IL-10 i smanjenjem proizvodnje IFN- $\gamma$  dodatno inhibiraju diferencijaciju u M1 makrofage. Također je pokazano da kalcitriol smanjuje ekspresiju gena koji kodiraju TNF- $\alpha$  u TNF- $\alpha$  stimuliranim makrofagima. TNF- $\alpha$  je ključni medijator upale što je dokazano kliničkim učinkom bioloških lijekova koji su dizajnirani da ga blokiraju. Ova saznanja potkrijepljena su i rezultatima studije u kojoj su i 1,25(OH)<sub>2</sub>D i 25(OH)D uzrokovali smanjenu ekspresiju NF- $\kappa$ B i smanjenu proizvodnju MCP-1 i IL-6 (Rafique i sur., 2019).

Okluzija dišnih putova, koja se javlja tijekom infekcije SARS-CoV-2 zbog masovne pojave upalnih stanica, stanica zaraženih virusom, apoptotskih staničnih ostataka i serumskih proteina, uzrokuje teški i potencijalno smrtonosni ARDS. U tom kontekstu sposobnost M2 makrofaga da fagocitiraju zaražene stanice i apoptotske stanične ostatke, dodatno poboljšana djelovanjem 1,25(OH)<sub>2</sub>D, ima potencijal pomoći u postizanju uklanjanja infekcije i razrješenja upale (Malaguarnera, 2020).

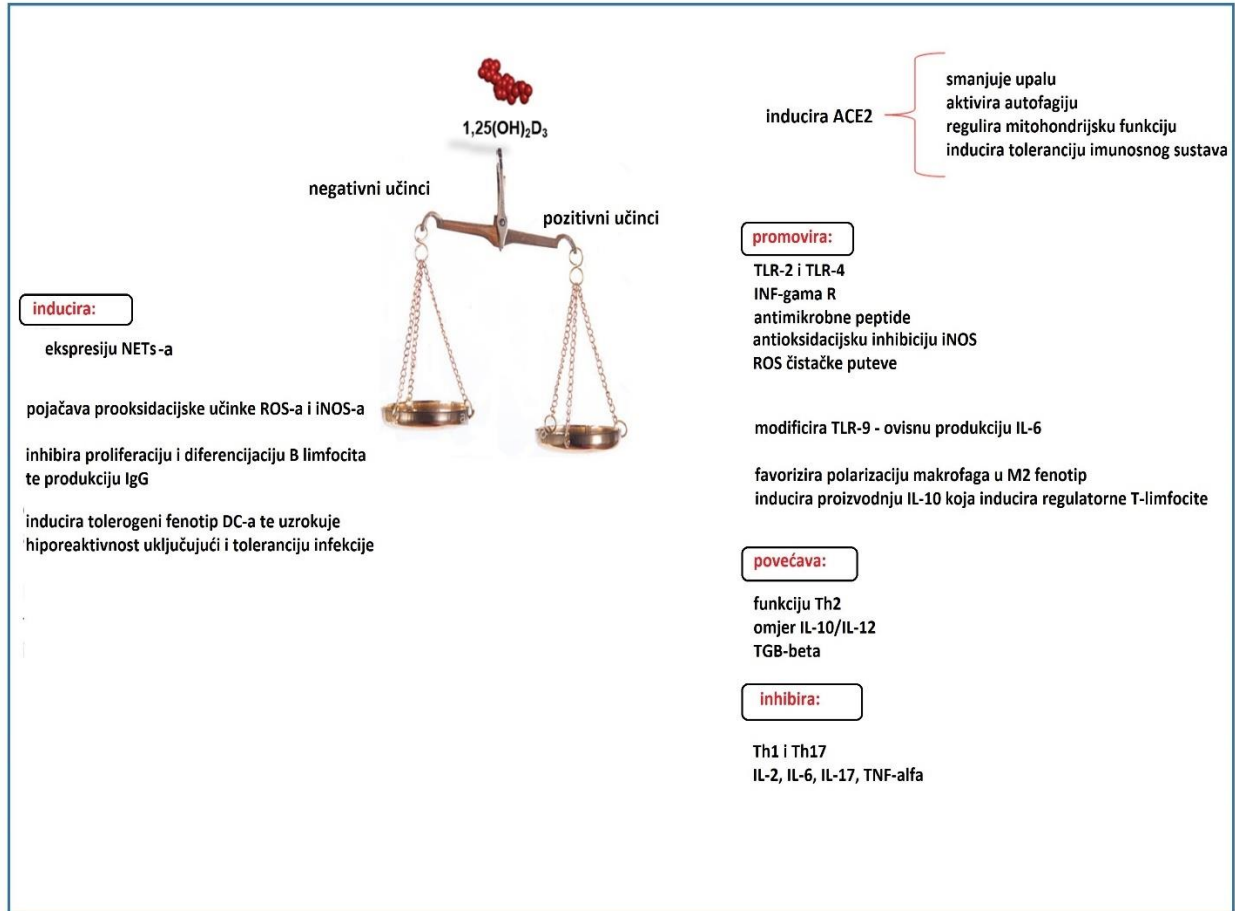
#### **4.5.6. Ostali učinci vitamina D**

Uz već spomenutu ulogu vitamina D na transkripciju antimikrobnih peptida, ponajviše u makrofagima, istražena je i njegova uloga u procesu autofagije. Tijekom autofagije, oštećeni stanični organeli i dijelovi citoplazme omataju se dvoslojnom membranom pri čemu se formira vezikula. Ove se vezikule nadalje stapaju s lizosomima te dolazi do formiranja autofagolizosoma u kojem se komponente razgrađuju djelovanjem hidrolaza, a gradivni materijal poput aminokiselina se reciklira. Autofagiju između ostaloga mogu inducirati oksidacijski stres, nedostatak hranjivih tvari i IFN tip I. Tijekom nedostatka hranjivih tvari u stanici, AMP-om aktivirana proteinska kinaza (engl. *AMP-activated protein kinase*, AMPK) inducira autofagiju suprimirajući mTORC1 proteinski kompleks (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*), a faktori rasta i stanični stres također induciraju autofagiju supresijom mTOR-a preko fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*, PI3K/Akt) signalnog puta. IFN tip I također vezanjem na svoje receptore preko signalnog puta posredovanog Janus kinazom aktivira PI3K/Akt. Akt ne samo da inhibira mTOR, nego dodatno stimulira ekspresiju različitih gena koji induciraju proces autofagije. S obzirom na degradativnu

funkciju autofagije, pretpostavka je da se virusne komponente, virusne čestice i proteini domaćina neophodni za replikaciju virusa mogu uhvatiti i ukloniti autofagijom, zbog čega autofagija potencijalno predstavlja sastavni dio urođenog antivirusnog odgovora (Ganjan i sur., 2020).

1,25(OH)<sub>2</sub>D potiče sazrijevanje autofagosoma i autofagolizosoma djelujući na signalni put posredovan peptidom hCAP18. Također, 1,25(OH)<sub>2</sub>D inducira autofagiju reguliranjem više povezanih signalnih puteva kao što su B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2), mTOR te PI3K3, a djeluje regulatorno i na produkciju katelicidina. Zbog svog stimulatornog djelovanja na autofagiju, vitamin D bi u makrofagima mogao inhibirati i replikaciju SARS-CoV-2. VDR i odgovarajuća razina vitamina D mogu se povezati s prirodnom otpornošću na SARS-CoV-2, a to može biti i posljedica pojačane regulacije protuupalnog IL-10 i indukcije defenzina u sluznici osoba izloženih SARS-CoV-2 (Malaguarnera 2020).

Dodatan način na koji 1,25(OH)<sub>2</sub>D može ostvariti svoje djelovanje je moduliranje oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres ima brojne dobrotvorne antivirusne učinke, međutim, poremećena i pretjerana indukcija oksidacijskog stresa je povezana s patofiziologijom i oštećenjem tkiva. U monocitima i makrofagima, proizvodnja ROS-a i iNOS-a posredovana je PI3K signalnim putem (Soucy-Faulkner i sur., 2010; Sly i sur., 2001). PI3K je vrsta lipidne kinaze te igra glavnu ulogu u mnogim signalnim putevima i kao takva utječe na brojne biološke procese u stanici. Akt se aktivira uz pomoć PI3K putem fosforilacije. Greška u PI3K/Akt signalnom putu je djelomično odgovorna za oksidacijski stres u organizmu. Prethodna istraživanja indicirala su da 1,25(OH)<sub>2</sub>D ima sposobnost aktivirati PI3K/Akt signalni put i tako modulirati funkciju stanica (Jiang i sur., 2021). Na ovaj način calcitriol kontrolira redoks homostazu u prooksidacijskim indukcijama ROS-a i iNOS-a koji se stvaraju u cilju poticanja antivirusnog odgovora te kontrolira imunopatologiju indukcijom puteva uklanjanja ROS-a te antioksidacijskom inhibicijom iNOS-a (**Slika 7**) (Malaguarnera, 2020).



**Slika 7.** Pozitivni i negativni učinci vitamina D u imunomodulaciji tijekom infekcije SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno prema Malaguarnera, (2020) uz dopuštenje izdavača).

## 5. ZAKLJUČCI

- COVID-19 je respiratorna bolest uzrokovana virusom SARS-CoV-2 koja primarno zahvaća pluća, a jedna od najtežih komplikacija je razvoj ARDS-a.
- Vitamin D, uz dobro poznatu ulogu u održavanju homeostaze koštano – mišićnog sustava, ima važnu imunomodulatornu ulogu.
- Vitamin D smanjuje produkciju Th1 stanica i stoga smanjuje progresiju upale na način da smanjuje proizvodnju proupalnih citokina.
- Vitamin D smanjuje jačinu citokinske oluje koja predstavlja jedan od vodećih razloga smrti u kasnoj fazi infekcije virusom SARS-CoV-2 jer uzrokuje zatajenje i oštećenje brojnih organa.
- Sistemske upalne odgovore uzrokovane virusnom infekcijom smanjen je zbog povećane diferencijacije regulatornih T stanica pod utjecajem vitamina D.
- Vitamin D inducira proizvodnju endogenih antimikrobnih peptida poput katelicidina (LL-37) u makrofagima i epitelnim stanicama pluća, što djeluje protiv napadajućeg respiratornog virusa na način da razara virusnu ovojnicu i mijenja vijabilnost ciljnih molekula domaćina.
- Eksperimentalne studije su pokazale da vitamin D i njegovi metaboliti moduliraju funkciju endotela i vaskularnu permeabilnost putem brojnih genomske i ekstragenomske mehanizama.
- Održavanje optimalne razine vitamina D u krvi pospješuje rad imunološkog sustava koji omogućuje organizmu da se učinkovito izbori protiv svih patogena, uključujući viruse.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme*)

AECII – alveolarne epitelne stanice tipa II (engl. *alveolar type II epithelial cell*)

Akt – protein kinaza B (engl. *protein kinase B*)

ALI – akutna ozljeda pluća (engl. *acute lung injury*)

AMPK – AMP-om aktivirana proteinska kinaza (engl. *AMP-activated protein kinase*)

Ang – angiotenzin (engl. *angiotensin*)

APC – antigen prezentirajuće stanice (engl. *antigen presenting cells*)

ARDS – akutni respiratorni distres sindrom (engl. *acute respiratory distress syndrome*)

AT1 – receptor angiotenzina II tip 1 (engl. *angiotensin II receptor type 1*)

AT2 – receptor angiotenzina II tip 2 (engl. *angiotensin II receptor type 2*)

Bcl-2 – B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CAMP – katelicidin (engl. *cathelicidin antimicrobial peptide*)

COVID-19 – koronavirusna bolest (engl. *coronavirus disease 2019*)

CpG – citozin-gvanin dinukleotidni motivi (engl. *cytosine-guanine dinucleotide*)

CRP – C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*)

CYP27B1 – 1- $\alpha$ -hidroksilaza (engl. *1- $\alpha$ -hydroxylase*)

DC – dendritička stanica (engl. *dendritic cell*)

DEFB-2 – defenzin  $\beta$ 2 (engl. *beta-defensin 2*)

FGF-23 – faktor rasta fibroblasta 23 (engl. *fibroblast growth factor 23*)

G-CSF – faktor stimulacije rasta granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor*)

GM-CSF – faktor stimulacije rasta granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF)

hCAP18 – humani kationski antimikrobni protein (engl. *the human cationic antimicrobial protein*)

IFN – interferon (engl. *interferon*)

Ig – imunoglobulin (engl. *immunoglobulin*)

IL – interleukin (engl. *interleukin*)

iNOS – inducibilna sintaza dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

IP10 – interferonom gama inducirani protein 10 (engl. *interferon gamma-induced protein 10*)

IU – internacionalna jedinica (engl. *international unit*)

KOPB – kronična opstruktivska plućna bolest (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*)

LPS – lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)

Mas-R – Mas receptor (engl. *Mas receptor*)

MCP-1 – monocitni kemoatraktantni protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*)

MERS-CoV – bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirus (engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*)

MHC – molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MIP-1 $\alpha$  – makrofagni upalni protein 1 $\alpha$  (engl. *macrophage inflammatory protein 1 alpha*)



MPO – mijeloperoksidaza (engl. *myeloperoxidase*)

mTORC1 – mTORC1 proteinski kompleks (engl. mammalian target of rapamycin complex 1)

NAM – Nacionalna medicinska akademija (engl. *National Academy of Medicine*)

NEP – neutralna endopeptidaza (engl. *neutral endopeptidase*)

NETs – neutrofilne izvanstanične zamke (engl. *neutrophil extracellular traps*)

NK stanica – prirodno ubilačka stanica (engl. *natural killer cell*)

NKG2A – engl. *NK group 2 member A*

NOD – nepretili dijabetički (engl. *non-obese diabetic*)

PAMP – molekularni obrazac povezan s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular pattern*)

pDCs – plazmacitoidne dendritičke stanice (engl. *plasmacytoid dendritic cells*)

PD-L1 – ligand receptora programirane smrti 1 (engl. *programmed death-ligand 1*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PRR – receptori koji prepoznaju molekularne obrasce patogena (engl. *pattern recognition receptors*)

PTH – paratireoidni hormon (engl. *parathyroid hormone*)

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sustav

RBD – receptor-vezujuća domena (engl. *receptor-binding domain*)

RCT – nasumično kontrolirano istraživanje (engl. *randomized controlled trial*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

RXR – retinoidni X receptor (engl. *retinoid X receptor*)

SARS-CoV – teški akutni respiratorni sindrom koronavirus (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*)

SARS-CoV-2 – teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

ssRNA – jednolančana RNA (engl. *single-stranded RNA*)

TFH – T folikularne pomoćničke stanice (engl. *follicular helper cells*)

TGF- $\beta$  – transformirajući faktor rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* )

TLR – Toll-like receptor (engl. *Toll-like receptor*)

TMPRSS2 – transmembranska serinska proteaza 2 (engl. *transmembrane serine protease 2*)

TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

TSLP – timusni stromalni limfopoetin (engl. *thymic stromal lymphopoietin*)

URTI – infekcije gornjeg respiratornog trakta (engl. *upper respiratory tract infections*)

UV – ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

VDBP – vitamin D vezujući protein (engl. *vitamin D binding protein*)

VDR – receptor za vitamin D (engl. *vitamin D receptor*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

## 7. LITERATURA

Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(2), 80-90.

Afshar P, Ghaffaripour M, Sajjadi H. Suggested role of Vitamin D supplementation in COVID-19 severity. *J Contemp Med Sci*, 2020, 6(4), 191-192.

Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6), 1801.

Bergman P, Norlin AC, Hansen S, Rekha RS, Agerberth B, Björkhem-Bergman L, Ekström L, Lindh JD, Andersson J. Vitamin D3 supplementation in patients with frequent respiratory tract infections: a randomised and double-blind intervention study. *BMJ Open*, 2012, 13, 2(6), e001663.

Bikle DD. Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action. U: Endotext [Internet]. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., urednici, South Dartmouth (MA, SAD), MDText.com, Inc., 2000- (ažurirano: 31.12.2021.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/>, pristupljeno: 07.02.2022.

Borsche L, Glauner B, von Mendel J. COVID-19 Mortality Risk Correlates Inversely with Vitamin D3 Status, and a Mortality Rate Close to Zero Could Theoretically Be Achieved at 50 ng/mL 25(OH)D3: Results of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr*, 2021, 13(10), 3596.

Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front Endocrinol*, 2020, 10, 910.

Boutillier AJ, Elswa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13), 6995.

Boxx GM, Cheng G. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe*, 2016, 19, 760-769.

Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 2008, 84(3), 539-549.

Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Ren Physiol*, 1999, 277, F157-F175.

Camargo CA Jr, Ganmaa D, Frazier AL, Kirchberg FF, Stuart JJ, Kleinman K, Sumberzul N, Rich-Edwards JW. Randomized trial of vitamin D supplementation and risk of acute respiratory infection in Mongolia. *Pediatr*, 2012, 130(3), e561-e567.

Campbell GR, Spector SA (2012) Toll-Like Receptor 8 Ligands Activate a Vitamin D Mediated Autophagic Response that Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11), e1003017.

Carlberg C. Nutrigenomics of Vitamin D. *Nutr*, 2019; 11(3), 676.

Chen LN, Yang XH, Nissen DH, Chen YY, Wang LJ, Wang JH, Gao JL, Zhang LY. Dysregulated renin-angiotensin system contributes to acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion in mice. *Shock*, 2013, 40(5), 420-429.

Chen N, He D, Cui J. A Neutrophil Extracellular Traps Signature Predicts the Clinical Outcomes and Immunotherapy Response in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Mol Biosci*, 2022, 9, 833771.

Chiappelli F, Khakshooy A, Greenberg G. COVID-19 Immunopathology and Immunotherapy. *Bioinformation*, 2020, 16(3), 219-222.

Decyk A, Kobylińska M, Antosik K, Kurowska K. Vitamin D in SARS-CoV-2 infection. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2022, 73(1), 5-12.

Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*, 2022, 23, 165-176.

Duffield JS, Lupper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8, 241-276

Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*, 2001, 2(1), 33-46.

Ganjan H, Rajput C, Elzoheiry M, Sajjan U. Rhinovirus and Innate Immune Function of Airway Epithelium. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10, 277.

Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med*, 2009, 15, 410-416.

Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Ishii Y, Nakata K, Akagawa KS, Satoh K. Expression of Th2-skewed pathology mediators in monocyte-derived type 2 of dendritic cells (DC2). *Immunol Lett*, 2009, 126, 29-36.

Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol*, 2012, 76, 315-325.

Heyl KA, Klassert TE, Heinrich A, Muller MM, Klaile E, Dienemann H, Grünwald C, Bals R, Singer BB, Slevogt H. Dectin-1 is expressed in human lung and mediates the proinflammatory immune response to nontypeable haemophilus influenzae. *MBio*, 2014, 5(5), e01492-14.

Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(7), 1911-1930.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3), 141-154.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G,

Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, 395, 497-506.

Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, A Crackower M, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 2005, 436, 112-116.

Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LSK, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*, 2009, 183, 5458-5467.

Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, Tangpricha V. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med*, 2009, 7, 28.

Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med*, 2018, 50(4), 1-14.

Kannan S, Huang H, Seeger D, Audet A, Chen Y, Huang C, Gao H, Li S, Wu M. Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. Aeruginosa* infection. *PLoS One*, 2009, 4(3), e4891.

Kaufman HW, Niles JK, Kroll MH, Bi C, Holick MF. SARS-CoV-2 positivity rates associated with circulating 25-hydroxyvitamin D levels. *PLoS ONE*, 2020, 15(9), e0239252.

Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 2002, 109, 571-577.

Kronologija – aktivnosti Vijeća u vezi s bolešću COVID-19, 2019., <https://www.consilium.europa.eu/hr/policies/coronavirus/timeline/>, pristupljeno 20.05.2022.

Kundu R, Chain BM, Coussens AK, Khoo B, Noursadeghi M. Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2014, 44(6), 1781-1790.

Laktašić Žerjavić N. COVID-19 i vitamin D – postoji li poveznica? *Medicus*, 2020, 29(2), 219-224.

Laktašić-Žerjavić N, Koršić M, Crnčević-Orlić Ž, Anić B. Vitamin D: vitamin prošlosti, hormon budućnosti. *Liječ vjesn*, 2011, 133, 194-204.

Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural Killer Cells: Role in Local Tumor Growth and Metastasis. *Biologics*, 2012, 6, 73-82.

Levy BD, Serhan CN. Resolution of acute inflammation in the lung. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76, 467-492.

Li Y, Zeng Z, Cao Y, Liu Y, Ping F, Liang M, Xue Y, Xi C, Zhou M, Jiang W. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Sci Rep*, 2016, 6, 27911.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 2006, 311, 1770-1773.

Malaguarnera L. Vitamin D3 as Potential Treatment Adjuncts for COVID-19. *Nutr*, 2020, 12(11), 3512.

Mayer A, Bartz H, Fey F, Schmidt L, Dalpke A. Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. *Eur J Immunol*, 2008, 38, 1689-1699.

Mokhtari T, Hassani F, Ghaffari N, Ebrahimi B, Yarahmadi A, Hassanzadeh G. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms. *J Mol Histol*, 2020, 51, 613-628.

Murdoch DR, Slow S, Chambers ST, Jennings LC, Stewart AW, Priest PC, Florkowski CM, Livesey JH, Camargo CA, Scragg R. Effect of vitamin D3 supplementation on upper respiratory tract infections in healthy adults: the VIDARIS randomized controlled trial. *JAMA*, 2012, 308(13), 1333-1339.

Ostedgaard LS, Moninger TO, McMenimen JD, Sawin NM, Parker CP, Thornell IM, Powers LS, Gansemer ND, Bouzek DC, Cook DP, Meyerholz DK, Abou Alaiwa MH, Stoltz DA, Welsh MJ. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114, 6842-6847.

Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol*, 2006, 177, 8504-8511.

Pitanja i odgovori o bolesti uzrokovanoj novim koronavirusom, 2021. (a), <https://www.hzjz.hr/priopcenja-mediji/pitanja-i-odgovori-o-bolesti-uzrokovanoj-novim-koronavirusom/>, pristupljeno 02.02.2022.

Potey PMD, Rossi AG, Lucas CD, Dorward DA. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J Pathol*, 2019, 247(5), 672-685.

Priehl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and Immune Function. *Nutr*, 2013, 5(7), 2502-2521.

Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Pavelić E, Molnar V, Matišić V, Erceg Ivkošić I, Parčina M. Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front Immunol*, 2022, 13, 848582.



Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*, 2020, 71, 762-768.

Rafique A, Rejnmark L, Heickendorff L, Møller HJ. 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibits TNF- $\alpha$  expression in human monocyte derived macrophages. *PLoS One*, 2019, 14(4), e0215383.

Rahmatpanah F, Agrawal S, Jaiswal N, Nguyen HM, McClelland M, Agrawal A. Airway epithelial cells prime plasmacytoid dendritic cells to respond to pathogens via secretion of growth factors. *Mucosal Immunol*, 2019, 12, 77-84.

Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, 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 Investig*, 1999, 103(2), 239-251.

Salian VS, Wright JA, Vedell PT, Nair S, Li C, Kandimalla M, Tang X, Carmona Porquera EM, Kalari KR, Kandimalla KK. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol pharmaceutics*, 2021, 18(3), 754-771.

Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, Discipio RG. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunol*, 2012, 135(4), 287-298.

Singh PK, Tack BF, McCray PB Jr, Welsh MJ. Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279, L799-L805.

Sly L, Lopez M, Nauseef W, Reiner N. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced monocyte antimycobacterial activity is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and mediated by the NADPH-dependent phagocyte oxidase. *J Biol Chem*, 2001, 276, 35482-35493.

Smjernice za liječenje oboljelih od koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19) verzija 3 od 21. listopada 2021., 2021. (b), <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/11/Smjernice-za->

[lije%C4%8Denje-obiljelih-od-koronavirusne-bolesti-2019-COVID-19-verzija-3-od-21-listopada-2021.-godine.pdf](#), pristupljeno 05.02.2022.

Sørensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods*, 1997, 206, 53-59.

Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ. Cholecalciferol or Calcifediol in the Management of Vitamin D Deficiency. *Nutr*, 2020, 12(6), 1617.

Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzengue Y, Lamarre D, Vande Velde C, Grandvaux N. Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog*, 2010, 6(6), e1000930.

South AM, Tomlinson L, Edmonston D, Hiremath S, Sparks MA. Controversies of renin-angiotensin system inhibition during the COVID-19 pandemic. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16, 305-307.

Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull*, 2014, 39(4), 322-350.

St-Arnaud R, Arabian A, Travers R, Barletta F, Raval-Pandya M, Chapin K, Depovere J, Mathieu C, Christakos S, Demay MB, Glorieux FH. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinol*, 2000, 141(7), 2658-2666.

Telcian AG, Laza-Stanca V, Edwards MR, Harker JA, Wang H, Bartlett NW, Mallia P, Zdrenghea MT, Keadze T, Coyle AJ, Openshaw PJM, Stanciu LA, Johnston SL. RSV-induced bronchial epithelial cell PD-L1 expression inhibits CD8+ T cell nonspecific antiviral activity. *J Infect Dis*, 2011, 203, 85-94.

Ting JPY, Trowsdale J. Genetic Control of MHC Class II Expression. *Cell*, 2002, 109, S21-33.

Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur J Immunol*, 2009, 39, 3147-3159.

Utjecaj epidemije COVID-19 na korištenja primarne zdravstvene zaštite u Republici Hrvatskoj, 2021. (c), <https://www.hzjz.hr/sluzba-javno-zdravstvo/utjecaj-epidemije-covid-19-na-koristenja-primarne-zdravstvene-zastite-u-republici-hrvatskoj/>, pristupljeno 02.02.2022.

Vaidya A, Williams JS. The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. *Metabolism*, 2012, 61(4), 450-458.

Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24, 210-229.

Vranešić Bender D, Giljević Z, Kušec V, Laktašić Žerjavić N, Bošnjak Pašić M, Vrdoljak E, Ljubas Kelečić D, Reiner Ž, Anić B, Krznarić Ž. Smjernice za prevenciju, prepoznavanje i liječenje nedostatka vitamina D u odraslih. *Liječ Vjesn*, 2016, 138, 121-132.

Wang T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Lin R, Hanrahan JH, White JH. Cutting edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*, 2004, 173, 2909-2912.

Wang Y, Ninaber DK, van Schadewijk A, Hiemstra PS. Tiotropium and Fluticasone Inhibit Rhinovirus-Induced Mucin Production via Multiple Mechanisms in Differentiated Airway Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10, 278.

Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutr*, 2015, 7(10), 8251-8260.

Xu J, Yang J, Chen J, Luo Q, Zhang Q, Zhang H. Vitamin D alleviates lipopolysaccharide induced acute lung injury via regulation of the renin angiotensin system. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5), 7432-7438.

Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, Tai Y, Bai C, Gao T, Song J, Xia P, Dong J, Zhao J, Wang FS. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*, 2020, 8, 420-422.

Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti, 2020, Zagreb, Narodne novine, broj 47 (NN 47/954), 2020., [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020\\_04\\_47\\_954.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_04_47_954.html), pristupljeno 02.02.2022.

Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase. *J Immunol Am Assoc Immunol*, 2012, 188, 2127-2135.

Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, Xu Y, Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17, 533-535.

## 8. SAŽETAK

SARS-CoV-2 uzročnik je najnovije pandemijske zarazne bolesti, COVID-19, koja predstavlja ozbiljan rizik za ljudsko zdravlje. Infekcija SARS-CoV-2 uzrokuje aktivaciju imunskog sustava i sustavnu hiperinflamaciju što može dovesti do akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS), jednog od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u bolesnika s teškim oblikom infekcije SARS-CoV-2. Žrtve ARDS-a karakterizira značajan porast IL-6 i IL-1 te oštećenje endotela i povećana propusnost barijera. Aktivacija makrofaga, povezana s citokinskom olujom, potiče disregulaciju urođenog imuniteta, a u vrlo teškim oblicima infekcije dovodi i do oštećenja te zatajenja brojnih organa. Vitamin D i njegov receptor, receptor vitamina D (VDR), imaju ključnu ulogu u infekcijama zbog svog izvanrednog utjecaja na urođene i stečene imunodne odgovore te na suzbijanje upalnog procesa. Vitamin D smanjuje jačinu citokinske oluje te smanjuje sistemski upalni odgovor stimulirajući diferencijaciju regulatornih T stanica. Također, inducira proizvodnju endogenih antimikrobnih peptida koji organizam štite od napadajućeg respiratornog virusa. Zaštitna svojstva suplementacije vitaminom D potkrijepljena su brojnim opservacijskim studijama i meta-analizom kliničkih ispitivanja za prevenciju virusnih akutnih respiratornih infekcija. Imajući navedeno na umu, preporuča se održavanje optimalne razine vitamina D u krvi jer se time pospješuje rad imunskog sustava koji omogućuje organizmu da se učinkovito izbori sa svim patogenima, uključujući viruse.

## **SUMMARY**

SARS-CoV-2 is the causative agent of the latest pandemic infectious disease, COVID-19, which constitutes a serious risk to human health. SARS-CoV-2 infection causes immune activation and systemic hyperinflammation which can lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS), one of the leading causes of morbidity and mortality in patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection. ARDS victims are characterized by a significant increase in IL-6 and IL-1, as well as endothelial damage and increased barrier permeability. Macrophage activation, associated with the cytokine storm, promotes dysregulation of innate immunity and in very severe forms of infection leads to damage and failure of numerous organs. Vitamin D and its receptor, vitamin D receptor (VDR), exert a critical role in infections due to their remarkable impact on both innate and adaptive immune responses as well as on the suppression of the inflammatory process. Vitamin D reduces the intensity of the cytokine storm and also reduces the systemic inflammatory response by stimulating the differentiation of regulatory T cells. It also induces the production of endogenous antimicrobial peptides that protect the body from attacking respiratory viruses. The protective properties of vitamin D supplementation have been supported by numerous observational studies and by meta-analysis of clinical trials for prevention of viral acute respiratory infections. Considering this, it is recommended to maintain an optimal level of vitamin D in the blood, as this improves the work of the immune system, which enables the body to effectively fight all pathogens, including viruses.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ STATUSA VITAMINA D U ORGANIZMU NA TIJEK INFEKCIJE VIRUSOM SARS-COV-2

Mia Šimunović

#### SAŽETAK

SARS-CoV-2 uzročnik je najnovije pandemijske zarazne bolesti, COVID-19, koja predstavlja ozbiljan rizik za ljudsko zdravlje. Infekcija SARS-CoV-2 uzrokuje aktivaciju imunosnog sustava i sustavnu hiperinflamaciju što može dovesti do akutnog respiratornog distress sindroma (ARDS), jednog od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u bolesnika s teškim oblikom infekcije SARS-CoV-2. Žrtve ARDS-a karakterizira značajan porast IL-6 i IL-1 te oštećenje endotela i povećana propusnost barijera. Aktivacija makrofaga, povezana s citokinskom olujom, potiče disregulaciju urođenog imuniteta, a u vrlo teškim oblicima infekcije dovodi i do oštećenja te zatajenja brojnih organa. Vitamin D i njegov receptor, receptor vitamina D (VDR), imaju ključnu ulogu u infekcijama zbog svog izvanrednog utjecaja na urođene i stečene imunosne odgovore te na suzbijanje upalnog procesa. Vitamin D smanjuje jačinu citokinske oluje te smanjuje sistemski upalni odgovor stimulirajući diferencijaciju regulatornih T stanica. Također, inducira proizvodnju endogenih antimikrobnih peptida koji organizam štite od napadajućeg respiratornog virusa. Zaštitna svojstva suplementacije vitaminom D potkrijepljena su brojnim opservacijskim studijama i meta-analizom kliničkih ispitivanja za prevenciju virusnih akutnih respiratornih infekcija. Imajući navedeno na umu, preporuča se održavanje optimalne razine vitamina D u krvi jer se time pospješuje rad imunosnog sustava koji omogućuje organizmu da se učinkovito izbori sa svim patogenima, uključujući viruse.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 57 stranica, 7 grafičkih prikaza, 2 tablice i 84 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, imunomodulatorni učinci vitamina D, COVID-19, SARS-CoV-2, respiratorne infekcije

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ivan Pepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Roberta Petlevski**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: studeni, 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# INFLUENCE OF VITAMIN D STATUS IN THE ORGANISM ON THE COURSE OF SARS-CoV-2 INFECTION

Mia Šimunović

## SUMMARY

SARS-CoV-2 is the causative agent of the latest pandemic infectious disease, COVID-19, which constitutes a serious risk to human health. SARS-CoV2 infection causes immune activation and systemic hyperinflammation which can lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS), one of the leading causes of morbidity and mortality in patients with a severe form of SARS-CoV-2 infection. ARDS victims are characterized by a significant increase in IL-6 and IL-1, as well as endothelial damage and increased barrier permeability. Macrophage activation, associated with the cytokine storm, promotes dysregulation of innate immunity and in very severe forms of infection leads to damage and failure of numerous organs. Vitamin D and its receptor, vitamin D receptor (VDR), exert a critical role in infections due to their remarkable impact on both innate and adaptive immune responses as well as on the suppression of the inflammatory process. Vitamin D reduces the intensity of the cytokine storm and also reduces the systemic inflammatory response by stimulating the differentiation of regulatory T cells. It also induces the production of endogenous antimicrobial peptides that protect the body from attacking respiratory viruses. The protective properties of vitamin D supplementation have been supported by numerous observational studies and by meta-analysis of clinical trials for prevention of viral acute respiratory infections. Considering this, it is recommended to maintain an optimal level of vitamin D in the blood, as this improves the work of the immune system, which enables the body to effectively fight all pathogens, including viruses.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis includes: 57 pages, 7 figures, 2 tables and 84 references. Original is in Croatian language.

Keywords: vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, immunomodulatory effects of vitamin D, COVID-19, SARS-CoV-2, respiratory diseases

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Roberta Petlevski, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November, 2022.