



AKADEMIA
WYCHOWANIA FIZYCZNEGO
IM. POLSKICH OLIMPIJCZYKÓW
WE WROCLAWIU

**AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO
IM. POLSKICH OLIMPIJCZYKÓW WE WROCLAWIU**

Karol Danielik

Stężenie całkowitej oraz wolnej witaminy D w surowicy krwi
a wybrane elementy stylu życia sportowców

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Promotor

prof. dr hab. Małgorzata Słowińska-Lisowska

Recenzenci:

prof. dr hab. Ewa Ziemann
prof. dr hab. Maciej Pawlak
dr hab. Jan J. Kaczor

Wrocław, 2023

1. Wprowadzenie

Witaminą D nazywamy dwa związki podzielone ze względu na pochodzenie: ergokalcylferol (D₂) występujący w produktach roślinnych i grzybach oraz cholekalcylferol (D₃) znajdujący się w organizmach zwierzęcych. Formy te różnią się budową chemiczną łańcucha bocznego. Witamina D₂ zawiera wiązanie podwójne pomiędzy 22 i 23 atomem węgla oraz dodatkową grupę metylową w łańcuchu bocznym przy 24 atomie węgla (Maestro i wsp., 2019).

Pod wpływem promieniowania UVB (długość fali 290-315 nm) w keranocytach następuje konwersja z 7-dehydrocholesterolu do prewitaminy D₃. Najefektywniejsza synteza zachodzi przy długości fali 297 nm i stanowi około 90% całej puli witaminy D w organizmie (Grant, 2009; Holick, 2008). Na skutek nieenzymatycznej fotoizomeryzacji uwarunkowanej temperaturą, z prewitaminy D₃ powstaje 25(OH)D₃, a jej nadmiar jest przekształcany do metabolitów: lumisterolu, tachysterolu, 5,6-transwitaminy D₃ oraz suprasteroli, które są nieaktywne biologicznie (Bikle, 2014; Mostafa i Hegazy, 2015). We krwi znajduje się około 40 metabolitów witaminy D (Bartoszewicz i wsp., 2013). Witamina D jest też przyswajana z pożywienia w postaci D₂ oraz D₃. Obie nie posiadają aktywności biologicznej (Bikle, 2014).

Po reakcjach podwójnej hydroksylacji witamina D staje się aktywna biologicznie. Aktywna forma może działać bezpośrednio regulując metabolizmem wapnia i fosforu lub pośrednio poprzez zwiążanie się z receptorem jądrowym witaminy D (VDR - z ang. *vitamin D receptor*) (Bikle, 2014). Białko wiążące witaminę D (VDBP z ang. *Vitamin D Binding Protein*) wiąże 85-90% 1,25(OH)₂D obecnego w krążeniu, a jej pozostała niezwiążana frakcja jest uznawana za biodostępną. Około 10-15% 1,25(OH)₂D wiąże się z albuminą z czego 1% całkowitej ilości witaminy D to wolna witamina D. Ze względu na możliwość występowania mutacji genu VDBP może istnieć osobnicza zmienność co do ilości biologicznie dostępnej witaminy D (Powe i wsp., 2013). Gen VDBP jest wysoce polimorficzny, co prawdopodobnie wpływa na występowanie różnic w stężeniu witaminy D w organizmie (Engelman i wsp., 2008; Sinotte i wsp., 2009).

Najczęściej do oceny statusu witaminy D stosowany jest pomiar stężenie 25(OH)D. Są doniesienia wskazujące na istotne jego ograniczenia (Powe i wsp., 2013; Yousefzadeh i wsp., 2014). Niektórzy autorzy sugerują oznaczanie również innych wskaźników takich jak: wolna i biodostępna witamina D, metabolity witaminy D (Herrmann i wsp., 2017).

Ocena polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (z ang. SNP – *single nucleotide polymorphism*) białka VDBP, reduktazy 7-dehydrocholesterolu oraz receptora VDR może pomóc w identyfikacji osób zagrożonych niedoborem witaminy D. Szczególnie jest to ważne w przypadku niewystarczającej odpowiedzi na suplementację witaminą D (Herrmann i wsp., 2017). Ponadto niektórzy autorzy sugerują, że ocena tylko całkowitego stężenia 25(OH)D jako wskaźnika niedoboru witaminy D jest prawdopodobnie niewystarczająca (Bikle i Schwartz, 2019). Oznaczenie wolnej frakcji witaminy D jest bardziej skorelowane z niektórymi jednostkami chorobowymi i może ona być lepszym wskaźnikiem oceny statusu witaminy D w surowicy niż jej całkowite stężenie 25(OH)D (Tsuprykov i wsp., 2018; Tsuprykov i wsp. 2019). Pomiar można wykonać metodą pośrednią lub bezpośrednią. W badaniu Sebestyen VanSickle i wsp. na zdrowych, młodych osobach, ocena wolnej 25(OH)D dwoma metodami – bezpośrednią i kalkulowaną dała podobne wyniki (Sebestyen VanSickle i wsp., 2020). W przypadku osób z jednostkami chorobowymi lub w różnych stanach fizjologicznych (np. ciąża) zauważono, iż obliczone wartości wolnej 25(OH)D różnią się od zmierzonych bezpośrednio np. przy użyciu ultrafiltracji odśrodkowej lub testu ELISA (Schwartz i wsp., 2014).

Po odkryciu receptora witaminy D w większości jądrzastych komórek organizmu, witaminie D przypisuje się działanie na wielu płaszczyznach. Poza docelowymi tkankami receptor ten występuje również w limfocytach, keranocytach, makrofagach, komórkach nowotworowych, komórkach jajnika czy komórkach wysp trzustkowych (DeLuca, 2008). W dostępnym piśmiennictwie stwierdzono, że najwyższa ekspresja receptora znajduje się w jelicie, nerkach, mięśniach i kościach (Bikle, 2014; Bischoff-Ferrari, 2012; Ceglia i Harris, 2013; Pojednic i Ceglia, 2014). Wykazano także, że 1,25(OH)₂D nie tylko reguluje metabolizmem wapnia i fosforu, ale bierze również udział m.in. w reakcjach apoptozy, proliferacji, różnicowania się komórek, wydzielania insuliny oraz odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego i szkieletowo-mięśniowego (Christakos i wsp.,

2016). Aktywny metabolit witaminy D znajdujący się w wielu komórkach i narządach poprzez wiązanie z VDR wpływa m.in. na wydzielanie insuliny, prawidłowe funkcjonowanie mięśnia sercowego, zmniejszanie wskaźników stanu zapalnego oraz regulację ciśnienia krwi (Bouvard i wsp., 2011; Holick, 2006; Thacher i Clarke, 2011; Timpini i wsp., 2011). Poprzez aktywację VDR witamina D ma bezpośredni wpływ na epigenom i ekspresję ponad 1000 genów (Carlberg, 2019).

Podstawową funkcją witaminy D jest regulacja metabolizmu wapnia i fosforu. Odgrywa także istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu kostnego. Po odkryciu receptora VDR w mięśniach szkieletowych zaobserwowano, że witamina D może mieć również kluczowe znaczenie dla wielu procesów biologicznych zachodzących w układzie mięśniowym. Witamina D wpływa na transport jonów wapnia między komórkami. Ponadto reguluje syntezę białek, które są odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie mięśni. Dowiedziono, że optymalne stężenie 25(OH)D koreluje z prawidłową kurczliwością mięśni (Wintermeyer i wsp., 2016). Stan niedoboru witaminy D powoduje m.in. atrofię włókien mięśniowych oraz osłabienie siły mięśniowej (Dzik i Kaczor, 2019; Janssen i wsp., 2002). Dysfunkcja mięśni objawia się nie tylko upośledzoną strukturą miocytów, ale również zaburzeniem integralności białek kurczliwych i nieprawidłowym działaniem mitochondriów. Warto zauważyć, że włókna mięśniowe typu II są szczególnie wrażliwe na niedobór witaminy D, a w przypadku jej deficytu obserwuje się ich atrofię ze zwłóknieniem (Boland, 1986). Włókna typu II w odróżnieniu od włókien typu I inicjują szybszy skurcz mięśnia (Talbot i Maves, 2016). Zatem można uznać, że są istotne w wysiłkach o wysokiej intensywności (Bartoszewska i wsp. 2010).

W dostępnym piśmiennictwie wykazano istotną rolę witaminy D w prawidłowym funkcjonowaniu wielu układów: mięśniowo-szkieletowego, odpornościowego, krążeniowo-oddechowego oraz nerwowego. Ponadto niedobór witaminy D może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia stanów zapalnych, co może odgrywać istotną rolę w obniżeniu odporności, zwiększaniu ryzyka kontuzji oraz przyczyniać się do wystąpienia zespołu przetrenowania (de la Puente Yagüe i wsp., 2020).

Niedobór witaminy D stwierdzono w wielu populacjach (Cui i wsp., 2023). Sportowcy są tak samo narażeni na występowanie niskiego stężenia witaminy D jak inne

grupy społeczne. W piśmiennictwie znajdują się informacje, że niedobór witaminy D występuje u wielu sportowców, co wskazuje na powszechność tego problemu, nawet w grupie osób trenujących na świeżym powietrzu (Farrokhyar i wsp., 2015; Hamilton i wsp., 2010; Morton i wsp., 2012; Willis i wsp., 2012). Najbardziej narażeni na deficyt tej witaminy są zawodnicy dyscyplin, którzy trenują w przestrzeniach zamkniętych, w szczególności w miesiącach zimowych (Constantini i wsp., 2010; Farrokhyar i wsp., 2015; Fitzgerald i wsp., 2014; Halliday i wsp., 2011; Krzywanski i wsp., 2016; Lovell, 2008; Ogan i Pritchett, 2013; von Hurst i Beck, 2014). Sugeruje to, iż ekspozycja na słońce jest głównym czynnikiem determinującym optymalne stężenie witaminy D w surowicy (Knuschke, 2021). Krzywański i wsp. w badaniu z udziałem polskich elitarnych sportowców stwierdzili, że odsetek osób wykazujących deficyt witaminy D nie różnił się znacząco pomiędzy zawodnikami trenującymi na zewnątrz (80%) i w przestrzeniach zamkniętych (84%) (Krzywanski i wsp., 2016). Może to sugerować, że stężenie witaminy D może być bardziej uzależnione od innego czynnika np. szerokości geograficznej na jakiej przebywają zawodnicy lub pigmentacji skóry. Częściej niedobór witaminy D występuje u sportowców zamieszkujących kraje o niskim stopniu nasłonecznienia. Niedostateczne stężenie 25(OH)D obserwuje się również w krajach o wysokim stopniu nasłonecznienia (González-Molero i wsp. 2011; Spiro i Buttriss, 2014). Ze względu na kluczową rolę, jaką w syntezie witaminy D odgrywa światło słoneczne, każdy czynnik regulujący ten mechanizm będzie mógł przyczynić się do niedoboru witaminy D. Na status witaminy D w grupie sportowców może wpływać rodzaj uprawianej dyscypliny sportu, pora roku, miejsce odbywania treningu oraz kolor skóry (Halliday i wsp., 2011; Morton i wsp., 2012; Maroon i wsp., 2015; Owens i wsp., 2018).

Wartym podkreślenia jest fakt, że instytuty na całym świecie nie są zgodne, co do interpretacji stężenia 25(OH)D w surowicy oraz zaleceń, dotyczących wymaganej suplementacji. Normy stężenia 25(OH)D dla sportowców nie są obecnie jednoznacznie ustalone, co powoduje wiele niejasności. W dostępnym piśmiennictwie sugeruje się, że stężenie witaminy D powyżej 40 ng/ml może m.in. poprawiać funkcjonowanie mięśni szkieletowych, zmniejszać czas ich regeneracji powysiłkowej oraz zwiększać ich siłę i moc, co przyczynia się bezpośrednio do zwiększenia zdolności wysiłkowych (Ogan i Pritchett, 2013; Książek i wsp., 2019). Natomiast niektórzy autorzy sugerują, iż optymalne stężenie

25(OH)D powinno być jeszcze wyższe. Shuler i wsp. podają, że dla uzyskania optymalnych zdolności wysiłkowych rekomendowane jest stężenie w granicach 50 ng/ml (Shuler i wsp., 2012).

Ilość syntetyzowanego endogennie 25(OH)D zależy może od wielu czynników takich jak: wskaźnika BMI, a szczególnie zawartości tkanki tłuszczowej, wieku, pory roku i dnia, stosowania kremów z filtrami UV, karnacji skóry, stopnia zachmurzenia, powierzchni skóry, na którą padają promienie słoneczne, szerokości geograficznej, w jakiej się przebywa, poziomu zanieczyszczenia powietrza oraz rodzaju noszonych ubrań. Ponadto na stężenie 25(OH)D wpływa również stan zdrowia i ilość witaminy D dostarczona egzogennie poprzez spożyte produkty żywnościowe i suplementację.

Do oceny statusu witaminy D w organizmie stosuje się również metabolit 25(OH)D. Okres półtrwania tego związku wynosi około 21 dni. W przypadku 1,25(OH)₂D czas ten waha się od 4 do 6 godzin. Stężenie 1,25(OH)₂D w surowicy krwi jest tysiąckrotnie niższe niż 25(OH)D, co powoduje brak użyteczności tego związku w diagnostyce laboratoryjnej (Holick, 2009). Pomimo że, 1,25(OH)₂D jest biologicznie aktywną formą witaminy D, jego oznaczenie nie jest obecnie stosowane. Powodem jest krótki okres półtrwania – stężenie może wahać się w ciągu jednej doby oraz zależy od poziomu PTH, wapnia i fosforu (Bartoszewicz i wsp., 2013). W sytuacji niedoboru witaminy D w organizmie następuje obniżenie wchłaniania wapnia w jelitach, co zwiększa sekrecję PTH. Hormon ten jest odpowiedzialny za metabolizm wapnia poprzez zwiększenie jego kanalikowego wchłaniania zwrotnego w nerkach i uwalniania z kośćca. Ponadto PTH zmniejsza także stężenie fosforanów we krwi i zwiększa ich wydalanie z moczem.

Standardem diagnostycznym powinno być równoczesne oznaczanie 25(OH)D₂ oraz 25(OH)D₃, czyli 25(OH)D całkowitej. Do oceny stężenia witaminy D oraz krążących metabolitów najczęściej stosuje się testy immunochemiczne. Ze względu na niejednoznaczne wyniki badań immunochemicznych, coraz częściej w diagnostyce medycznej wykorzystuje się chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Obecnie stwierdza się, że jednoczesna spektrometria masowa

z chromatografią cieczową jest najdokładniejszą metodą do oceny stężenia metabolitów witaminy D i można ją uznać za tak zwany „złoty standard”.

2. Cel badań

Celem badań była ocena zależności pomiędzy stężeniem całkowitej oraz wolnej witaminy D w surowicy krwi a wybranymi elementami stylu życia u sportowców.

Pytania badawcze

1. Czy stężenie wolnej oraz całkowitej witaminy D istotnie różni się w zależności od pory roku (zima vs. lato)?
2. Czy stężenie wolnej oraz całkowitej witaminy D różni się w zależności od miejsca odbywania treningów (zawodnicy trenujący na zewnątrz vs. trenujący w przestrzeniach zamkniętych)?
3. Czy stężenie wolnej oraz całkowitej witaminy D różni się w zależności od poziomu aktywności fizycznej (sportowcy vs. osoby o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej) w dwóch okresach?
4. Czy występuje zależność pomiędzy wybranymi elementami stylu życia a stężeniem wolnej oraz całkowitej witaminy D w surowicy krwi badanych uczestników? Które czynniki można uznać za najsilniejsze z predyktorów wpływające na stężenie witaminy D - wolnej i całkowitej?

3. Materiał i metody

3.1. Charakterystyka grupy badanej

Badanie zostało podzielone na dwa etapy.

W pierwszej części eksperymentu przeprowadzonego w okresie zimowym (luty/marzec 2021 rok) brało udział 31 zawodników grających w piłkę nożną oraz 19 zawodników trenujących judo. W badaniach uczestniczyli zawodnicy grający w piłkę nożną w III lidze. Sportowcy trenujący judo byli z drużyny KS Gwardia Wrocław oraz MKS Juwenia Wrocław. Są to zawodnicy rywalizujący na szczeblu krajowym i międzynarodowym. Podczas badań zawodnicy byli w okresie przygotowawczym, trenowali 5-6 razy w tygodniu po 1,5-2 godziny. Sportowcy w ramach reprezentowanej dyscypliny sportowej byli poddawani podobnym obciążeniom wysiłkowym.

Do porównania ze sportowcami utworzono grupę 23 osób o niskim ($n=5$) i średnim ($n=18$) poziomie aktywności fizycznej. Poziom aktywności fizycznej został oceniony na podstawie Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (z ang. *International Physical Activity Questionnaire - IPAQ*) – wersja krótka (Craig i wsp., 2003). W okresie zimowym średnia ekspozycja na promienie słoneczne osób z grupy osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej wynosiła $1,8 \pm 0,8$ h/dzień, a w okresie letnim $2,4 \pm 1,2$ h/dzień.

Spożycie witaminy D w dawce minimum 1000 IU/dziennie w postaci suplementu diety w okresie zimowym deklarowało pięciu (22%) mężczyzn z grupy osób o średnim i niskim poziomie aktywności fizycznej, sześciu (32%) judoków oraz dziewięciu (29%) piłkarzy nożnych. W okresie letnim suplementację witaminą D stosowało dwóch (12%) uczestników badań z grupy osób o średnim i niskim poziomie aktywności fizycznej, czterech (33%) judoków oraz ośmiu (40%) piłkarzy nożnych.

Wszyscy uczestnicy badania byli rasy kaukaskiej, mieszkali we Wrocławiu lub w jego okolicach ($51^{\circ}06'N$).

Jeden z uczestników badań (zawodnik grający w piłkę nożną) w okresie zimowym korzystał z solarium.

Drugą część eksperymentu przeprowadzono w okresie letnim (wrzesień 2021) i brało w nim udział 49 uczestników w tym 20 zawodników grających w piłkę nożną, 12 zawodników trenujących judo oraz 17 osób grupy osób o niskim (n=4) i średnim (n=13) poziomie aktywności fizycznej. Wszystkie osoby biorące udział w okresie letnim były również badane zimą na pierwszym etapie badań.

Uczestnicy zostali poinformowani o celu badań i możliwości zrezygnowania z eksperymentu na każdym jego etapie. Wszyscy badani wyrazili pisemną świadomą zgodę zgodnie z Deklaracją Helsińską dla ludzi i dyrektywą Rady Wspólnot Europejskich z dnia 24 listopada 1986 r. (86/608/EEC). Realizacja badań rozpoczęła się po wcześniejszym otrzymaniu zgody Senackiej Komisji ds. Etyki Badań Naukowych przy Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, uchwała nr 18/2013.

Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy z okresu zimowego

Wskaźnik	Piłka nożna (n=31)	Judo (n=19)	Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n= 23)
Wiek [lata]	23 ± 4 ^a	23 ± 3 ^b	28 ± 4 ^{a,b}
Wysokość ciała [cm]	181 ± 6	180 ± 5	178 ± 7
Masa ciała [kg]	76,8 ± 7,1 ^{a,c}	81,8 ± 9,8 ^c	82,7 ± 13,7 ^a
BMI [kg/m ²]	23,8 ± 1,8 ^{a,c}	25,1 ± 2,2 ^c	25,9 ± 3,3 ^a
WHR	0,96 ± 0,02 ^c	0,99 ± 0,03 ^{b,c}	0,95 ± 0,03 ^b
Zawartość tkanki tłuszczowej [%]	10,7 ± 1,5 ^a	11,0 ± 2,4 ^b	17,0 ± 5,1 ^{a,b}
MET TOTAL [MET-min/tydzień]	8488 ± 5278 ^a	10188 ± 3742 ^b	1946 ± 841 ^{a,b}

Średnia ± SD; ¹PA – poziom aktywności fizycznej a – istotna statystycznie różnica pomiędzy piłka nożna vs. osoby o niskim i średnim PA (p<0,05); b – istotna statystycznie różnica pomiędzy osoby o niskim i średnim PA vs. judo (p<0,05); c – istotna statystycznie różnica pomiędzy osób o niskim i średnim PA różni się istotnie od tej grupy sportowców (p<0,05); c – istotna statystycznie różnica pomiędzy judo vs. piłka nożna

W trakcie badań wszyscy uczestnicy prowadzili rejestr spożytych posiłków, napojów oraz suplementów diety. Charakterystyka badanej grupy w okresie zimowym została przedstawiona w tabeli 1. Osoby o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej były istotnie statystycznie starsze w porównaniu do zawodników trenujących piłkę nożną i judo. Średnia masa ciała piłkarzy była istotnie niższa od średniej masy ciała judoków oraz osób o niskim i średnim poziomie aktywności. Sportowcy mieli istotnie niższą zawartość tkanki tłuszczowej oszacowanej na podstawie grubości fałdów skórno—tłuszczowych. Równoważnik MET TOTAL charakteryzujący poziom aktywności fizycznej był istotnie wyższy w grupie sportowców w porównaniu do osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej. Charakterystykę badanej grupy z okresu letniego przedstawiono w tabeli 2. Tendencje wyników dotyczące charakterystyki antropometrycznej były analogiczne jak w okresie zimowym. Piłkarze nożni mieli istotnie niższy wskaźnik BMI w porównaniu do judoków oraz osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej. Grupa sportowców miała zdecydowanie niższą zawartość tkanki tłuszczowej oszacowanej na podstawie grubości fałdów skórno-tłuszczowych. Ponadto równoważnik MET TOTAL istotnie różnił się pomiędzy sportowcami a osobami o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej.

Tabela 2. Charakterystyka badanej grupy z okresu letniego

Wskaźnik	Piłka nożna (n=20)	Judo (n=12)	Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n= 17)
Wiek [lata]	23 ± 4 ^a	23 ± 3 ^b	28 ± 3 ^{a,b}
Wysokość ciała [cm]	181 ± 6	180 ± 5	178 ± 7
Masa ciała [kg]	76,8 ± 6,6	80,2 ± 7,1	81,3 ± 13,0
BMI [kg/m ²]	23,4 ± 1,1 ^{a,c}	24,7 ± 1,6 ^c	25,6 ± 3,1 ^a
WHR	0,87 ± 0,06	0,85 ± 0,04	0,9 ± 0,06
Zawartość tkanki tłuszczowej [%]	10,4 ± 1,3 ^a	11,1 ± 2,1 ^b	15,5 ± 4,1 ^{a,b}
MET TOTAL [MET-min/tydzień]	6691 ± 2671 ^a	6716 ± 1853 ^b	1720 ± 906 ^{a,b}

Średnia ± SD; ¹PA – poziom aktywności fizycznej a – istotna statystycznie różnica pomiędzy piłka nożna vs. osoby o niskim i średnim PA (p<0,05); b – istotna statystycznie różnica pomiędzy osoby o niskim i średnim PA vs. judo (p<0,05); c – istotna statystycznie różnica pomiędzy osób o niskim i średnim PA różni się istotnie od tej grupy sportowców (p<0,05); c – istotna statystycznie różnica pomiędzy judo vs. piłka nożna

3.2. Metody badawcze

3.2.1. Kwestionariusz FFLQ

Za pomocą Kwestionariusza FFLQ (z ang. *Food Frequency Lifestyle Questionnaire*) oceniono m.in. częstość spożycia produktów zawierających witaminę D, spożycie witaminy D z suplementów diety, czas spędzony na powietrzu, korzystanie z solarium, całkowitą ekspozycję na promieniowanie UV, rodzaj noszonych ubrań oraz stosowanie filtrów przeciwsłonecznych (Larson-Meyer i wsp., 2019). Uzyskano pisemną zgodę autora Kwestionariusza na jego wykorzystanie i zmodyfikowano go uwzględniając produkty dostępne na polskim rynku.

W Kwestionariuszu FFLQ oceniano następujące czynniki:

- częstość spożywania produktów żywnościowych zawierających witaminę D,
- częstość spożywania suplementów diety,

- czas spędzany na świeżym powietrzu,
- korzystanie z solarium,
- używanie filtrów przeciwsłonecznych,
- czas poświęcony na spacerowaniu do szkoły, pracy, itp.,
- miejsce pobytu przez ostatnie dwa miesiące,
- miejsce spędzania ferii/wakacji,
- kolor skóry/pochodzenie etniczne,
- rodzaj noszonych ubrań w ostatnich dwóch miesiącach.

W celu oszacowania powierzchni ciała zakrytej przez ubrania skorzystano z metody „reguły 9” (Moore, Waheed i Burns, 2022). Całkowita ekspozycja na słońce została oszacowana na podstawie sumy zgłoszonego czasu wolnego spędzonego na świeżym powietrzu i korzystania z solarium. W przypadku zawodników trenujących judo przyjęto 0 godzin dziennie na powietrzu w trakcie treningu, a u piłkarzy 2 godziny dziennie.

3.2.2. 24 godzinny dzienniczek żywieniowy bieżącego notowania

Do oceny całkowitego spożycia witaminy D z pożywienia oraz suplementów diety wykorzystano metodę dzienniczka żywieniowego bieżącego notowania. Uczestnicy badań notowali na bieżąco wszystkie spożyte płyny, pokarmy oraz suplementy diety w ciągu 3 kolejnych dni. Badani zostali poinstruowani, jak prowadzić dokładny rejestr wszystkich spożytych posiłków i napojów.

3.2.3. Oznaczenia biochemiczne w surowicy krwi

Uczestnikom badania pobrano krew z żyły odłokciowej w celu oznaczenia stężenia całkowitej i wolnej witaminy D, białka wiążącego witaminę D (VDBP) albuminy, wapnia całkowitego oraz PTH.

Krew pobierano na czczo w godzinach porannych (7-10 godzina). Badani nie podejmowali żadnej aktywności fizycznej przez okres co najmniej 24 godzin poprzedzających badanie krwi. Próbkę pobierano do probówek, zawierających aktywator

skrzepu (Vacutest, Kima, Włochy). Krew przechowywano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, a następnie wirowano przy 1300 g, przez 10 min, w temperaturze 22°C. Surowicę przechowywano w temperaturze -70°C.

3.2.3.1. Oznaczanie albuminy

Albuminę oznaczano metodą kolorymetryczną z zielenią bromokrezolową. Oznaczenie zostało wykonane na analizatorze biochemicznym BS-800- firmy MINDRAY.

3.2.3.2. Oznaczanie wapnia

Wapń całkowity oznaczano w surowicy metodą kolorymetryczną z Arsenazo III- na analizatorze biochemicznym BS-800- firmy MINDRAY.

3.2.3.3. Oznaczanie PTH

PTH w surowicy krwi oznaczano metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA) na analizatorze Elecsys (Roche, Szwajcaria). Współczynniki zmienności wewnątrz- i między-testowej (CVs) wynosiły odpowiednio 4,5% i 4,8%, a granica wykrywalności wynosiła 1,20 pg/ml (0,127 pmol/l).

3.2.3.4. Oznaczanie 25(OH)D

25(OH)D oznaczono metodą analizy ilościowej przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS; QTRAP®4500, Sciex, Framingham, MA, USA) i systemem EXion LC HPLC. Badanie zostało przeprowadzone udoskonaloną metodą przygotowania próbki do szybkiej analizy LC-MS/MS (Rola i wsp., 2020).

3.2.3.5. Oznaczanie białka wiążącego witaminę D (VDBP)

Białko wiążące witaminę D (VDBP) mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) R&D Systems, Minneapolis, MN, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcjami producenta. Współczynnik zmienności w obrębie testu mieści się w zakresie od 5% do 7%, a w obrębie testu w zakresie od 5% do 8%.

3.2.3.6. Oznaczanie wolnej witaminy D

Stężenie wolnej 25(OH)D w surowicy kalkulowano przy użyciu dwóch metod. Stężenie wolnej 25(OH)D obliczono stosując równania opisane przez Bikle i wsp. (metoda 1 – M1) (Bikle i wsp., 1986).

$$\text{Wolna } 25(\text{OH})\text{D} = \frac{\text{total } 25(\text{OH})\text{D}}{1 + (6 \times 10^5 \text{albumin}) + (7 \times 10^8 \times \text{VDBP})}$$

Stężenie wolnej 25(OH)D obliczono również poprzez równania opisane przez Vermeulena i wsp. (metoda 2 – M2) (Vermeulen i wsp., 1999). Algorytm Vermeulena i wsp. dostosowano przez zastąpienie zmiennych dla testosteronu, SHBG oraz ich odpowiednich stałych wiązania przez zmienne dla 25(OH)D, VDBP ,

$$FT = \frac{(|T| - (N \times |FT|))}{(K_t \{SHBG - [T] + N[FT]\})}$$

gdzie K_t jest stałą asocjacji SHBG dla T i $N = K_a \text{Ca} + 1$. Daje to równanie drugiego stopnia, które można rozwiązać dla FT lub SHBG.

3.2.4. Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej – IPAQ

Do oceny poziomu aktywności fizycznej badanych osób wykorzystano Międzynarodowy Kwestionariusz IPAQ – wersja krótka. Uzupełnianie odpowiedzi w Kwestionariuszu odbywało się przy udziale ankietera prowadzącego badania w dniu wykonywania pomiarów antropometrycznych.

Na podstawie Kwestionariusza oceniano poziom aktywności fizycznej. Pytania dotyczyły czasu poświęconego na różne rodzaje aktywności fizycznej w ciągu ostatniego przebytego tygodnia (7dni). Respondenci brali pod uwagę czynności wykonywane w trakcie swojej pracy zawodowej, w czasie wolnym poświęconym rekreacji oraz przemieszczanie się z miejsca na miejsce.

Szacowana za pomocą Kwestionariusza IPAQ aktywność fizyczna była ostatecznie wyrażana w jednostkach MET - minuty/tydzień, która jest sumą poszczególnych wydatków energetycznych aktywności o wysokiej, średniej i niskiej intensywności (Ainsworth i wsp., 2000).

3.2.5. Analiza statystyczna

Dane przedstawione zostały przy pomocy średniej, mediany, odchylenia standardowego oraz przedziału kwartylowego. Normalność danych została oceniona przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Porównanie stężenia wolnej i całkowitej 25(OH)D pomiędzy grupą osób o średnim i niskim poziomie aktywności fizycznej, judoków oraz piłkarzy nożnych zostało wykonane przy pomocy testu Kruskala-Wallisa z analizą post-hoc z poprawką Holma. Ocenę zmian pomiędzy zimą a latem stężenia wolnej i całkowitej 25(OH)D dokonano przy pomocy testu Wilcoxon dla danych sparowanych.

Ocena związku pomiędzy czynnikami analizowanymi w projekcie badawczym, a stężeniem wolnej i całkowitej 25(OH)D została wykonana przy pomocy analizy liniowych modeli mieszanych. Zależności pomiędzy zmienną wyjaśniającą, a zmienną zależną zostały przedstawione za pomocą współczynnika *beta*. Stworzono zarówno modele jednoczynnikowe, jak i wieloczynnikowe z uwzględnieniem suplementacji witaminą D oraz pory roku.

Analiza została przygotowana przy pomocy programu R for Windows (wersja 4.2.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) oraz programu Statistica (wersja 13.3). Istotności wyników została ustalona na poziomie $<0,05$.

IV WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań oceniano w dwóch okresach: zimowym i letnim. W tabeli 3 przedstawiono stężenia wskaźników biochemicznych we krwi badanych grup w okresie zimowym. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic. W tabeli 4 przedstawiono analogicznie dane z okresu letniego. Wartości stężeń PTH u piłkarzy nożnych są niższe w porównaniu od osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej.

Tabela 3. Wartości średniej i odchylenia standardowego (SD) oznaczanych wskaźników we krwi badanych mężczyzn w okresie zimowym

Wskaźnik	Piłka nożna (n=31)	Judo (n=19)	Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n= 23)
25(OH)D (ng/ml)	27,3 ± 14,2	23,8 ± 13,4	20,4 ± 9,1
Albumina (g/dl)	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2
VDBP (μmol/l)	2,48 ± 0,51	2,24 ± 0,39	2,19 ± 0,58
Wolna 25(OH)D M1 (pg/ml)	17 ± 10	15,4 ± 8,8	14,5 ± 8,2
Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)	16,7 ± 9,6	15,3 ± 8,5	14,3 ± 8,2
Wapń (mg/dl)	9,9 ± 0,4	9,9 ± 0,5	9,9 ± 0,3
PTH (pg/ml)	40,6 ± 19	47,6 ± 17,4	46,1 ± 19,7

Średnia ± SD; ¹PA – poziom aktywności fizycznej

Tabela 4. Wartości średniej i odchylenia standardowego (SD) oznaczanych wskaźników we krwi badanych mężczyzn w okresie letnim

Wskaźnik	Piłka nożna (n=20)	Judo (n=12)	Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n= 17)
25(OH)D (ng/ml)	38,2 ± 11,9	36 ± 12,8	32,4 ± 11,3
Albumina (g/dl)	4,9 ± 0,2	5 ± 0,2	5 ± 0,1
VDBP (μmol/l)	2,58 ± 0,41	2,38 ± 0,33	2,49 ± 0,45
Wolna 25(OH)D M1 (pg/ml)	22,4 ± 9,2	22,2 ± 8,9	19 ± 7,2
Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)	18,3 ± 6,8	18 ± 7,4	15,5 ± 6
Wapń (mg/dl)	9,9 ± 0,4	10,1 ± 0,3	10 ± 0,2
PTH (pg/ml)	30,8 ± 9,8 ^a	43,3 ± 26,8	45,7 ± 20 ^a

Średnia ± SD; ¹PA – poziom aktywności fizycznej; a – istotna statystycznie różnica pomiędzy piłką nożną vs. osoby o niskim i średnim PA (p<0,05);

W tabeli 5 i 6 przedstawiono liczbę oraz procent badanych mężczyzn uwzględniając podział ze względu na normy stężenia całkowitej i wolnej 25(OH)D w okresie zimowym. Za wartości referencyjne przyjęto wytyczne dotyczące profilaktyki i leczenia niedoboru witaminy D w Polsce podane przez grupę reprezentującą polskie i międzynarodowe towarzystwa medyczne oraz ośmiu krajowych konsultantów specjalistycznych (Płudowski i wsp., 2023). Należy jednak podkreślić, że dla sportowców rekomendowane jest stężenie 25(OH)D powyżej 40 ng/ml (Książek i wsp., 2019; Ogan i Pritchett, 2013).

Tabela 5. Liczba oraz procent badanych mężczyzn w zależności od stężenia całkowitej 25(OH)D w surowicy krwi w okresie zimowym

Grupa / Norma	<20 ng/ml	20-30 ng/ml	30-50 ng/ml	50-100 ng/ml
Piłka nożna (n=31)	9 (29%)	13 (42%)	7 (23%)	2 (6%)
Judo (n=19)	8 (43%)	5 (26%)	5 (26%)	1 (5%)
Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n= 23)	11 (48%)	9 (39%)	3 (13%)	0 (0%)

¹PA – poziom aktywności fizycznej

W okresie zimowym w grupie osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej tylko trzech (13%) uczestników badań posiadała optymalne (30-50 ng/ml) stężenie 25(OH)D w surowicy krwi. W grupie judoków osiemnastu (95%) uczestników badań miało stężenie poniżej zalecanego dla sportowców (<40 ng/ml). W grupie piłkarzy nożnych w okresie zimowym tylko u trzech (10%) uczestników wykazano optymalne stężenie (>40 ng/ml) całkowitej 25(OH)D. W okresie zimowym nie wykazano stężenia 25(OH)D powyżej 100 ng/ml.

Tabela 6. Liczba oraz procent badanych mężczyzn w zależności od stężenia wolnej 25(OH)D M1 i M2 w surowicy badanych mężczyzn w okresie zimowym

Grupa / Norma	0-8,49 pg/ml		≥8,50 pg/ml	
	25(OH)D M1	25(OH)D M2	25(OH)D M1	25(OH)D M2
Piłka nożna (n=31)	7 (23%)	7 (23%)	24 (77%)	24 (77%)
Judo (n=19)	4 (21%)	5 (26%)	15 (79%)	14 (74%)
Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n= 23)	7 (30%)	7 (30%)	16 (70%)	16 (70%)

¹PA – poziom aktywności fizycznej

Wartość referencyjna wolnej 25(OH)D - powyżej 8,5 pg/ml - została przyjęta na podstawie rekomendacji Zeng i wsp. z 2021 (Zeng i wsp., 2021). W okresie zimowym wykazano, że u czterech lub pięciu judoków w zależności od zastosowanej metody obliczenia (M1 lub M2), stężenie wolnej 25(OH)D było poniżej optymalnego (<8,5 pg/ml). W grupie osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej w okresie zimowym siedmiu (30%) uczestników badań oraz siedmiu (23%) piłkarzy nożnych nie posiadała optymalnego stężenia wolnej 25(OH)D (≥8,5 pg/ml).

W tabeli 7 i 8 przedstawiono liczbę oraz procent badanych mężczyzn uwzględniając podział ze względu na normy stężenia całkowitej i wolnej 25(OH)D w okresie letnim.

W drugim etapie badań w grupie osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej siedmiu (41%) uczestników posiadało optymalne (30-50 ng/ml) stężenie 25(OH)D w surowicy krwi. Jeden uczestnik badań z tej grupy miał stężenie powyżej optymalnego (>50 ng/ml). W grupie judoków 42% uczestników badań miało optymalne stężenie

zalecanego dla sportowców (>40 ng/ml). W grupie piłkarzy nożnych w okresie letnim aż u 70% badanych nie stwierdzono zalecanego stężenia (>40 ng/ml) całkowitej 25(OH)D dla sportowców. Żaden z piłkarzy nożnych nie został zakwalifikowany do grupy z niedoborem (<20ng/ml) stężenie 25(OH)D w surowicy. W okresie letnim nie wykazano stężenia 25(OH)D powyżej 100 ng/ml.

Tabela 7. Liczba oraz procent badanych mężczyzn w zależności od stężenia całkowitej 25(OH)D w surowicy krwi w okresie letnim

Grupa / Norma	<20 ng/ml	20-30 ng/ml	30-50 ng/ml	50-100 ng/ml
Piłka nożna (n=20)	0 (0%)	5 (25%)	12 (60%)	3 (15%)
Judo (n=12)	0 (0%)	4 (33%)	7 (58%)	1 (8%)
Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n=17)	2 (12%)	7 (41%)	7 (41%)	1 (6%)

¹PA – poziom aktywności fizycznej

Tabela 8. Liczba oraz procent badanych mężczyzn w zależności od stężenia wolnej 25(OH)D M1 i M2 w surowicy badanych mężczyzn w okresie letnim

Grupa / Norma	0-8,49 pg/ml		≥8,50 pg/ml	
	25(OH)D M1	25(OH)D M2	25(OH)D M1	25(OH)D M2
Piłka nożna (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)	20 (100%)
Judo (n=12)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	12 (100%)
Osoby o niskim i średnim PA ¹ (n=17)	1 (6%)	1 (6%)	16 (94%)	16 (94%)

¹PA – poziom aktywności fizycznej

W okresie letnim nie odnotowano różnic w liczbie osób poniżej optymalnego stężenia wolnej 25(OH)D pomiędzy dwoma metodami wyliczenia wolnej 25(OH)D. Większość uczestników badań posiadała optymalne stężenie wolnej 25(OH)D (≥8,5 pg/ml). Tylko u jednego uczestnika badań wykazano stężenie wolnej 25(OH)D poniżej optymalnego (<8,5 pg/ml).

4.1. Porównanie stężenia wolnej oraz całkowitej 25(OH)D w okresie zimowym oraz letnim

W tabeli 9 przedstawione zostało porównanie stężenia całkowitej oraz wolnej 25(OH)D w okresie zimowym oraz letnim w poszczególnych grupach. We wszystkich analizowanych grupach oprócz judoków zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą medianę stężenia całkowitej 25(OH)D w okresie zimowym w porównaniu do letniego ($p < 0,001$). Analizując stężenie wolnej 25(OH)D M1 wykazano w okresie letnim wyższy jej poziom u piłkarzy nożnych ($p = 0,019$). Natomiast nie obserwowano istotnych różnic w medianie stężenia wolnej 25(OH) M1 pomiędzy okresem zimowym a letnim w grupie osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej ($p = 0,37$) oraz w grupie judoków ($p = 0,035$). W przypadku stężenia wolnej 25(OH)D M2 nie wykazano istotnych różnic w podgrupach.

4.2. Porównanie stężenia całkowitej oraz wolnej 25(OH)D w zależności od miejsca odbywania treningów (zawodnicy trenujący na zewnątrz vs. trenujący w przestrzeniach zamkniętych) oraz ze względu na poziom aktywności fizycznej (sportowcy vs. osoby o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej)

W tabeli 10 przedstawiono porównanie stężenia całkowitej i wolnej 25(OH)D w surowicy sportowców trenujących na zewnątrz (piłkarze nożni), w przestrzeniach zamkniętych (judocy) oraz u osób z grup o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej w okresie zimowym oraz letnim. Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w medianie stężenia całkowitej oraz wolnej 25(OH)D M1 i M2 w surowicy badanych grup zarówno w okresie zimowym jak i letnim. Stężenie całkowitej oraz wolnej 25(OH)D w grupie sportowców nie różni ze względu na miejsce odbywanych treningów oraz nie zależy od poziomu aktywności fizycznej. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w medianie stężenia wolnej i całkowitej 25(OH)D pomiędzy grupami zarówno zimą jak i latem ($p > 0,05$). Zaobserwowano jedynie trend, w którym sportowcy (judocy i piłkarze nożni) mieli wyższe stężenia całkowitej oraz wolnej 25(OH)D w porównaniu do grupy osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej. Wyjątek stanowi trend niższej mediany stężeń wolnej 25(OH)D w grupie judoków od osób grupy osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej w okresie zimowym.

Tabela 9. Stężenie całkowitej 25(OH)D (mediana [kwartyle]) i wolnej 25(OH)D (mediana [kwartyle]) w okresie letnim oraz zimowym w badanych grupach

Pora roku / Grupa uczestników	Całkowita 25(OH)D (ng/ml)			Wolna 25(OH)D M1 (pg/ml)			Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)		
	Zima	Lato	p-value	Zima	Lato	p-value	Zima	Lato	p-value
Piłkarze nożni	28,10 [16,37 - 30,64]	33,89 [30,26 - 42,92]	<0,001	16,91 [9,25 - 21,49]	19,87 [16,32 - 25,57]	0,019	16,79 [9,32 - 21,29]	16,84 [13,67 - 21,02]	0,36
Judocy	22,45 [13,00 - 30,73]	32,36 [28,02 - 41,36]	0,013	13,22 [8,92 - 20,71]	20,09 [15,96 - 25,44]	0,035	13,16 [9,02 - 20,61]	15,60 [12,73 - 20,60]	0,24
Osoby o niskim i średnim PA¹	20,76 [13,07 - 27,24]	29,74 [26,47 - 36,15]	<0,001	14,99 [8,60 - 19,87]	16,83 [15,58 - 22,15]	0,16	14,98 [8,71 - 20,14]	13,72 [12,09 - 18,06]	0,77

¹PA – poziom aktywności fizycznej

Tabela 10. Porównanie stężenia całkowitej 25(OH)D i wolnej 25(OH)D w surowicy krwi badanych mężczyzn w okresie zimowym i letnim

Pora roku / Grupa uczestników	Całkowita 25(OH)D (ng/ml)				Wolna 25(OH)D M1 (pg/ml)				Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)			
	Zima	p	Lato	p	Zima	p	Lato	p	Zima	p	Lato	p
Pilkarze nożni	28,1 [16,4 - 30,6]	0,17	33,9 [30,3 - 42,9]	0,29	16,9 [9,3 - 21,5]	0,79	19,8 [16,3 - 25,6]	0,32	16,8 [9,3 - 21,3]	0,80	16,8 [13,7 - 21,0]	0,28
Judocy	22,5 [13,0 - 30,7]		32,4 [28,1 - 41,4]		13,2 [8,9 - 20,7]		20,1 [16,0 - 25,4]		13,2 [9,0 - 20,6]		15,6 [12,7 - 20,6]	
Osoby o niskim i średnim PA¹	20,8 [13,1 - 27,2]		29,7 [26,5 - 36,2]		15,0 [8,6 - 19,9]		16,8 [15,6 - 22,2]		15,0 [8,7 - 20,1]		13,7 [12,1 - 18,1]	

¹PA – poziom aktywności fizycznej

4.3. Zależność pomiędzy wybranymi elementami stylu życia a stężeniem całkowitej oraz wolnej 25(OH)D w surowicy krwi badanych uczestników

W okresie zimowym wykazano istotny statystycznie ujemny związek między godzinami siedzenia w ciągu dnia ($p=0,003$) a stężeniem całkowitej 25(OH)D. Stwierdzono dodatnią zależność całkowitego 25(OH)D stwierdzono z czasem spędzonym na świeżym powietrzu ($p=0,018$) oraz sumą całkowitego czasu ekspozycji na słońce ($p=0,044$). W przypadku wolnej 25(OH)D odnotowano jedynie dodatni związek z częstotliwością używania filtrów słonecznych wolnej 25(OH)D M1 ($p=0,027$) i M2 ($p=0,024$) (tabela 11).

Natomiast nie stwierdzono znaczącej zależności pomiędzy wartością równoważnika MET TOTAL, spożyciem witaminy D na podstawie Kwestionariusz FFLQ, korzystania z solarium, używania filtrów przeciwsłonecznych, czasem spacerowania po dworze, czasem w drodze do szkoły lub pracy, pokryciem ciała przez ubrania, czy spożyciem witaminy D na podstawie dzienniczka żywieniowego a wolną i całkowitą 25(OH)D.

W tabeli 12 przedstawiono zależności pomiędzy stężeniem całkowitej oraz wolnej 25(OH)D a wybranymi elementami stylu życia w surowicy krwi badanych mężczyzn w okresie letnim. Stwierdzono statystycznie istotny dodatni związek między wartością równoważnika MET TOTAL a stężeniem całkowitej 25(OH)D ($p=0,005$) oraz wolnej 25(OH)D M2 ($p=0,049$). Dodatkowo odnotowano istotną statystycznie ujemną zależność między godzinami siedzenia w ciągu dnia, a stężeniem całkowitej i wolnej 25(OH)D ($p<0,05$). Zaobserwowano również istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy spożytą witaminą D oszacowaną na podstawie dzienniczka żywieniowego a stężeniem całkowitej 25(OH)D ($p=0,003$) oraz wolnej 25(OH)D M1 ($p=0,005$), M2 ($p=0,004$). Nie stwierdzono znaczącej zależności pomiędzy spożyciem witaminy D na podstawie Kwestionariusza FFLQ, używaniem filtrów przeciwsłonecznych, czasem ekspozycji na promienie słoneczne lub pokryciem ciała przez ubrania na podstawie dzienniczka żywieniowego a stężeniem całkowitej i wolnej 25(OH)D.

Tabela 1. Zależności pomiędzy stężeniem całkowitej 25(OH)D oraz wolnej 25(OH)D a wybranymi elementami stylu życia w surowicy krwi badanych mężczyzn w okresie zimowym (n=73)

Zmienna		Całkowita 25(OH)D (ng/ml)		Wolna 25(OH)D M1(pg/ml)		Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)	
		β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	P-value	β (95% CI)	p-value
Kwestionariusz IPAQ	MET TOTAL [MET-min/tydzień]	0,060 (-0,173; 0,292)	0,62	0,000 (-0,238; 0,237)	>0,99	-0,002 (-0,240; 0,236)	0,99
	Godziny siedzenia/dzień [h]	-0,337 (-0,556; -0,118)	0,003	-0,209 (-0,442; 0,023)	0,077	-0,203 (-0,436; 0,030)	0,088
Kwestionariusz FFLQ	Spożycie witaminy D FFLQ [IU]	0,049 (-0,184; 0,281)	0,68	0,023 (-0,214; 0,261)	0,85	0,026 (-0,211; 0,264)	0,83
	Czas spędzony na słońcu na świeżym powietrzu [min]	0,271 (0,047; 0,495)	0,018	0,224 (-0,008; 0,456)	0,058	0,221 (-0,011; 0,453)	0,062
	Częstość korzystania z solarium	0,168 (-0,061; 0,398)	0,15	0,019 (-0,219; 0,257)	0,88	0,018 (-0,219; 0,256)	0,88
	Częstość stosowania kremów z filtrem	0,135 (-0,095; 0,366)	0,25	0,259 (0,029; 0,488)	0,027	0,265 (0,035; 0,494)	0,024
	Rodzaj stosowanego filtra SPF	0,062 (-0,170; 0,295)	0,60	0,155 (-0,080; 0,390)	0,20	0,158 (-0,077; 0,393)	0,19
	Czas spacerowania w drodze do pracy/szkoły [min]	0,045 (-0,188; 0,277)	0,71	0,032 (-0,206; 0,269)	0,79	0,028 (-0,209; 0,266)	0,81
	Całkowity czas ekspozycji na słońce [h]	0,233 (0,007; 0,459)	0,044	0,162 (-0,073; 0,396)	0,18	0,157 (-0,078; 0,392)	0,19
	Powierzchnia ciała pokryta przez ubranie [%]	0,201 (-0,027; 0,429)	0,084	0,164 (-0,071; 0,398)	0,17	0,160 (-0,074; 0,395)	0,18
24h wywiad żywieniowy	Średnie spożycie witaminy D[μg/dzień]	0,152 (-0,078; 0,382)	0,19	0,105 (-0,131; 0,341)	0,38	0,110 (-0,126; 0,347)	0,36

MET – ang. *metabolic equivalent*; β – współczynnik niestandardyzowany; 95% CI – przedział ufności

Tabela 2. Zależność pomiędzy czynnikami stylu życia a stężeniem całkowitej 25(OH)D oraz wolnej 25(OH)D w surowicy krwi badanych mężczyzn w okresie letnim (n=49)

Zmienna		Całkowita 25(OH)D (ng/ml)		Wolna 25(OH)D M1 (pg/ml)		Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)	
		β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value	β (95% CI)	p-value
Kwestionariusz IPAQ	MET TOTAL [MET-min/tydzień]	0,381 (0,117; 0,646)	0,005	0,243 (-0,034; 0,521)	0,085	0,275 (0,000; 0,550)	0,049
	Godziny siedzenia/dzień [h]	-0,312 (-0,583; -0,040)	0,025	-0,347 (-0,615; -0,079)	0,011	-0,349 (-0,617; -0,082)	0,011
Kwestionariusz FFLQ	Spożycie witaminy D FFLQ [IU]	0,002 (-0,284; 0,288)	0,99	-0,104 (-0,388; 0,180)	0,47	-0,084 (-0,369; 0,201)	0,56
	Czas spędzony na słońcu na świeżym powietrzu [min]	0,113 (-0,171; 0,397)	0,43	0,052 (-0,234; 0,337)	0,72	0,057 (-0,228; 0,342)	0,70
	Częstość stosowania kremów z filtrem	0,057 (-0,228; 0,343)	0,69	0,012 (-0,274; 0,298)	0,93	0,030 (-0,256; 0,316)	0,84
	Rodzaj stosowanego filtra SPF	-0,012 (-0,298; 0,274)	0,94	-0,092 (-0,377; 0,193)	0,53	-0,073 (-0,358; 0,212)	0,62
	Czas spacerowania w drodze do pracy/szkoły [min]	0,048 (-0,238; 0,333)	0,74	0,102 (-0,182; 0,386)	0,48	0,099 (-0,185; 0,384)	0,49
	Całkowity czas ekspozycji na słońce [h]	0,164 (-0,118; 0,446)	0,25	0,131 (-0,153; 0,414)	0,37	0,137 (-0,146; 0,420)	0,34
	Powierzchnia ciała pokryta przez ubranie [%]	0,157 (-0,125; 0,440)	0,28	0,134 (-0,150; 0,417)	0,35	0,135 (-0,148; 0,418)	0,35
24h wywiad żywieniowy	Średnie spożycie witaminy D [μg/dzień]	0,401 (0,139; 0,663)	0,003	0,377 (0,112; 0,642)	0,005	0,385 (0,121; 0,649)	0,004

MET – ang. *metabolic equivalent*; β – współczynnik niestandardyzowany; 95% CI – przedział ufności

W tabeli 13 przedstawiono wyniki analizy dwuczynnikowej liniowego modelu mieszanego dotyczącego wpływu pory roku i suplementacji witaminą D na stężenie całkowitej 25(OH)D. W tym modelu statystycznym suplementacja oraz pora roku istotnie wpływają na stężenie całkowitej 25(OH)D. Wykazano, że pora roku była silniejszym predyktorem niż suplementacja witaminą D.

W tabeli 14 przedstawiono wyniki analizy dwuczynnikowej liniowego modelu mieszanego dotyczącego wpływu pory roku i suplementacji witaminą D na stężenie wolnej 25(OH)D M1. W przypadku wolnej 25(OH)D M1 w stworzonych modelach nie zaobserwowano istotnego wpływu pory roku w grupie osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej. W pozostałych podgrupach oba czynniki były istotne statystycznie. Zaobserwowano, że to pora roku bardziej determinuje stężenie wolnej 25(OH)D niż suplementacja.

W tabeli 15 przedstawiono wyniki analizy dwuczynnikowej liniowego modelu mieszanego dotyczącego wpływu pory roku i suplementacji witaminą D na stężenie wolnej 25(OH)D M2. We wszystkich analizowanych podgrupach wykazano, że pora roku nie wpływa na stężenie wolnej 25(OH)D M2. W stworzonych modelach istotnym czynnikiem była tylko suplementacja.

Tabela 13. Wartość współczynnika β dotycząca wpływu pory roku oraz suplementacji na stężenie całkowitej 25(OH)D w badanych grupach

Zmienne / Grupa uczestników	Całkowita 25(OH)D (ng/ml)			
	Pora roku β (95% CI)	p-value	Suplementacja β (95% CI)	p-value
Wszyscy uczestnicy	-0,869 (-1,115; -0,624)	<0,001	0,621 (0,500; 0,742)	<0,001
Pilkarze nożni	-0,850 (-1,236; -0,465)	<0,001	0,658 (0,468; 0,848)	<0,001
Judocy	-0,796 (-1,310; -0,282)	0,004	0,626 (0,371; 0,880)	<0,001
Osoby o niskim i średnim PA ¹	-1,016 (-1,488; -0,543)	<0,001	0,480 (0,244; 0,717)	<0,001

¹PA – poziom aktywności fizycznej; β – współczynnik niestandardyzowany; 95% CI – przedział ufności

Tabela 14. Wartość współczynnika β dotycząca wpływu pory roku oraz suplementacji na stężenie wolnej 25(OH)D M1 w badanych grupach

Zmienne / Grupa uczestników	Wolna 25(OH)D M1 (pg/ml)			
	Pora roku β (95% CI)	p-value	Suplementacja β (95% CI)	p-value
Wszyscy uczestnicy	-0,595 (-0,874; -0,317)	<0,001	0,606 (0,468; 0,743)	<0,001
Pilkarze nożni	-0,604 (-1,068; -0,139)	0,012	0,570 (0,340; 0,800)	<0,001
Judocy	-0,672 (-1,180; -0,165)	0,011	0,670 (0,419; 0,922)	<0,001
Osoby o niskim i średnim PA ¹	-0,494 (-0,995; 0,007)	0,053	0,631 (0,378; 0,883)	<0,001

¹PA – poziom aktywności fizycznej; β – współczynnik niestandardyzowany; 95% CI – przedział ufności

Tabela 15. Wartość współczynnika β dotycząca wpływu pory roku oraz suplementacji na stężenie wolnej 25(OH)D M2 w badanych grupach

Zmienne / Grupa uczestników	Wolna 25(OH)D M2 (pg/ml)			
	Pora roku β (95% CI)	p-value	Suplementacja β (95% CI)	p-value
Wszyscy uczestnicy	-0,206 (-0,492; 0,080)	0,16	0,636 (0,495; 0,778)	<0,001
Pilkarze nożni	-0,236 (-0,705; 0,233)	0,32	0,613 (0,381; 0,845)	<0,001
Judocy	-0,280 (-0,828; 0,268)	0,30	0,694 (0,423; 0,966)	<0,001
Osoby o niskim i średnim PA ¹	-0,069 (-0,582; 0,443)	0,79	0,658 (0,400; 0,916)	<0,001

¹PA – poziom aktywności fizycznej; β – współczynnik niestandardyzowany; 95% CI – przedział ufności

Czynniki limitujące

Projekt prowadzono w czasie pandemii COVID, co ograniczało liczbę zgłoszonych respondentów. W badaniach pobierano krew z żyły odłokciowej, przez co konieczny był kontakt bezpośredni. Należy też zwrócić uwagę na niedokładność metod oceniających spożycie witaminy D z diety. Kwestionariusz FFLQ jest badaniem ankietowym oceniającym częstość spożycia produktów zawierających witaminę D. Z kolei ocena diety na podstawie dzienniczka żywieniowego często wiąże się z zaniżaniem danych. W celu dokładnej oceny diety należałoby skorzystać z metody chemiczno-analitycznej. Ze względu na koszty, rzadko stosuje się ją w badaniach naukowych. Podobnie w przypadku oceny poziomu aktywności fizycznej opartego na Kwestionariuszu IPAQ. Lepszym narzędziem badawczym byłoby użycie na przykład akcelerometru.

Wybrane elementy stylu życia zostały porównywane w 3 grupach. Sportowcy w ramach uprawianej dyscypliny stosują porównywalną dietę, przebywają podobny czas w tym samym miejscu, co sprawia, że są to grupy w pewnym stopniu jednorodne. W celu porównania sportowców do grupy osób o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej należałoby zebrać więcej ochotników o niskim poziomie aktywności fizycznej. Należy jednak podkreślić, iż do tego typu badań najczęściej zgłaszają się osoby z prawidłową masą ciała, o średnim poziomie aktywności i prawidłowymi lub w niewielkim stopniu odbiegającymi od rekomendowanych nawykami żywieniowymi.

V PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ/WNIOSKI

1. Stężenie całkowitej 25(OH)D różni się w zależności od pory roku we wszystkich grupach. Stężenie wolnej 25(OH)D M1 w zależności od pory roku różni się tylko w grupie judoków i piłkarzy nożnych. Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w stężeniu wolnej 25(OH)D M2 w grupach w zależności od pory roku.
2. Stężenie całkowitej i wolnej 25(OH)D nie różni się w zależności od miejsca odbywania treningów zimą i latem.
3. Nie stwierdzono różnic w stężeniu wolnej i całkowitej 25(OH)D pomiędzy sportowcami a osobami o niskim i średnim poziomie aktywności fizycznej. Zaobserwowano natomiast statystycznie istotny dodatni związek między wartością równoważnika MET TOTAL a stężeniem całkowitej 25(OH)D oraz wolnej 25(OH)D M2.
4. Na podstawie stworzonego modelu statystycznego wykazano, że stężenie całkowitej 25(OH)D w istotnym stopniu zależy od suplementacji oraz pory roku. Stwierdzono, że pora roku jest silniejszym predyktorem niż suplementacja witaminą D.
5. W miesiącach letnich odnotowano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem 25(OH)D a wartością równoważnika MET TOTAL, spożyciem witaminy D na podstawie 24 godzinowego wywiadu żywieniowego oraz ujemną zależność z godzinami siedzenia w ciągu dnia.
6. W okresie zimowym wykazano statystycznie istotną dodatnią zależność pomiędzy czasem spędzonym na świeżym powietrzu i ekspozycją na słońce, a stężeniem całkowitej 25(OH)D.
7. Należy monitorować stężenie 25(OH)D w surowicy krwi u sportowców i w zależności od jej poziomu rozważyć suplementację oraz zmianę wybranych elementów stylu życia (większa ekspozycja na światło słoneczne, modyfikacja diety).
8. Wydaje się, że rekomendacja oznaczania stężenia wolnej witaminy 25(OH)D jako wskaźnika statusu witaminy D wymaga jeszcze dalszych badań na większych grupach osób oraz zastosowania dokładniejszych metod diagnostycznych bezpośrednio oceniających jej stężenie w surowicy krwi.

VI PIŚMIENNICTWO

Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 2000, 32(9 Suppl): 498-504.

Bartoszewicz Z, Kondracka A, Jaźwiec R, Popow M, Dadlez M, Bednarczuk T. Czy umiemy wiarygodnie mierzyć stężenia klinicznie ważnych metabolitów witaminy D? Problemy i ich konsekwencje. *Endokrynol Pol* 2013, 64(3): 22–30.

Bartoszewska M, Kamboj M, Patel DR. Vitamin D, muscle function, and exercise performance. *Pediatr Clin North Am* 2010, 57(3): 849–861.

Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 63(4): 954–959.

Bikle DD, Schwartz J. Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front Endocrinol* 2019, 10: 317.

Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol* 2014, 21(3): 319–329.

Bischoff-Ferrari HA. Relevance of vitamin D in muscle health. *Rev Endocr Metab Disord* 2012, 13(1): 71–77.

Boland R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 1986, 7(4): 434–448.

Bouvard B, Annweiler C, Sallé A, Beauchet O, Chappard D, Audran M, Legrand E. Extraskelletal effects of vitamin D: facts, uncertainties, and controversies. *Joint Bone Spine* 2011, 78(1): 10–16.

- Carlberg C. Vitamin D: A Micronutrient Regulating Genes. *Curr Pharm Des* 2019, 25(15): 1740–1746.
- Ceglia L, Harris SS. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Calcif Tissue Int* 2013, 92(2): 151–162.
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 2016, 96(1): 365–408.
- Constantini NW, Arieli R, Chodick G, Dubnov-Raz G. High prevalence of vitamin D insufficiency in athletes and dancers. *Clin J Sport Med Off J Can Acad Sport Med* 2010, 20(5): 368–371.
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc.* 2003, 35(8):1381-1395.
- Cui A, Zhang T, Xiao P, Fan Z, Wang H, Zhuang Y. Global and regional prevalence of vitamin D deficiency in population-based studies from 2000 to 2022: A pooled analysis of 7.9 million participants. *Front Nutr* 2023, 10.
- de la Puente Yagüe M, Collado Yurrita L, Ciudad Cabañas MJ, Cuadrado Cenzual MA. Role of Vitamin D in Athletes and Their Performance: Current Concepts and New Trends. *Nutrients* 2020, 12(2): 579.
- DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev* 2008, 66(10 Suppl 2): 73-87.
- Dzik KP, Kaczor JJ. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur J Appl Physiol* 2019, 119(4): 825–839.
- Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, Bowden DW, Norris JM. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93(9): 3381–3388.

Farrokhyar F, Tabasinejad R, Dao D, Peterson D, Ayeni OR, Hadioonzadeh R, Bhandari M. Prevalence of vitamin D inadequacy in athletes: a systematic-review and meta-analysis. *Sports Med* 2015, 45(3): 365–378.

Fitzgerald JS, Peterson BJ, Warpeha JM, Wilson PB, Rhodes GS, Ingraham SJ. Vitamin D status and VO₂peak during a skate treadmill graded exercise test in competitive ice hockey players. *J Strength Cond Res* 2014, 28(11): 3200–3205.

González-Molero I, Morcillo S, Valdés S, Pérez-Valero V, Botas P, Delgado E, Hernández D, Olveira G, Rojo G, Gutierrez-Repiso C, Rubio-Martín E, Menéndez E, Soriguer F. Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr*. 2011, 65(3):321-328.

Grant W. The Health Benefits of Solar Irradiance and Vitamin D and the Consequences of Their Deprivation. *Clin Rev Bone Miner Metab* 2009, 7(2): 134–146.

Halliday TM, Peterson NJ, Thomas JJ, Kleppinger K, Hollis BW, Larson-Meyer DE. Vitamin D status relative to diet, lifestyle, injury, and illness in college athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2011, 43(2): 335–343.

Hamilton, B.; Grantham, J.; Racinais, S.; Chalabi, H. Vitamin D Deficiency Is Endemic in Middle Eastern Sportsmen. *Public Health Nutr* 2010, 13(10): 1528–1534,

Herrmann M, Farrell C-JL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status – a changing landscape. *Clin Chem Lab Med CCLM* 2017, 55(1): 3–26.

Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006, 81(3): 353–373.

Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009, 19(2): 73–78.

Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 2008, 66 (10 Suppl 2): 182-194.

- Janssen HCJP, Samson MM, Verhaar HJJ. Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people. *Am J Clin Nutr* 2002, 75(4): 611–615.
- Knuschke P. Sun Exposure and Vitamin D. *Curr Probl Dermatol* 2021, 55: 296–315.
- Krzywanski J, Mikulski T, Krysztofiak H, Mlynczak M, Gaczynska E, Ziemba A. Seasonal Vitamin D Status in Polish Elite Athletes in Relation to Sun Exposure and Oral Supplementation. *PloS One* 2016, 11: 0164395.
- Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes-A Narrative Review. *Nutrients* 2019, 11(10): 1800.
- Larson-Meyer DE, Douglas CS, Thomas JJ, Johnson EC, Barcal JN, Heller JE, Hollis BW, Halliday TM. Validation of a Vitamin D Specific Questionnaire to Determine Vitamin D Status in Athletes. *Nutrients*. 2019, 11(11): 2732.
- Lovell G. Vitamin D status of females in an elite gymnastics program. *Clin J Sport Med Off J Can Acad Sport Med* 2008, 18(2): 159–161.
- Maestro MA, Molnár F, Carlberg C. Vitamin D and Its Synthetic Analogs. *J Med Chem* 2019, 62(15): 6854–6875.
- Maroon, J.C.; Mathyssek, C.M.; Bost, J.W.; Amos, A.; Winkelman, R.; Yates, A.P.; Duca, M.A.; Norwig, J.A. Vitamin D Profile in National Football League Players. *American Journal of Sports Medicine* 2015, 43(5): 1241–1245.
- Moore RA, Waheed A, Burns B. Rule of Nines. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- Morton JP, Iqbal Z, Drust B, Burgess D, Close GL, Brukner PD. Seasonal variation in vitamin D status in professional soccer players of the English Premier League. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 2012, 37(4): 798–802.
- Mostafa WZ, Hegazy RA. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J Adv Res* 2015, 6(6): 793–804.
- Ogan D, Pritchett K. Vitamin D and the Athlete: Risks, Recommendations, and Benefits. *Nutrients* 2013, 5(6): 1856–1868.

Owens DJ, Allison R, Close GL. Vitamin D and the Athlete: Current Perspectives and New Challenges. *Sports Med* 2018, 48(Suppl 1): 3–16.

Płudowski P, Kos-Kudła B, Walczak M, Fal A, Zozulińska-Ziółkiewicz D, Sieroszewski P, Peregud-Pogorzelski J, Lauterbach R, Targowski T, Lewiński A, Spaczyński R, Wielgoś M, Pinkas J, Jackowska T, Helwich E, Mazur A, Ruchała M, Zygmunt A, Szalecki M, Bossowski A, Czech-Kowalska J, Wójcik M, Pyrżak B, Żmijewski MA, Abramowicz P, Konstantynowicz J, Marcinowska-Suchowierska E, Bleizgys A, Karras SN, Grant WB, Carlberg C, Pilz S, Holick MF, Misiorowski W. Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland. *Nutrients* 2023, 15(3): 695.

Pojednic RM, Ceglia L. The Emerging Biomolecular Role of Vitamin D in Skeletal Muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 2014, 42(2): 76–81.

Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, Tamez H, Zhang D, Bhan I, Karumanchi SA, Powe NR, Thadhani R. Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. *N Engl J Med* 2013, 369(21): 1991–2000.

Rola R, Kowalski K, Bieńkowski T, Studzińska S. Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum. *J Pharm Biomed Anal* 2020, 190: 113529.

Sebestyen VanSickle J, Srivastava T, Garg U, Rezaiekhalth MH, Alon US. Comparing directly measured versus mathematically calculated free serum 25-hydroxy vitamin D level in children. *J Bone Miner Metab* 2020, 38(2): 271–274

Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Markova S, Weyland P, Terrault NA, Stotland N, Bikle D. A Comparison of Measured and Calculated Free 25(OH) Vitamin D Levels in Clinical Populations. *J Clin Endocrinol Metab* 2014, 99(5): 1631–1637.

Shuler FD, Wingate MK, Moore GH, Giangarra C. Sports health benefits of vitamin d. *Sports Health* 2012, 4(6): 496–501.

- Sinotte M, Diorio C, Bérubé S, Pollak M, Brisson J. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2009, 89(2): 634–640.
- Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull Bnf* 2014, 39(4): 322–350.
- Talbot J, Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2016, 5(4): 518–534.
- Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011, 86(1): 50–60.
- Timpini A, Pini L, Tantucci C, Cossi S, Grassi V. Vitamin D and health status in elderly. *Intern Emerg Med* 2011, 6(1): 11–21.
- Tsuprykov O, Buse C, Skoblo R, Hocher B. Comparison of free and total 25-hydroxyvitamin D in normal human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019, 190: 29–36.
- Tsuprykov O, Chen X, Hocher C-F, Skoblo R, Lianghong Yin null, Hocher B. Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018, 180: 87–104.
- Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(10): 3666–3672.
- von Hurst PR, Beck KL. Vitamin D and skeletal muscle function in athletes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014, 17(6): 539–545.
- Willis KS, Smith DT, Broughton KS, Larson-Meyer DE. Vitamin D status and biomarkers of inflammation in runners. *Open Access J Sports Med* 2012, 3: 35–42.
- Wintermeyer E, Ihle C, Ehnert S, Stickler U, Ochs G, de Zwart P, Flesch I, Bahrs C, Nussler AK. Crucial Role of Vitamin D in the Musculoskeletal System. *Nutrients* 2016, 8(6): 319.

Yousefzadeh P, Shapses SA, Wang X. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. *Int J Endocrinol* 2014, 2014: 981581.

Zeng S, Chu C, Doebis C, von Baehr V, Hoche B. Reference values for free 25-hydroxy-vitamin D based on established total 25-hydroxy-vitamin D reference values. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2021, 210: 105877.