

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ  
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

АЛУДВАН МАХМУД БАССАМ

УДК 616.379-008.64-092-07-08:616-056.52:616.36-003.826

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ТА РОЛЬ ВІТАМІНУ D3 В ТЕРАПІЇ  
ПАЦІЄНТІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ ТА  
НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ**

22 «Охорона здоров'я»

222 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ М.Б. Алудван

Науковий керівник: Комісаренко Юлія Ігорівна, доктор медичних наук,  
професор.

Київ – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Алудван М.Б.* Особливості метаболізму та роль вітаміну D<sub>3</sub> в терапії пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу та неалкогольною жирковою хворобою печінки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина. – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, 2021.

Робота присвячена вивченню клініко-експериментальної ефективності застосування препаратів вітаміну D<sub>3</sub> в якості додаткової терапії хворих на цукровий діабет (ЦД) типу 2 та асоційованих з ним неалкогольної жиркової хвороби печінки (НАЖХП).

**Мета дослідження** – підвищити ефективність лікування хворих на ЦД типу 2 та НАЖХП шляхом вивчення патогенетичного взаємозв'язку між метаболічними порушеннями та забезпеченістю організму вітаміном D, наукового обґрунтування і розробки комплексного лікування із застосуванням препаратів вітаміну D<sub>3</sub>.

Для досягнення поставленої мети було проведено клінічну та експериментальну частину. В експериментальній частині використовували білих щурів-самців лінії Wistar вагою  $230 \pm 12$  г. Продемонстровано, що модель експериментального ЦД типу 2, характеризується розвитком інсулінорезистентності (ІР), порушеннями вуглеводного, ліпідного, білкового обміну та інтенсифікацію вільнорадикальних процесів, викликає ушкодження тканини печінки, що відбувається на тлі глибокого дефіциту вітаміну D.

Вперше встановлено, що дефіцит вітаміну D у тварин зумовлюється порушенням у синтезі компонентів вітаміну D<sub>3</sub>-авто-/паракринної системи. За ЦД типу 2 відбувається значне пригнічення рівня експресії матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) вітаміну D-25-гідроксилази (*Cyp27a1*,

*Cyp2r1*), 25ОНD-1 $\alpha$ -гідроксилази (*Cyp27b1*) та рецептору вітаміну D (*Vdr*) у тканині печінки.

Виявлено, що недостатня забезпеченість організму експериментальних тварин вітаміном D<sub>3</sub> за умов ЦД типу 2 супроводжується істотною АФК-залежною індукцією експресії гену найбільш поширеної субодиниці NF- $\kappa$ B *p65* з одночасним зниженням рівня експресії інгібітору ядерного фактору NF- $\kappa$ B – *I $\kappa$ B- $\alpha$*  у тканині печінки, що може вказувати на активування NF- $\kappa$ B-опосередкованої транскрипції генів, продукти яких залучені в ключових подіях запальної відповіді та оксидативного ушкодження біоструктур. Також продемонстровано підвищення у тканині печінки експресії гену прозапального цитокіну *Tnf- $\alpha$* , асоційованого з транскрипційною системою NF- $\kappa$ B, що може бути свідченням розвитку оксидативного стресу, запальних реакцій та негативно позначатись на толерантності тканин організму до інсуліну.

Введення вітаміну D<sub>3</sub> тваринам із експериментальним ЦД типу 2, компенсуючи D-дефіцитний стан, сприяло частковій нормалізації метаболічних процесів, незначному зниженню рівня глікемії, гальмуванню розвитку оксидативного стресу та ІР. Встановлено коригувальну дію вітаміну D<sub>3</sub> на стан вітамін D-авто-/паракринної системи та TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B сигнальний шлях тканини печінки, що реалізується на рівні транскрипційного регулювання експресії ключових генів даних систем. Блокування шляхів активування NF- $\kappa$ B та пригнічення запальних реакцій у печінці підкреслює залежність розвитку оксидативного стресу та запалення від рівня забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> та важливість антиоксидантного та протизапального компоненту в механізмі протидіабетичної та гепатопротекторної дії холекальциферолу.

Клінічна частина дисертаційної роботи проведена в 3 фрагменти на базі Київського міського клінічного ендокринологічного центру (КМКЕЦ). В одномоментному дослідженні проаналізовано дані 109 пацієнтів із ЦД типу 2 без НАЖХП з метою оцінки ІР, функціональної активності  $\beta$ -клітин та

параметрів метаболічного профілю в залежності від забезпеченості організму вітаміном D. Продемонстровано, що пацієнтів із ЦД типу 2 дефіцит вітаміну D асоційований із більш вираженою ІР, ожирінням і неадекватним глікемічним контролем у порівнянні з оптимальним рівнем або його недостатністю. Індекс НОМА2-ІР ( $2,12 \pm 0,71$  проти  $2,25 \pm 0,95$ ,  $p=0,96$ ) та чутливість до інсуліну ( $S \% - 57,11 \pm 32,07$  проти  $54,69 \pm 32,5$ ,  $p=0,96$ ) у групі оптимального рівня D та його недостатності (група 2) були практично ідентичними. При D дефіциті НОМА2-ІР був статистично достовірно вище на 46,2% ( $p=0,004$ ), а чутливість до інсуліну нижче на 27,5% ( $p=0,027$ ). Функціональна активність  $\beta$ -клітин статистично достовірно не відрізнялась між усіма групами незалежно від статусу вітаміну D. Після корекції на індекс маси тіла (ІМТ), вік і стать між концентрацією вітаміну D і HbA1c ( $r = -0,264$ ;  $p=0,047$ ), НОМА2-ІР, С-пептидом ( $r = -0,394$ ;  $p=0,003$ ) та S % ( $r = 0,277$ ;  $p=0,037$ ) встановлено зворотній кореляційний зв'язок лише в групі пацієнтів із D дефіцитом. Регресійний аналіз продемонстрував, що прийом метформіну асоційований з дефіцитом вітаміну D в пацієнтів із ЦД типу 2, незалежно від рівня HbA1c.

В іншому одномоментному дослідженні в аналіз ми включили результати 126 пацієнтів з ЦД типу 2 та асоційованою із ним НАЖХП для оцінки функціонального стану печінки, індексів стеатозу та параметрів метаболічного профілю в залежності від забезпеченості організму пацієнтів вітаміном D. Встановлено, що спостерігається тенденція до підвищення активності трансаміназ паралельно із зниженням рівня вітаміну D. Максимальне значення індексів жирового гепатозу діагностовано у пацієнтів із дефіцитом D, що статистично достовірно відрізнялось від пацієнтів із групи оптимального забезпечення (HSI (hepatic steatosis index) –  $43,34 \pm 6,59$  проти  $39,67 \pm 4,37$ ;  $p=0,032$  та відповідно для FLI (fatty liver index) –  $79,21 \pm 19,61$  проти  $64,96 \pm 17,72$ ;  $p=0,007$ ). Для TyG (triglyceride-glucose) індексу продемонстрована тенденція до його зростання одночасно із погіршенням D статусу ( $p=0,175$ ). В субаналізі встановлено, що виражений D дефіцит ( $<10$ нг/мл) характеризується статистично значущо вищими показниками обох

індексів жирового гепатозу, антропометричними параметрами та активністю трансаміназ в порівнянні із показниками пацієнтів із рівнем D в діапазоні від 10-20нг/мл.

В одновимірному аналізі Пірсона в групі недостатності D статистично достовірний кореляційний взаємозв'язок виявлено лише для ЛПНЩ ( $r=-0,479$ ;  $p=0,038$ ), який втратив достовірний характер після поправки на ІМТ, вік і стать ( $r=-0,440$ ;  $p=0,052$ ). В групі D дефіциту, після корекції на ІМТ, вік і стать статистично значущий здебільшого слабкий, кореляційний зв'язок встановлено між рівнем вітаміну D та об'ємом талії ( $r=-0,342$ ;  $p=0,004$ ), аспартатамінотрансферазою (АСТ) ( $r=-0,285$ ;  $p=0,018$ ),  $\gamma$ -глутамілтранспептидази ( $\gamma$ -ГТ) ( $r=-0,243$ ;  $p=0,044$ ), TuG індексом ( $r=-0,294$ ;  $p=0,014$ ) та FLI ( $r=-0,255$ ;  $p=0,036$ ) відповідно. Використовуючи покроковий множинний логістичний регресійний аналіз, вперше продемонстровано, що незалежно від активності трансаміназ HSI ( $R^2$  Нейджелкерк =0,215), а також FLI ( $R^2$  Нейджелкерк =0,163) були асоційовані з дефіцитом вітаміну D.

На 3 етапі оцінювалась терапевтична ефективність препаратів вітаміну D<sub>3</sub> в якості додатку до стандартної антидіабетичної терапії. Для цього було проведено проспективне когортне дослідження, в яке включили 72 пацієнти із ЦД типу 2 та асоційованою НАЖХП з встановленим D-дефіцитом. Пацієнти були рівномірно розподілені на 2 групи. Хворі групи порівняння (n=36) отримували традиційну терапію, яка включала залежно від індивідуальних потреб відповідне дієтичне харчування, цукрознижувальні засоби (препарати сульфанілсечовини, бігуаніди, інсулін). Пацієнти основної групи (n=36) додатково отримували препарати вітаміну D<sub>3</sub>, який призначали на тлі традиційної терапії у дозі 4000 МО/добу терміном на 6 місяців. Добову дозу та тривалість курсу обирали згідно алгоритму розробленого в докторській дисертаційній роботі проф. Комісаренко Ю.І.

Антропометричні параметри статистично значущо в динаміці лікування не змінились у пацієнтів обох обстежуваних груп.

Використання вітаміну D<sub>3</sub> було асоційоване з статистично значущим зниженням глікемії натще через 6 місяців лікування від 11,75±3,60 до 10,26±3,31 ммоль/л (p=0,041). Рівень HbA<sub>1c</sub>, у основній групі пацієнтів в середньому знизився на 0,43 % (p=0,109) через 3 місяці, та залишився практично на такому ж рівні і через 6 місяців – 0,50 (-0,08; 1,07; p=0,092). В обох часових інтервалах зміни були статистично не значущими в порівнянні із вихідним рівнем. Паралельно із покращенням параметрів глікемічного контролю у пацієнтів основної групи, спостерігалась тенденція до зниження індексу НОМА-2IR на 0,31 (-0,13; 0,76; p=0,191) та покращення чутливості до інсуліну (S %) на 1,65 (-9,88; 6,47; p=0,697) в порівнянні із показниками вихідного рівня.

Аналіз змін ліпідних параметрів продемонстрував, що статистично значущо під впливом лікування препаратами вітаміну D<sub>3</sub> змінився лише рівень ТГ (1,97±1,03 проти 1,60±0,88 ммоль/л, p=0,013).

Активність трансаміназ як один із основних лабораторних параметрів, що характеризує функціональну активність та запально-некротичні зміни в тканині печінки статистично значущо не змінились, проте варто відзначити, що в дане дослідження включались пацієнти, в основному, із неалкогольним стеатозом печінки (НАСП).

У внутрішньогруповому аналізі, встановлено, що використання вітаміну D<sub>3</sub> асоційоване із зниженням індексів стеатозу: FLI та TuG індексу. Базове значення для FLI склало 73,21±20,82 та для TuG - 5,13±0,32, а після 6-ти місячного курсу лікування вітаміном D<sub>3</sub> знизилось відповідно до 69,91±21,27 (p=0,023) та 5,00±0,28 (p=0,024).

Підсумовуючи результати отримані в ході дослідження, встановлено тенденційне покращення основних метаболічних параметрів в групі порівняння через 3 місяці з наступним вираженим погіршенням через 6 місяців. Встановлену закономірність частково можна пояснити сезонністю включення пацієнтів в дослідження. Основний етап набору в дослідження тривав в пізній весняний та початок літнього періоду, з максимальною

інсоляцією характерною для даних широт, а більшість пацієнтів завершили участь в дослідженні в зимовий період. Оскільки вони не отримували замісної терапії препаратами вітаміну D<sub>3</sub> та на фоні сезонного браку сонячного випромінювання, в них відмічалось прогресування D-дефіциту.

В пацієнтів основної групи на фоні замісної терапії спостерігалось статистично значуще зростання концентрації вітаміну D в сироватці крові, з досягненням оптимального забезпечення організму вітаміном у понад 60 % пацієнтів. Все вище зазначене, обумовлює доцільність використання препаратів вітаміну D<sub>3</sub> у пацієнтів із його дефіцитом в дозі 4000 МО/доба на курс не менше 6 місяців з метою покращення параметрів глікемічного контролю та метаболічного профілю у хворих на ЦД типу 2 з НАЖХП.

Встановлені фундаментальні дослідження можуть слугувати теоретичною основою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо застосування вітаміну D<sub>3</sub> в комплексній терапії, асоційованої з ЦД 2 типу і НАЖХП, що супроводжується порушенням метаболізму вітаміну D. Використання розроблених профілактично-лікувальних схем в дисертаційній роботі дозволить покращити терапію ЦД типу 2 та/або НАЖХП з застосуванням підходу в галузі персоналізованої медицини при розробці індивідуальної схеми лікування кожного пацієнта. Результати дисертаційного дослідження можуть використовуватись у загальній лікарській практиці ендокринологами, кардіологами, сімейними лікарями, терапевтами.

Результати дослідження впроваджено у клінічну практику Київського міського клінічного ендокринологічного центру та використовуються у лекційному курсі для студентів медичних факультетів, лікарів-інтернів, практичних лікарів та під час практичних занять на кафедрах ендокринології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України.

**Ключові слова:** цукровий діабет типу 2, ожиріння, інсулінорезистентність, неалкогольна жирова хвороба печінки, вітамін D<sub>3</sub>, D дефіцит.

## SUMMARY

*Aludwan M.B.* Features of metabolism and the role of vitamin D3 in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 222 Medicine. - O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2021.

The work is devoted to the study of clinical and experimental substantiation of the effectiveness of vitamin D3 preparations as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes mellitus (DM) and associated non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

**The aim** increase the effectiveness of treatment in patients with type 2 diabetes and NAFLD by studying the pathogenetic relationship between metabolic disorders and the body's supply of vitamin D, scientific substantiation and development of comprehensive treatment with vitamin D3.

To achieve this goal, a clinical and experimental part was developed. In the experimental part, white male Wistar rats weighing  $230 \pm 12$  g were used, which occurs against the background of a deep deficiency of vitamin D3.

For the first time it was found that vitamin D3 deficiency in animals is caused by a violation in the synthesis of vitamin D3 components of the auto- / paracrine system. Type 2 diabetes significantly inhibits the expression of vitamin D-25-hydroxylase (Cyp27a1, Cyp2r1), 25OHD-1 $\alpha$ -hydroxylase (Cyp27b1) and vitamin D receptor (Vdr) mRNA in the liver tissue.

It was found that the insufficient of vitamin D3 in experimental animals under type 2 diabetes is accompanied by significant ROS-dependent induction of gene expression of the most common subunit of NF- $\kappa$ B p65 with a simultaneous decrease in the expression of nuclear factor inhibitor NF- $\kappa$ B - I $\kappa$ B- $\alpha$  in the tissue may indicate activation of NF- $\kappa$ B-mediated transcription of genes whose products are involved in



key events of the inflammatory response and oxidative damage to biostructures. An increase in liver tissue expression of the proinflammatory cytokine Tnf- $\alpha$  gene associated with the NF- $\kappa$ B transcription system has also been demonstrated, which may indicate the development of oxidative stress, inflammatory reactions and adversely affect insulin tolerance.

Administration of vitamin D3 to animals with experimental type 2 diabetes, compensating for D-deficiency, contributed to the partial normalization of metabolic processes, a slight decrease in glycemia, inhibition of oxidative stress and IR. The corrective effect of vitamin D3 on the state of vitamin D of the auto- / paracrine system and TNF- $\alpha$  / NF- $\kappa$ B signaling pathway of liver tissue, which is realized at the level of transcriptional regulation of the expression of key genes of these systems, has been established. Blocking the activation of NF- $\kappa$ B and suppression of inflammatory reactions in the liver emphasizes the dependence of oxidative stress and inflammation on the level of vitamin D3 and the importance of antioxidant and anti-inflammatory components in the mechanism of antidiabetic and hepatoprotective action of cholecalciferol.

In patients with type 2 diabetes, vitamin D3 deficiency has been shown to be associated with more severe IR, obesity, and inadequate glycemic control compared to optimal levels or deficiencies. HOMA2-IR index ( $2.12 \pm 0.71$  vs.  $2.25 \pm 0.95$ ,  $p = 0.963$ ) and insulin sensitivity (S% -  $57.11 \pm 32.07$  vs.  $54.69 \pm 32.5$ ,  $p = 0.965$ ) in the group of optimal level of D3 and its insufficiency (group 2) were almost identical. With D3 deficiency, HOMA2-IR was statistically significantly higher by 46.2% ( $p = 0.004$ ), and insulin sensitivity was lower by 27.5% ( $p = 0.027$ ). The functional activity of  $\beta$ -cells did not change statistically significantly between all groups, regardless of the status of vitamin D3. After correction for BMI, age and sex between vitamin D3 and HbA1c concentration ( $r = -0.264$ ;  $p = 0.047$ ), HOMA2-IR, C-peptide ( $r = -0.394$ ;  $p = 0.003$ ) and S% ( $r = 0.277$ ;  $p = 0.037$ ) an inverse correlation was found only in the group of patients with D3 deficiency. Regression analysis showed that metformin was associated with vitamin D3 deficiency in patients with type 2 diabetes, regardless of HbA1c levels.

In patients with type 2 diabetes and concomitant NAFLD, there is a tendency to increase the activity of transaminases in parallel with a decrease in vitamin D3. The maximum value of fatty hepatitis indices was diagnosed in patients with D3 deficiency, which was statistically significantly different from patients in the optimal provision group (HSI -  $43.34 \pm 6.59$  vs.  $39.67 \pm 4.37$ ;  $p = 0.032$  and, respectively, for FLI -  $79, 21 \pm 19.61$  vs.  $64.96 \pm 17.72$ ;  $p = 0.007$ ). For the TyG index, a tendency to its growth was demonstrated simultaneously with the deterioration of D3 status ( $p = 0.175$ ). Subanalysis showed that severe D3 deficiency ( $<10$  ng / ml) is characterized by statistically significantly higher rates of fatty hepatitis, anthropometric parameters and transaminase activity compared with patients with D3 levels in the range of 10-20 ng / ml.

In a one-dimensional Pearson analysis in the D3 deficiency group, a statistically significant correlation was found only for LDL ( $r = -0.479$ ;  $p = 0.038$ ), which lost its reliability after adjusting for BMI, age, and sex ( $r = -0.440$ ;  $p = 0.052$ ). In the D3 deficiency group, after correction for BMI, age and sex are predictors that may affect D3 status, a statistically significant mostly weak, correlation was found between vitamin D3 levels and waist circumference ( $r = -0.342$ ;  $p = 0.004$ ), AST ( $r = -0.285$ ;  $p = 0.018$ ), GGT ( $r = -0.243$ ;  $p = 0.044$ ), TyG index ( $r = -0.294$ ;  $p = 0.014$ ) and FLI ( $r = -0.255$ ;  $p = 0.036$ ) respectively. Using step-by-step multiple logistic regression analysis, it was demonstrated for the first time that, regardless of transaminase activity, HSI ( $R^2$  Nigelkerk = 0.215) and FLI ( $R^2$  Nigelkerk = 0.163) were associated with vitamin D3 deficiency.

To study the effectiveness of vitamin D3, we treated a total of 72 patients with NAFLD and type 2 diabetes on the background of established D3 deficiency, which were evenly divided into 2 groups. Patients in the comparison group ( $n = 36$ ) received only traditional antidiabetic therapy, and the main group ( $n = 36$ ) additionally received vitamin D3 ("D-cap"), which was prescribed at a dose of 4000 IU / day for 6 months. Anthropometric parameters were not statistically significant in the dynamics of treatment in patients of both study groups.

Vitamin D3 use was associated with a statistically significant reduction in fasting blood glucose after 6 months of treatment from  $11.75 \pm 3.60$  to  $10.26 \pm 3.31$  ( $p = 0.041$ ). The level of HbA1c in the main group of patients decreased on average by 0.43% ( $p = 0.109$ ) after 3 months, and remained almost at the same level after 6 months - 0.50 (-0.08; 1.07;  $p = 0.092$ ). In both time intervals, the changes were statistically insignificant compared to baseline. In parallel with the improvement of glycemic control parameters in patients of the main group, there was a tendency to decrease the HOMA-2IR index by 0.31 (-0.13; 0.76;  $p = 0.191$ ) and improve insulin sensitivity (S%) by 1.65 (-9.88; 6.47;  $p = 0.697$ ) compared to baseline.

Analysis of changes in lipid parameters showed that statistically significantly under the influence of treatment with vitamin D3 changed only the level of TG ( $1.97 \pm 1.03$  vs.  $1.60 \pm 0.88$  mmol / l,  $p = 0.013$ ).

Transaminase activity as one of the main laboratory parameters characterizing functional activity and inflammatory-necrotic changes in liver tissue did not change statistically significantly, but it should be noted that this study included patients mainly from NASP.

In the intragroup analysis, it was found that the use of vitamin D3 is associated with a decrease in steatosis indices: FLI and TyG index. The baseline value for FLI was  $73.21 \pm 20.82$  and for TyG -  $5.13 \pm 0.32$ , and after a 6-month course of vitamin D3 treatment decreased to  $69.91 \pm 21.27$  ( $p = 0.023$ ) and  $5.00 \pm 0.28$  ( $p = 0.024$ ).

Summarizing the results obtained during the study, a tendency to improve the main metabolic parameters in the comparison group after 3 months, followed by a pronounced deterioration after 6 months. The established pattern can be partly explained by the seasonality of the inclusion of patients in the study. The main recruitment phase of the study lasted in late spring and early summer, with maximum insolation characteristic of these latitudes, and most patients completed the study in the winter. As they did not receive vitamin D3 replacement therapy and against the background of seasonal lack of sunlight, they showed progression of D3 deficiency.

In patients of the main group on the background of replacement therapy there was a progressive statistically significant increase in the concentration of vitamin

D3 in the serum, with the achievement of optimal provision of the body with vitamin in over 60% of patients. All of the above determines the feasibility of using vitamin D3 in patients with its deficiency at a dose of 4000 IU / day for a course of at least 6 months to improve glycemic control and metabolic profile in patients with type 2 diabetes with NAFLD.

Established basic research can serve as a theoretical basis for scientifically sound practical recommendations for the use of vitamin D3 in combination therapy associated with type 2 diabetes and NAFLD, accompanied by impaired metabolism of vitamin D. The use of developed treatment regimens in the dissertation will improve type 2 and / or NAFLD using an approach in the field of personalized medicine in the development of an individual treatment regimen for each patient. The results of the dissertation research can be used in general medical practice by endocrinologists, cardiologists, family doctors, therapists.

The results of the study are implemented in the clinical practice of the Kyiv City Clinical Endocrinology Center and are used in the lecture course for students of medical faculties, interns, general practitioners and during practical classes at the departments of endocrinology of the National Medical University O.O. Bogomolets of the Ministry of Health of Ukraine.

Key words: type 2 diabetes mellitus, obesity, insulin resistance, nonalcoholic fatty liver disease, vitamin D<sub>3</sub>, D<sub>3</sub> deficiency.

### **Список публікацій здобувача:**

*Статті у іноземних виданнях, що цитуються у науково-метричних Scopus та Web of science*

1. Aludwan M, Kobyliak N, Abenavoli L, Kononenko L, Shuliarenko L, Kyriienko D, Komisarenko I (2020) Hepatic steatosis indices as predictors of vitamin D 3 deficiency in patients with NAFLD associated with type 2 diabetes. *Clinical Diabetology*, 9(5), 313-320 <https://doi.org/10.5603/DK.2020.0036>

*(Дисертантом проведено відбір, загально-клінічне обстеження, збір біохімічних показників, статистична обробка даних, аналіз літератури з даної проблеми, написання та підготовка статті до друку, узагальнення результатів).*

2. Aludwan M, Kobylak N, Abenavoli L, Kyriienko D, Fagoonee S, Pellicano R, Komisarenko I (2020) Vitamin D3 deficiency is associated with more severe insulin resistance and metformin use in patients with type 2 diabetes. *Minerva Endocrinologica*, 45(3), 172-180, doi: 10.23736/S0391-1977.20.03161-2.

*(Дисертантом проведено відбір, загально-клінічне обстеження, збір біохімічних показників, статистична обробка даних, аналіз літератури з даної проблеми, написання та підготовка статті до друку, узагальнення результатів).*

#### *Статті у наукових фахових виданнях України*

3. Алудван МБ, Кобиляк НМ, Комісаренко ЮІ (2019) Вплив статусу D3 на основні клініко-лабораторні показники пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*, 4(68), 37-47, doi.org/10.30978/CEES-2019-4-37. *(Дисертантом проведено відбір, збір біохімічних показників, статистична обробка даних, аналіз літератури з даної проблеми, написання та підготовка статті до друку).*

4. Алудван МБ, Кобиляк НМ, Комісаренко ЮІ (2019) Метаболічні предиктори та дефіцит D3 у пацієнтів із цукровим діабетом типу 2. *Міжнародний ендокринологічний журнал* 6(15), 459-468, doi: 10.22141/2224-0721.15.6.2019.185408. *(Дисертантом проведено відбір, збір біохімічних показників, статистична обробка даних, аналіз літератури з даної проблеми, написання та підготовка статті до друку)*

5. Удван М, Кобиляк НМ, Комісаренко ЮІ (2018) Рівень вітаміну D<sub>3</sub> у хворих на цукровий діабет типу 2 в залежності від наявності неалкогольної жирової хвороби печінки. *Український науково-медичний молодіжний*

журнал 3-4(108), 29-33. (Дисертантом проведено відбір, збір біохімічних показників, статистична обробка даних, аналіз літератури з даної проблеми, написання та підготовка статті до друку).

*Тези наукових доповідей*

6. Mahmoud U, Kobyliak N, Komisarenko I (2019) Vitamin D3 deficiency is associated with more severe insulin resistance and metabolic profile in patients with type 2 diabetes. 21<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology, May 18-21, 2019, Lyon, France. Endocrine Abstracts, 63, GP125. doi: 10.1530/endoabs.63.GP125.

7. Aloudwan M, Kobyliak N, Komissarenko I (2019) The level of vitamin D3 in patients with type 2 diabetes, depending on the presence of non-alcoholic fatty liver disease. European workshop on NASH in clinical practice, November 22-23, 2019, Barcelona, Spain. P. 28.

8. Aloudwan M (2019) Vitamin D3 deficiency, metformin use and severe metabolic profile: are the relation causality between parameters in patient with type 2 diabetes? IX з'їзд ендокринологів України, що присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», 19-22 лист., 2019р, Харків, Україна. – Проблеми ендокринної патології, спеціальний випуск, С. 133-134.

9. Mahmoud U, Kobyliak N, Kyriienko D, Komisarenko I (2020) Hepatic steatosis indices as a predictors of vitamin D3 deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes. 22<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology, Sep 5-9, 2020. Endocrine Abstracts, 70; AEP437. doi: 10.1530/endoabs.70.AEP437.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	17
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1 Метаболізм та фізіологічна роль вітаміну D <sub>3</sub> .....	27
1.2 Пандемія дефіциту вітаміну D: асоційовані захворювання.....	30
1.3 Недостатність вітаміну D та ризик розвитку ожиріння і цукрового діабету.....	36
1.4 Взаємозв'язок неалкогольної жирової хвороби печінки та дефіциту вітаміну D.....	40
1.5 Застосування вітаміну D <sub>3</sub> у пацієнтів з цукровим діабетом типу 2 та неалкогольною жировою хворобою печінки.....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	49
2.1 Моделювання експериментального цукрового діабету типу 2 у щурів .....	49
2.2 Тестування толерантності до інсуліну .....	50
2.3 Виділення первинних гепатоцитів .....	50
2.4 Визначення рівня утворення активних форм кисню (АФК) у первинних гепатоцитах.....	52
2.5 Визначення біохімічних показників сироватки крові .....	52
2.6 Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).....	53
2.7 Клінічна характеристика хворих.....	54
2.8 Методологічна характеристика клінічних досліджень.....	57
2.9 Статична обробка отриманих результатів.....	63
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ПАТОГЕНЕТИЧНИХ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ МІЖ D ДЕФІЦИТОМ І РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТИПУ 2 ТА НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ .....	65

3.1 Моделювання експериментального цукрового діабету типу 2 у щурів та дослідження впливу вітаміну D <sub>3</sub> на асоційовані із ним метаболічні порушення.....	65
3.2 NF-κB-асоційовані прооксидантні і прозапальні процеси у печінці за цукрового діабету типу 2 та при введенні вітаміну D <sub>3</sub> .....	72
3.3 Дослідження стану вітамін D-авто-/паракринної системи печінки за експериментального цукрового діабету типу 2 та при введенні вітаміну D <sub>3</sub> .....	79
РОЗДІЛ 4. D ДЕФІЦИТ ТА ЗМІНИ МЕТАБОЛІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ТИПУ 2 ТА НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ.....	87
4.1 Вивчення впливу D статусу на формування метаболічних порушень у пацієнтів із цукровим діабетом типу 2.....	87
4.2 Вивчення впливу D статусу на формування метаболічних порушень у пацієнтів із цукровим діабетом типу 2 та супутньою неалкогольною жирковою хворобою печінки.....	97
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА КЛІНІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАМІСНОЇ ТЕРАПІЇ ВІТАМІНОМ D <sub>3</sub> У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ТИПУ 2 ТА СУПУТНЬОЮ НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ D.....	115
АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	133
ВИСНОВКИ.....	148
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	150
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	151



### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.

АЛТ	аланін-амінотрансфераза	ALT	alanine aminotransferase
АСТ	аспартатамінотрансфераза	AST	aspartate aminotransferase
ВООЗ	Всесвітня організація охорони здоров'я	WHO	World Health Organization
ГГТ	гамма-глутамілтрансфераза	GGT	gamma-glutamyltransferase
ДІ	довірчий інтервал	CI	confidence interval
ЗХС	загальний холестерин	TCh	Total cholesterol
ІМТ	індекс маси тіла	BMI	body mass index
ІР	інсулінорезистентність	IR	insulin resistance
ЛПВЩ	Ліпопротеїни високої щільності	HDL	high density lipoproteins
ЛПНЩ	ліпопротеїни низької щільності	LDL	low density lipoproteins
ЛПДНЩ	ліпопротеїни дуже низької щільності	VLDL	Very low density lipoproteins
мРНК	матрична рибонуклеїнова кислота	mRNA	matrix ribonucleic acid
НАЖХП	неалкогольна жирова хвороба печінки	NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
НАСГ	стеатогепатит	NASH	steatohepatitis
НАСП	неалкогольний стеатоз	NAS	non-alcoholic steatosis
ОТ	об'єм талії	WC	waist circumference
ПТГ	паратиреоїдний гормон	PTH	parathyroid hormone
ФП	фіброз печінки	LF	liver fibrosis
ЦД	цукровий діабет	DM	diabetes mellitus
ЦП	цироз печінки	LC	Liver cirrhosis
1,25- (ОН) 2-D	1,25-дигідрокси-вітамін D (кальцитріол)	,25- (ОН) 2-D	1,25-dihydroxy-vitamin D (calcitriol)

25(OH)D	25-гідрокси-вітамін D	25-(OH) D	25-dihydroxy- vitamin D
СК18-М30	цитокератин людини 18- М30	СК18-М30	is human cytokeratin 18-M30
СУР27В1	1-альфагідроксилаза	СУР27В1	1-alpha- hydroxylase
	жировий індекс печінки	FLI	fatty index of the liver
	рівень глікемії плазми венозної крові натще	FPG	Fasting glucose plasma venous blood
	глікований гемоглобін	HbA1c	Glycated hemoglobin
	індекс інсулінорезистентності	HOMA-IR	index of insulin resistance
	протеїнкінази, що активуються мітогенами	МАРК	mitogen-activated protein kinases
	ядерний транскрипційний фактор «каппа-В»	NF-κB	nuclear transcription factor "kappa-B"
	остеопротегерін	OPG	osteoprotegerin
РЗНР	кінцевий пропептид проколаген III	NTPP III	N-terminal propeptide procollagen III
	δ-рецептори, що активуються пероксисомним проліфератором	PPAR-δ	δ-receptors activated by peroxisome proliferator
	рецепторний активатор ліганда ядерного фактора каппа-В	RANKL	a receptor activator of the kappa-B nuclear factor ligand

	ретиноєвий X рецептор	RXR	retinoid X receptor
	стрептозотоцин-індукований ЦД	STZ	streptozotocin-induced diabetes
	фактор некрозу пухлин $\alpha$	TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
	вітамін D-зв'язуючий білок	VDBP	vitamin D-binding protein
	рецептор до гормонально активних форм вітаміну D	VDR	receptor for hormonally active forms of vitamin D.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Дефіцит вітаміну D був визнаний пандемією з багатьма негативними наслідками для здоров'я у багатьох країнах світу [1–5]. Останнім часом гіповітаміноз D вважається одним з факторів ризику розвитку ЦД типу 2 і метаболічного синдрому, що сприяє збільшенню IP і зниженню секреції інсуліну [6, 7]. Відкриття рецепторів до гормонально активних форм вітаміну D<sub>3</sub> (VDR) та їх синтезу у клітинах «нетрадиційних» для цього вітаміну органів і тканин передбачає ширший спектр фізіологічних ефектів вітаміну [8, 9]. На сьогодні відомо декілька механізмів впливу вітаміну D<sub>3</sub> на ендокринну частину підшлункової залози, включаючи пряму стимуляцію секреції інсуліну шляхом активації VDR в β-клітинах [10]. Внаслідок іншого спостерігається локальна активація вітаміну D<sub>3</sub> з допомогою ферменту 1α-гідроксилази, що призводить до внутрішньоклітинної регуляції кальцію та відповідно підвищує секрецію інсуліну [11, 12]. Також активна форма вітаміну D<sub>3</sub> здатна безпосередньо впливати на транскрипцію гена інсуліну [12].

Встановлено, що шляхом регуляції концентрації позаклітинного кальцію, наявності VDR в скелетних м'язах та активації δ-рецепторів, що активуються пероксисомним проліфератором (PPAR-δ) - фактора транскрипції, який бере участь в метаболізмі жирних кислот в жировій тканині і скелетних м'язах [13], вітамін D<sub>3</sub> може покращувати чутливість периферичних тканин до інсуліну [14–16]. Крім того, вітамін D<sub>3</sub> може знижувати концентрацію апоптотичного фрагмента M30 цитокератину 18, який є відомим маркером ураження печінки [17]. Отже, вітамін D<sub>3</sub> бере активну участь як в секреції інсуліну так і IP, а саме у двох основних ланках патогенезу ЦД типу 2. З огляду на ключову роль запалення в розвитку структурно-функціональних змін в тканинах печінки при ЦД типу 2 [18] і той факт, що компоненти системи OPG (остеопротегерін) / RANKL (ліганд рецептора активатора ядерного фактора транскрипції NF-κB)/ RANK (рецептор активатора ядерного фактора транскрипції NF-κB) експресуються в

макрофагах і впливають на запальні реакції, можна припустити, що зміни рівнів OPG і RANKL при ЦД типу 2 могли б відображати характер модулювання NF- $\kappa$ B- опосередкованих запальних процесів у печінці.

Отже, на сьогодні механізми протизапального і гепатопротекторного дії вітаміну D<sub>3</sub> (холекальциферолу) і в цілому наукове обґрунтування можливості його ефективного застосування в клініці ЦД типу 2 активно вивчається в науковій літературі [6, 8, 17, 19–27]. Також залишаються недостатньо розробленими підходи і показання до комплексного лікування вітамін D<sub>3</sub>-дефіцитних станів у пацієнтів, які страждають НАЖХП і ЦД типу 2. Дані літератури суперечливі, більшість досліджень стверджують про ефективність лікування вітаміном D<sub>3</sub> пацієнтів даної когорти [8, 23, 28–30], а інші доводять його не ефективність [31–33] і навіть токсичність прийому [34–38].

Зазначене, обумовлює необхідність глибокого і всебічного вивчення важливої наукової проблеми, яка полягає в необхідності експериментального обґрунтування ефективності застосування вітаміну D<sub>3</sub> для профілактики і корекції метаболічних порушень і структурно-функціональних змін у печінці при ЦД типу 2 з асоційованою із ним НАЖХП.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась у рамках планової НДР кафедри ендокринології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України «Розробка патогенетичних методів профілактики та лікування цукрового діабету типу 2 та асоційованих з ним ожиріння і неалкогольної жирової хвороби печінки» (2016-2019 рр.), номер державної реєстрації 0116U000124.

**Мета дослідження** – підвищити ефективність лікування хворих на ЦД типу 2 та НАЖХП шляхом вивчення патогенетичного взаємозв'язку між метаболічними порушеннями та забезпеченістю організму вітаміном D, наукового обґрунтування і розробки комплексного лікування із застосуванням препаратів вітаміну D<sub>3</sub>.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Проаналізувати порушення вуглеводного обміну, стан вітамін D-авто-/паракринної системи та прозапального сигнального шляху TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B тканини печінки в експериментальних тварин із ЦД типу 2.

2. Дослідити вплив вітаміну D<sub>3</sub> на параметри глікемії, IP, маркери оксидативного стресу та експресію генів прозапальних цитокінів в печінці у тварин з експериментальним ЦД типу 2.

3. Оцінити інсулінорезистентність, функціональну активність  $\beta$ -клітин та параметри метаболічного профілю у пацієнтів з ЦД типу 2 без НАЖХП в залежності від забезпеченості організму пацієнтів вітаміном D<sub>3</sub>.

4. Вивчення змін функціонального стану печінки, індексів стеатозу та параметри метаболічного профілю у пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП в залежності від забезпеченості організму пацієнтів вітаміном D<sub>3</sub>.

5. Обґрунтувати ефективність використання препаратів вітаміну D<sub>3</sub> в якості додатку до стандартної антидіабетичної терапії на основні метаболічні параметри у пацієнтів на ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП за умов D дефіциту.

*Об'єкт дослідження:* ЦД типу 2, НАЖХП та ожиріння.

*Предмет дослідження:* клінічні, інструментальні, лабораторні, біохімічні та імунологічні показники у експериментальних тварин та пацієнтів із ЦД типу 2 та асоційованими захворюваннями перед початком і після застосування терапії вітаміном D<sub>3</sub>.

**Методи дослідження.** У лабораторних тварин – тестування толерантності до інсуліну, виділення первинних гепатоцитів, визначення біохімічних показників сироватки крові (глюкоза, загальні ліпіди, триацилгліцероли, загальний холестерин, вільні жирні кислоти, загальний протеїн, альбумін, АЛТ, АСТ), проведено ПЛР з визначенням експресії NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ b, Tnfa, Cyp27a1, Cyp2r1, Cyp27b1, Vdr, Gapdh.

У хворих на ЦД типу 2 та НАЖХП залежно від забезпеченості організму пацієнтів вітаміном D<sub>3</sub> – загально-клінічне обстеження (анамнез, фізичне обстеження); антропометричні дані (зріст, маса тіла, з розрахунком ІМТ); біохімічне дослідження крові (визначення концентрації загального

білірубіну, лужної фосфатази, ліпази, амілази, індексів жирового гепатозу, активності амінотрансфераз); ліпідограми, концентрації 25(OH) вітаміну D<sub>3</sub> та показників вуглеводного обміну (глюкоза крові, HbA<sub>1c</sub>, C-пептид, інсулін, оцінка IP та функціональної активності β-клітин за формулами НОМА-IR та НОМА-2IR); статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше встановлено, що дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> у тварин зумовлюється порушенням у синтезі компонентів вітамін D<sub>3</sub>-авто-/паракринної системи. За ЦД типу 2 відбувається значне пригнічення рівня експресії мРНК вітамін D-25-гідроксилази (*Cyp27a1*, *Cyp27b1*), 25ОНD-1α-гідроксилази (*Cyp27b1*) та рецептору вітаміну D (*Vdr*) у тканині печінки.

У регресійному аналізі вперше виявлено, що прийом метформіну асоційований з дефіцитом вітаміну D в пацієнтів із ЦД типу 2, незалежно від рівня HbA<sub>1c</sub> (OR 5,191; 95% CI 0,966-27,903).

У пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП встановлено, що виражений D дефіцит (<10нг/мл) характеризується статистично значущо вищими показниками індексів жирового гепатозу, антропометричними параметрами (ІМТ, ОТ) та активністю трансаміназ в порівнянні із показниками пацієнтів із рівнем D в діапазоні від 10-20нг/мл. Використовуючи покроковий множинний логістичний регресійний аналіз, вперше продемонстровано, що незалежно від активності трансаміназ HSI (R<sup>2</sup> Нейджелкерк =0,215), а також FLI (R<sup>2</sup> Нейджелкерк =0,163) були асоційовані з дефіцитом вітаміну D.

**Практичне значення одержаних результатів.** Доведено необхідність проведення скринінгу пацієнтів із поєднанням ЦД типу 2 та НАЖХП з метою визначення ступеня забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> з урахуванням таких чинників: віку, статі, тривалості захворювання, антропометричних даних та сезонності.

Встановлено, що додаткова, до стандартної антидіабетичної, замісна медикаментозна терапія препаратами вітаміну D<sub>3</sub> в дозі 4000 МО/доба на курс не менше 6 місяців, асоційована з поліпшенням метаболічних показників,

параметрів функціонального стану печінки та індексів стеатозу у пацієнтів з ЦД типу 2 та НАЖХП за умов вихідного D дефіциту.

Результати дослідження можуть використовуватись у загальній лікарській практиці ендокринологами, кардіологами, сімейними лікарями, терапевтами.

**Впровадження результатів роботи у практику.** Результати дослідження впроваджено у клінічну практику Київського міського клінічного ендокринологічного центру та використовуються у лекційному курсі для студентів медичних факультетів, лікарів-інтернів, практичних лікарів та під час практичних занять на кафедрі ендокринології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України.

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто обґрунтовані актуальність даного дослідження, проведено патентний пошук, здійснено аналіз наукової літератури, визначено його обсяг та напрямок, сформовано мету, завдання, матеріал і методи, необхідні для здійснення дослідження, а також виконано підбір тематичних хворих за допомогою клініко-лабораторних і інструментальних методів дослідження. Обґрунтування методів лікування виконано автором самостійно. Автор брав участь у забиранні матеріалу, проведенні біохімічних досліджень, самостійно опрацював та інтерпретував результати, здійснював розрахунки показників, оцінював результати обстеження, вносив дані до індивідуальних карт хворих і комп'ютерної бази даних, проводив статистичну обробку отриманих даних.

Автором особисто здійснено аналіз та узагальнення результатів дослідження, написано всі розділи дисертації, сформульовано висновки, оформлено дисертацію. Концепція дисертації та практичні рекомендації здійснені за участю наукового керівника д.м.н., проф. Ю.І. Комісаренко.

Розробка схеми експериментальних досліджень та моделювання у щурів діабету відбувалось в Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ (директор Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, академік НАН України і НАМН



України., Комісаренко Сергій Васильович, завідувач відділу біохімії вітамінів і коензимів д.мед.н., проф. Великий М.М).

Дисертант висловлює подяку за співпрацю лікарям Київського міського клінічного ендокринологічного центру, співробітникам лабораторії медичної біохімії (зав. лабораторією, д.б.н., проф. М.М. Великий) Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та особисто с.н.с., к.б.н. І.О. Шиманському.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації оприлюднено та обговорено на: 21-му Європейському конгресі з ендокринології (European Congress of Endocrinology) (Ліон, Франція, 2019), постерна доповідь; 22-му Європейському конгресі з ендокринології (European Congress of Endocrinology) (Прага, Чехія, дистанційно 2020), постерна доповідь; ІХ з'їзд ендокринологів України, що присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» (Харків, Україна, 2019), постерна доповідь; монотематичній конференції «European workshop on NASH in clinical practice» (Барселона, Іспанія, 2019), постерна доповідь.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових робіт, що відображають основний зміст дисертаційної роботи: 4 тез у матеріалах міжнародних та всеукраїнських конгресів, конференцій, з'їздів (з них 1 опубліковані у фахових періодичних виданнях) та 5 статтях:

- з них 3 у фахових періодичних наукових виданнях, затверджених МОН України
- з них 2 статей у виданнях, проіндексованих у Scopus та/або Web of Science Core Collection та віднесені до третього - четвертого кuartилів (Q3 – Q4) відповідно до класифікації SC Imago Journal and Country Rank.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків,

списку використаних джерел (262 найменування, з них кирилицею – 18, латиницею – 244) та додатку. Роботу викладено на 179 сторінках, проілюстровано 28 рисунками та 15 таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Метаболізм та фізіологічна роль вітаміну D<sub>3</sub>

Вітаміни групи D (секостероїди) належать до жиророзчинних вітамінів та поділяються на три типи:

- вітамін D<sub>1</sub> (речовина винайдена в жирі печінки тріски, що є сполукою ергокальциферолу та люмістеролу у співвідношенні 1:1);
- вітамін D<sub>2</sub> – ергокальциферол, що утворюється з ергостеролу під дією сонячного світла, головним чином – у рослинах;
- вітамін D<sub>3</sub> – холекальциферол, що утворюється в організмі тварин під дією сонячного світла з 7-дегідрохолестерину; саме її розглядають як «істинний» вітамін D, тоді як інші представники цієї групи вважають модифікованими похідними вітаміну D. На відміну від усіх інших жиророзчинних вітамінів, вітамін D<sub>3</sub> не є власне вітаміном у класичному сенсі цього терміну, оскільки він:
  - біологічно не активний;
  - за рахунок двосходинкової метаболізації в організмі перетворюється на активну гормональну форму;
  - чинить різноманітні біологічні ефекти за рахунок взаємодії зі специфічними рецепторами, локалізованими в ядрах клітин багатьох тканин і органів. У цьому відношенні активний метаболіт вітаміну D поводить себе як істинний гормон, через що і отримав назву «D-гормон», хоча ще його традиційно називають «вітамін D» [26].

Загальновідомо, що вітамін D необхідний для регуляції мінерального обміну, нормального розвитку та функціонування кісткової тканини, оскільки головна його функція – забезпечення всмоктування кальцію та фосфору із

продуктів харчування в тонкій кишці. Є також дані про його вплив на вуглеводний, ліпідний обмін та імунний статус.

Вітамін D необхідний для контролю багатьох процесів у нормі та патології:

- регуляції розмноження клітин, їх диференціації, проліферації й апоптозу;
- процесів обміну речовин;
- нервово-м'язової провідності;
- стимуляції синтезу гормонів.

Майже у кожній тканині є рецептори для прояву дії кальцитріолу:  $\beta$ -клітинах підшлункової залози, серці, легенях, головному мозку, скелетних м'язах, шлунку, тонкій і товстій кишках, плаценті, молочних залозах, передміхуровій залозі, гонадах, лімфоїдній тканині та імунокомпетентних клітинах. Окрім того, метаболіти вітаміну D проявляють фізіологічний ефект на генному рівні шляхом, близьким до дії стероїдних гормонів [39].

Метаболічний синтез вітаміну D під впливом сонячного світла розпочинається з поглинання 7-дегідрохолестерином променів ультрафіолетового спектру, довжиною 290-315 нанометрів. Це призводить до розриву зв'язку між 9-м і 10-м вуглецем з отриманням провітаміна D<sub>3</sub>. Після цього, нестабільний секостероїд зазнає конформаційних змін і утворює термодинамічно стійку форму вітаміну D<sub>3</sub> (тобто холекальциферолу) [40]. Вітамін D<sub>3</sub> в свою чергу зв'язується з вітамін D-зв'язуючим білком (vitamin D-binding protein - VDBP), і новоутворений комплексний вітамін D<sub>3</sub>-VDBP потім переходить у печінку де гідроксилується вперше. Вітамін D<sub>3</sub>, що виробляється в шкірі, а також вітаміни D<sub>2</sub> і D<sub>3</sub> що вживаються з їжею метаболізуються в 25-гідрокси-вітамін D (25(OH)D) ферментами 25-гідроксилазами. 25(OH)D являє собою основну циркулюючу форму, яку зазвичай вимірюють для оцінки стану вітаміну D в організмі [41–43].

Далі 25-(OH)-D проходить другий етап гідроксилування в нирках нирковою 1-альфагідроксилазою (CYP27B1), що метаболізує 25(OH)D у 1,25-

дигідрокси-вітамін D (1,25- (ОН)2-D) - кальцитріол або активний гормон вітаміну D. Контролюється даний процес рівнем паратиреоїдного гормону в плазмі (ПТГ), інгібується кальцієм, фосфатом, фактором росту фібробластів [44]. Зв'язування 1,25- (ОН) 2-D з рецептором вітаміну D (VDR) у поєднанні з ретиноевим X рецептором (RXR) утворює молекулярний комплекс, який переміщується в ядро клітин і регулює експресію сотень генів через взаємодію з його вітамін D чутливими елементами (VDRE) на ДНК [45]. В подальшому метаболіти вітаміну D руйнуються гідроксилуванням за допомогою ферменту 24-гідроксилази (CYP24A1), що, у свою чергу, регулюється рівнем 25(ОН)D. Цей фермент катаболізує і 25(ОН)D, і 1,25-(ОН)2-D у біологічно неактивні та водорозчинні метаболіти, які остаточно виводяться з жовчею та сечею [46, 47].

Найважливіші функції вітаміну D зосереджені на кістках, кишках та нирках, для підтримання гомеостазу кальцію та мінералізації кісток за допомогою регуляції транс-клітинного транспорту кальцію. Більше того, 1,25-(ОН)2-D здатний стимулювати всмоктування кальцію в кишечнику і подальшу реабсорбцію в дистальному каналці нирки. 1,25-(ОН) 2-D сприяє також диференціації остеобластів, і є ключовим елементом у формуванні та укріпленні кісток [44]. Дефіцит 25(ОН)D є основною причиною рахіту у дитинстві та остеомалаяції у дорослому віці [41, 48].

Функції вітаміну D реалізується в організмі двома шляхами через ендокринний і аутокринний механізми [9, 49–51]. Ендокринний механізм є найбільш вивченим і виконується за рахунок збільшення всмоктування кальцію в кишечнику і активності остеокластів. Вітамін D необхідний для росту, щільності і ремоделювання кісток [13,18,21-23]. Коли рівень вітаміну D<sub>3</sub> знижується нижче нормальних меж, ПТГ збільшує резорбцію кістки, щоб задовольнити потреби організму в кальції. Це означає, що низькі рівні вітаміну D<sub>3</sub> призводять до збільшення оновлення кістки з додатковим ризиком пошкодження кістки, таких як стресові переломи, які дуже часто зустрічаються у спортсменів.

Другий механізм дії вітаміну D включає аутокринний шлях. Хоча він не так добре вивчений, цей шлях є важливим, оскільки в ньому проходять багато ключових метаболічних процесів організму, такі як сигнальні процеси, експресія і генетична відповідь, синтез білкових гормонів, імунна / запальна відповідь, обмін речовин і синтез клітин. Без вітаміну D<sub>3</sub> здатність ефективно реагувати на фізіологічні та патологічні симптоми була б повністю змінена [49–51]. Цей вітамін діє як модулятор до 2000 генів, що беруть участь в зростанні клітин, регуляції імунної функції і синтезі білка [40, 52, 53]. Аутокринний шлях представляється найбільш важливим щодо дії вітаміну D на функцію скелетних м'язів. Мішені для рецептора вітаміну D були ідентифіковані майже в кожній тканині організму. Відкриття VDR в м'язах вказує на важливість ролі цього вітаміну в м'язовій тканині [40, 45, 49–51, 53, 54].

## **1.2 Пандемія дефіциту вітаміну D: асоційовані захворювання**

Вітамін D – секостероїдний гормон, що активно вивчався впродовж останніх 30-ти років, розуміння його ролі на сьогодні не обмежується лише метаболізмом кісток, а й більш системним впливом, який спостерігався на широкому спектрі тканин, апаратів і систем. Його дефіцит супроводжується гострими проявами та є глобальною причиною для занепокоєння світової спільноти в сфері охорони здоров'я [1, 41, 46, 47, 55]. З гіпо-, авітамінозом вітаміну D<sub>3</sub> можуть бути пов'язані такі патології як: періодонтит, ЦД і метаболічний синдром, карієс в дітей, пізній токсикоз вагітних, автоімунні розлади, інфекційні захворювання, серцево-судинні захворювання, неврологічні розлади, запальні процеси, імунні порушення, а також різні види раку [41, 55–57].

Внаслідок критичної ролі, яку має вплив сонячного світла і, зокрема, ультрафіолетове випромінювання, в синтезі вітаміну D, будь-який чинник, який змінює цей механізм, такі як зменшення УФ-випромінювання, що

досягає поверхні Землі, використання сонцезахисних кремів, меланін, який знижує ефективність сонця до вироблення вітаміну D, часточки, що забруднюють атмосферу, широта, погода, спосіб життя і т.д., буде сприяти дефіциту вітаміну D<sub>3</sub> [4, 9, 49, 51, 58–60]. Крім того, численні ендогенні фактори можуть змінювати вироблення вітаміну D<sub>3</sub> і викликати його дефіцит, такі як змінений метаболізм, порушення всмоктування вітаміну або недостатнє споживання в раціоні [59–61]. Пацієнти з дефіцитом вітаміну D<sub>3</sub> мають скелетно-м'язові болі, які часто помилково діагностують як фіброміалгії, синдром хронічної втоми і міозит [62–66]. Крім того, численні дослідження показали, що темношкірі люди мають більш високий ризик вторинних зміни через дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> [1, 65, 67].

Стандартом визначення вітаміну D в організмі є рівень 25-гідроксивітаміну D (25(OH)D) в крові, що являє собою загальну концентрацію 25-гідроксивітаміну D<sub>2</sub> і 25-гідроксивітаміну D<sub>3</sub>. При цьому ознакою авітамінозу вважалася концентрація менше 10 нг/мл (25 нмоль/л). При визначенні таких показників бралися за основу повідомлення, що стосувалися рівня 25(OH)D у крові та розвитку рахіту [1, 55]. Подальші дослідження визначили, що дефіцит вітаміну D пов'язаний зі збільшенням рівня циркулюючого гормону парацитоподібної залози ПТГ. Цей взаємозв'язок спостерігався за умов отримання здоровими добровольцями дорослого віку, які мали рівень (25(OH)D) 11–25 нг/мл у крові, 50 000 МО вітаміну D<sub>2</sub> раз на тиждень. Протягом 8 тижнів у тих, які мали рівень 25(OH)D між 11 і 19 нг/мл спостерігали статистично значущий спад рівня ПТГ у крові [68]. В той же час пацієнти, що мали рівень 25(OH)D між 20 і 25 нг/мл не показали суттєвих змін рівня ПТГ. Саме на основі цих досліджень поняття дефіциту вітаміну D було в 1998 р. переглянуто і визначено як рівень 25(OH)D <20 нг/мл у крові (50 нмоль/л) [68].

У 2011 році Міжнародним інститутом медицини, на основі нових наукових даних було встановлено, що для нормального функціонування і здоров'я людини, а зокрема її кісток, рівень 25(OH)D має становити

щонайменше 20 нг/мл і вище [69]. В подальшому цей показник підняли до 30 нг/мл, з огляду на наукові дослідження, які встановили, що в осіб з таким рівнем вітаміну D, або вище, не було підтверджено кісткового дефіциту на основі біопсії кісток, та не було жодних доказів остеомалаяції або остеїдозу. Ендокринне товариство того ж року опублікувало у посібнику з практики вітаміну D, що дефіцит вітаміну 25(OH)D визначається <20 нг/мл, недостатність - як 21–29 нг/мл і достатність - як мінімум 30 нг/мл для максимального здоров'я опорно-рухового апарату [70]. Аналогічні рекомендації щодо мінімальної концентрації вітаміну D в крові дав і Комітет з практичних рекомендацій.

В групі ризику дефіциту вітаміну D знаходяться вагітні жінки, люди з темною шкірою (афроамериканці, латиноамериканці та будь-хто з підвищеною пігментацією шкіри), також люди, що страждають на ожиріння, діти і дорослі, які практикують утримання від прямого впливу сонця [58, 70, 71]. При тому недостатність вітаміну D в дітей є глобальною проблемою. Так, наприклад в США, де молоко і деякі соки та крупи збагачені вітаміном D<sub>3</sub>, 50% дітей віком 1–5 років і 70% дітей віком 6–11 років мали 25(OH)D <30 нг/мл [72]. Можливими причинами такої недостатності можна вважати зменшене споживання молочних продуктів, високу кількість людей з зайвою масою тіла та хворих на ожиріння, використання сонцезахисного крему. Цікавим фактом є те, що аналогічна картина спостерігається і в Європі, Китаї, Індії, на Близькому Сході та в Південній Америці, де продукти не збагачуються вітаміном D<sub>3</sub> [1, 58, 59, 73–75].

За попередньою оцінкою приблизно 30% дітей та 60% дорослих мають недостатність вітаміну D [75]. Основною причиною такої невтішної статистики є недостатній час перебування на сонці, особливо у північних країнах, тому що цей шлях синтезу вітаміну D був і є основним шляхом надходження його в організм [58, 76, 77]. Адже насправді лише невелика частина продуктів містить природний вітамін D. До них відносяться жирна риба, така як лосось, скумбрія та оселедець, гриби, що потрапляють на сонячне



світло або сушені на сонці або олія печінки тріски [1, 2, 47, 58]. Деяка кількість вітаміну D<sub>3</sub> у вигляді 25(OH)D присутня у м'ясі, в тому числі яловичині та свинині [78, 79], в м'ясі птиці, що кормилися з додаванням вітаміну D до раціону. В північних та крайніх південних широтах важливими джерелами вітаміну D є підшкірний жир тюленів, китів, печінка білого ведмедя [3]. Наявність недостатності вітаміну D також корелює з харчуванням, що поширене в регіоні, способом життя конкретної людини, її етнічністю, а також самим географічним регіоном, його кліматом. На кількість вітаміну D, як було зазначено вище, може впливати також і етнічна приналежність. Таким чином, хоча у людей з білою шкірою зазвичай спостерігається більш низький рівень вітаміну D, але їм притаманна більш висока мінеральна щільність кісток і знижений ризик перелому [9, 40, 80].

У 2013 в журналі *Autoimmunity Reviews* [81] був опублікований огляд рандомізованих контрольованих досліджень, мета-аналізів та інших доказів дії вітаміну D<sub>3</sub> на різні аспекти здоров'я людини. Був зроблений висновок, що дефіцит або недостатність вітаміну D<sub>3</sub> пов'язаний із загальною смертністю. Адекватний статус вітаміну D<sub>3</sub> є захисним від порушення опорно-рухового апарату (м'язова слабкість, падіння, переломи), інфекційних захворювань, аутоімунних захворювань, серцево-судинних захворювань, ЦД типу 1 та 2, декількох типів раку, нейрокогнітивної дисфункції, психічних захворювань, та інших захворювань, у тому числі, безпліддя та причиною несприятливих наслідків при вагітності і народженні. Вживання вітаміну D<sub>3</sub> та розумне потрапляння сонячного світла на шкіру для досягнення оптимального рівня вітаміну D<sub>3</sub> є одними з основних факторів профілактики спектру вказаних порушень.

Дефіцит 25(OH)D призводить не тільки до збільшення остеопорозу, а також може бути причиною виникнення саркопенії у літніх людей [41, 82, 83]. З цієї причини рівень 25(OH)D може бути хорошим індикатором функціонального зниження кісткової тканини та втрати м'язової маси [83, 84]. Фактично, дефіцит 25(OH)D викликає активацію м'язових шляхів,

відповідальних за деградацію білка, збільшуючи втрату м'язової маси [85, 86]. Клітина визначається як «старіюча», коли вона піддається циклічній зупинці і / або її теломери стають занадто короткими, викликаючи пошкодження ДНК на кінцях хромосом [86]. У цьому контексті 1,25-(ОН)-2-D надає регуляторну дію на білки, що беруть участь в клітинному циклі (наприклад, цикліни і циклін-залежні кінази) [87] і проліферацію клітин (с-тус) [88]. Це призводить до пригнічення їх експресії та індукції зупинки клітинного циклу [41].

Важливою також є роль вітаміну D у взаємодії з позаскелетними тканинами, що допомагає відновлювати травмовані ділянки, а також знижує ризик зараження, особливо у спортсменів [89]. Враховуючи важливість такої дії у спорті варто наголосити, що дефіцит вітаміну D є досить поширеним серед спортсменів і може викликати остеомалюцію, остеопороз [9, 40, 90, 91]. Таким чином, добавки вітаміну D у спортсменів збільшували м'язову силу, а більш високий вміст вітаміну D<sub>3</sub> в сироватці крові пов'язують зі зниженням кількості отриманих травм, поліпшенням спортивних результатів в цілому. При цьому необхідно також виробити комплекс тестів для визначення людей з дефіцитом вітаміну D, а також надання їм правильних харчових добавок, що забезпечать вищу ефективність та вбережуть від можливих травм [90–93].

Як вже зазначалося у вступі, перші місця серед причин смертності у світі посідають хвороби, що пов'язані із серцево-судинною патологією [94], а серцево-судинна патологія тісно пов'язана з ЦД та ожирінням [95, 96]. Цікавим є розглянути роль вітаміну D у патогенезі серцево-судинних захворювань. Дослідженнями останніх років було показано, що дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> пов'язаний з гіпертонією, яка є фактором ризику атеросклеротичного процесу [97, 98]. Більш того, дослідники стверджують, що дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> активує систему ренін-ангіотензин-альдостерон, що може привести до гіпертрофії серця і збільшення ризику серцево-судинних захворювань. Аналогічно, епідеміологічні дані дозволяють припустити, що рівні вітаміну D<sub>3</sub> в плазмі крові обернено пропорційно пов'язані з ураженнями серця після гострого інфаркту міокарда. Випробування *in vitro* показали, що

вітамін D<sub>3</sub> може активно пригнічувати внутрішньоклітинний шлях NF-κB для зниження прогресування ішемічної хвороби серця. За таким механізмом вітамін D<sub>3</sub> може зменшити судинне запалення і атеросклероз. Результати показали, що дефіцит вітаміну D в значній мірі пов'язаний з тяжкістю ішемічної хвороби серця. Le T.Y.L. та ін. [99] провели дослідження *in vivo* для вивчення впливу вітаміну D<sub>3</sub> на функцію серця у мишей після інфаркту міокарда. Встановлено, що ведення вітаміну D<sub>3</sub> значно зменшувало площу фіброзного рубця в лівому шлуночку. Аналогічно, витончення стінки лівого шлуночка після інфаркту міокарда було зменшене у мишей з додаванням кальцитріолу. Недостатність вітаміну D<sub>3</sub> пов'язана з підвищеною артеріальною жорсткістю і ендотеліальною дисфункцією в кровоносних судинах і сприяє атерогенезу [100]. Виражена недостатність вітаміну D<sub>3</sub> викликає зміну адаптивної імунної відповіді, що сприяє дисфункції судин, IP та атеросклерозу [101]. Крім того, низький рівень вітаміну D<sub>3</sub> в сироватці може викликати патологічну гіпертрофію міокарда, підвищений кров'яний тиск і ендотеліальну дисфункцію. Дані зміни підтверджують припущення, що недостатні рівні вітаміну D можуть мати негативний вплив на кардіореспіраторну здатність, впливаючи на надходження кисню і поживних речовин в м'язи. Таким чином, можна заключити, що дефіцит вітаміну D пов'язаний з гіпертонією, інфарктом міокарда та інсультом, а також з іншими захворюваннями, пов'язаними з серцево-судинними захворюваннями, наприклад з порушенням функції легень, астмою та хронічними обструктивними захворюваннями легень [97].

На противагу вказаним досліджень у 2020 році Abboud M. [102] опублікував огляд в якому було включено та проаналізовано вісім клінічних рандомізованих досліджень та п'ять досліджень у мета-аналізі. Було виявлено, що добавки вітаміну D<sub>3</sub> неефективні в зниженні систолічного та діастолічного артеріального тиску у дітей і підлітків. Отже, дані, представлені в цьому огляді та аналізі, не підтверджують використання в клінічній практиці вітаміну D<sub>3</sub> як засобу, що знижує артеріальний тиск, у здорових або дітей та підлітків з

ожирінням, які є нормотензивними. Проте призначення вітаміну D<sub>3</sub> мало позитивний вплив на поліпшення ендотеліальної функції, знижуючи вироблення прозапальних цитокінів, регулюючи активність ренін-ангіотензин-альдостеронової системи і запобігаючи вторинному гіперпаратиреозу [103–106].

### 1.3 Недостатність вітаміну D та ризик розвитку ЦД та ожиріння

Нові докази свідчать про те, що низький рівень вітаміну D<sub>3</sub> також може викликати метаболічні хвороби [107]. Ще в публікаціях 1970-х років було висловлено припущення, що зв'язок між 25-ОН-D в сироватці і ожирінням може бути пояснений збільшенням зберігання 25-ОН-D в жировій тканині в осіб з ожирінням [108, 109]. Mawer E.V. та ін. [109] виявили відкладення вітаміну D в жировій тканині людини після введення радіоактивного холекальциферола. Пізніше Wortsman J. та ін., [110] встановили, що здатність шкіри виробляти вітамін D не змінювалась при ожирінні. Проте, збільшення рівня вітаміну D<sub>3</sub> в сироватці після перебування на сонці було на 57% менше у людей з ожирінням у порівнянні з суб'єктами без ожиріння. Збільшення сироваткового вітаміну D<sub>3</sub> після перорального прийому було однаковим у пацієнтів з ожирінням і без ожиріння. Це підтверджує гіпотезу про зниження вивільнення ендогенного вітаміну D в кровообіг через більше його накопичення в підшкірному жирі у осіб з ожирінням [110]. Показано, що більш високе споживання кальцію з їжею, яке пов'язане з більш низькими рівнями ПТГ, пов'язане з більш низькою масою тіла [111] і меншим збільшенням ваги [112], також відповідає гіпотезі про високі рівні ПТГ як причину ожиріння. Суб'єкти з первинним гіперпаратиреозом, у яких підвищений рівень ПТГ, також були значно важче контрольних осіб [113, 114].

ВООЗ у 2016 році оголосила ожиріння неінфекційною епідемією [115–118]. Основною причиною ожиріння є переїдання та малорухливий спосіб

життя. Головною метою людства 20 сторіччя, яке було багате на війни і голод, було перемогти голод. І людство з цією задачею справилося шляхом промислової революції в обробці їжі. Після Другої світової війни технологічний прогрес у виробництві продуктів харчування призвів до нової ери, яка характеризувалася надмірною дешевизною їжі та порівняно невеликими фізичними навантаженнями людей. Менше їжі стало готуватися в домашніх умовах, а оскільки зручна промислова їжа, як правило, має більше калорій, ніж домашня їжа, середній показник калорійності споживачів різко збільшувався. Населення планети стало менше їсти здорової їжі, а більше солі, жирів та цукру. За останні десятиліття збільшилась кількість людей з зайвою масою тіла [119].

Таким чином, прогрес науки призвів до того, що від їжі почали помирати люди і головною метою людства 21 сторіччя є боротьба з надмірного вживання їжі [118]. Характер харчування населення у наші дні викликає серйозну стурбованість: все зростаюче споживання продуктів «fast food», що супроводжується зниженням частки в денному раціоні овочів, фруктів, молочних і кисломолочних продуктів серйозним чином відбивається на стані здоров'я. Також за даними, що в 2019 році опубліковані в Європейському журналі епідеміології, Україна зайняла перше місце в рейтингу країн з найвищим рівнем смертності через серцево-судинні захворювання, пов'язані з неправильним харчуванням та ожирінням [120]. Тому, профілактика ожиріння та супутніх з ним захворювань, а особливо ЦД є пріоритетом для охорони здоров'я. ЦД – найнебезпечніший виклик людству, неінфекційна епідемія XXI століття. Відповідно до даних світової статистики, кожні 13–15 років кількість людей із ЦД подвоюється. На сьогодні у світі нараховується 415 мільйонів хворих на ЦД, а до 2040 року прогнозується зростання їх кількості до 642 мільйонів [121]. Поява нових лікарських препаратів не сприяє стримуванню захворюваності, а посилення критеріїв діагностики, у свою чергу, обумовлює стрімкий приріст кількості хворих, переважно за рахунок ЦД типу 2. ЦД

призводить до порушення всіх видів обміну речовин (насамперед вуглеводного), ураження судин, нервів, різних органів і тканин [122].

ЦД типу 1 складає приблизно від 5% до 10% випадків і спричинений клітино-опосередкованим автоімунним руйнуванням панкреатичних  $\beta$ -клітин, які виробляють інсулін. При ЦД типу 1, швидкість руйнування  $\beta$ -клітин може бути великою, особливо у немовлят і дітей. Незначна гіперглікемія натще може швидко змінитися на сильну гіперглікемію і кетоацидоз при інфекції чи іншому стресі. ЦД типу 2 є значно поширенішим і складає від 90% до 95% всіх видів ЦД. На ранніх етапах рівні інсуліну в цих пацієнтів можуть дійсно бути нормальними чи навіть підвищеними. ЦД типу 2 характеризується нечутливістю до інсуліну, спричиненою ІР, подальшим зниженням вироблення інсуліну та кінцевою  $\beta$ -клітинною недостатністю. ЦД типу 2 може залишатися невиявленим на протязі багатьох років, оскільки присутні класичні симптоми, такі як полідипсія, поліурія або втрата ваги, гіперглікемія, можуть бути недостатньо сильно вираженими у пацієнтів, щоб виявити їх на ранній стадії патологічного процесу [8, 25, 26, 123].

Добавки вітаміну  $D_3$  можуть допомогти запобігти розвитку ЦД у осіб з підвищеним ризиком. Показано, що люди з предіабетом зазвичай мають більш низькі концентрації 25(OH) $D$  в сироватці, ніж люди з нормальним рівнем глюкози [124, 125]. Крім того, ризик розвитку ЦД набагато вище для предіабетиків, у яких дефіцит вітаміну  $D$  [126, 127]. Низький рівень вітаміну  $D_3$  у пацієнтів з предіабетом може свідчити про майбутні макросудинні ускладнення, сприяючи дисрегуляції артеріального тиску, порушень активності ренін-ангіотензинової системи, ендотеліальної дисфункції та хронічного системного запалення [128]. Кальцій може бути також корисний для зниження ризику ЦД завдяки його впливу на вивільнення інсуліну та його непрямого впливу на втрату маси тіла [129–131]. Таким чином, добавка вітаміну  $D_3$  у поєднанні з кальцієм з урахуванням їх безпеки, розумної ціни та доступності, які приймається окремо або в поєднанні у пацієнтів з

предіабетичним станом потенційно може зупинити прогресування ЦД [124, 132, 133].

Підтвердженням вказаних фактів слугує мета-аналіз опублікований у Журналі Ендокринного товариства (Journal of the Endocrine Society, 2018) [134], в якому було оцінено 28 досліджень, у тому числі 11, орієнтованих на предіабетиків та 16 на популяції з високим ризиком, та виявили значні ефекти прийому вітаміну D на ІР та гіперглікемію. Добавки вітаміну D<sub>3</sub> та підвищення концентрації в сироватці 25(ОН)D покращували чутливість до інсуліну (зниження рівня індексу ІР (НОМА-IR)), метаболізм глюкози та контроль глікемії (зниження глікованого гемоглобіну (HbA1c) та рівня глікемії плазми венозної крові натще. Результати свідчать, що концентрація 25(ОН)D у сироватці крові вище 86 нмоль/л може покращити метаболізм глюкози та відповідь на інсулін у предіабетиків. Концентрації 25 (ОН) D у сироватці крові вище 86 нмоль/л були досягнуті при призначенні вітаміну D<sub>3</sub> 88 мкг/д (3500 МО/д) або більше, враховуючи масу тіла.

Зростає все більше наукових даних, які підтримують думку про те, що низький рівень вітаміну D є фактором, що сприяє розвитку як першого типу ЦД [20, 135, 136] так і ЦД типу 2 [20, 136, 137]. Обидва ці стани пов'язані із запаленням, а ЦД типу 1 ще й з автоімунною патологією. Дійсно, дослідження на тваринах і людях підтверджують думку про те, що добавки вітаміну D<sub>3</sub> можуть знизити частоту виникнення ЦД типу 1 і, можливо, ЦД типу 2 та можуть поліпшити метаболічний контроль [138]. Гіповітаміноз вітаміну D пов'язаний з підвищеним ризиком гіперглікемії як у пацієнтів з ЦД, так і без діабету [27]. Крім того, недавній мета-аналіз 19 рандомізованих контрольованих досліджень (РКД) показав, що добавки вітаміну D<sub>3</sub> здатні поліпшити метаболічний статус у пацієнтів з ЦД типу 2 [19].

Відомі деякі патофізіологічні механізми ролі вітаміну D<sub>3</sub> в патогенезі розвитку ЦД. Встановлено, що зниження секреції інсуліну було пов'язане з дефіцитом вітаміну D<sub>3</sub>, а оптимізація концентрації 25(ОН)D у сироватці крові після прийому вітаміну D<sub>3</sub> відновлювала секрецією інсуліну та покращувала

метаболізм глюкози, знижувала толерантність до глюкози та збільшувала чутливість до інсуліну [139, 140]. Також вітамін D<sub>3</sub> опосередковано стимулює секрецію інсуліну, змінюючи потік кальцію через мембрани клітин для нормалізації позаклітинного кальцію [132]. Дані свідчать про те, що підвищений ПТГ може бути пов'язаний із підвищеним ризиком непереносимості глюкози та ЦД [141, 142], а одночасне вживання кальцію з вітаміном D<sub>3</sub> значно знижує рівень ПТГ [143]. Інші потенційні механізми, продемонстровані були в дослідженнях *in vitro* та на тваринних моделях, а саме покращення дії інсуліну шляхом стимулювання експресії рецептора інсуліну, посилення чутливості до інсуліну на транспорт глюкози, поліморфізму генів та впливу вітаміну D<sub>3</sub> на експресію генів метаболічних шляхів [144, 145] та покращення системного запалення шляхом прямого впливу на цитокіни [132].

#### **1.4 Взаємозв'язок НАЖХП та дефіциту вітаміну D**

Сучасна наукова література свідчить про те, що низький сироватковий рівень вітаміну D може бути також причиною розвитку НАЖХП [17]. Поняття НАЖХП об'єднує спектр клініко-морфологічних змін печінки, представлених неалкогольним стеатозом (НАСП), стеатогепатитом (НАСГ), фіброзом і цирозом печінки, що розвиваються у пацієнтів, які не вживають алкоголь у гепатотоксичних дозах (<21 алкогольної Од/тиждень для чоловіків, <14 алкогольних Од/тиждень для жінок) [25, 146]. На сьогоднішній день, за результатами епідеміологічних досліджень, НАЖХП вважається одним з найбільш поширених хронічних дифузних захворювань печінки [147] та є предметом пильної уваги лікарів різних спеціальностей, особливо ендокринологів [148]. Тому що, існують переконливі докази того, що НАЖХП є невід'ємним компонентом метаболічного синдрому і корелює з розвитком ЦД типу 2 [148–154]. У пацієнтів з ЦД типу 2, що асоційований із ожирінням, поширеність НАЖХП може досягати 80-90%. Згідно з епідеміологічними



даними поширеність НАЖХП серед хворих на ЦД типу 2 становить 69,4%, НАСП - 34,3%, НАСГ - 29,0%, фіброзу - 6,1%. Поєднання НАЖХП і ЦД 2-го типу в 2-2,5 разів збільшує ризик розвитку цирозу печінки і гепатоцелюлярної карциноми і займає четверте місце серед причин летальності при ЦД типу 2 [155].

Провідну роль у патогенезі НАЖХП відіграє ІР, внаслідок чого в печінці накопичуються тригліцериди (ТГ) і формується НАСП — перший етап, або поштовх, захворювання. У подальшому відбувається вивільнення з жирової тканини і синтез у гепатоцитах *de novo* жирних кислот, що при надмірному накопиченні в клітинах печінки сприяють виникненню окисного стресу, який є другим поштовхом захворювання і призводить до розвитку запально-деструктивних змін у печінці із подальшим прогресуванням до фіброзу [25, 146].

Слід зазначити, що жирова тканина є важливим ендокринним органом, який секретує ряд біологічно активних і регуляторних сполук, наприклад, лептин, адипонектин, резистин, що беруть участь в розвитку ІР та інтенсифікації ліполізу, що призводить до значного вивільнення вільних жирних кислот і розвитку ліпотоксичності [25]. На сьогоднішній день відомо близько 100 адипокінів. Вони гетерогенні за своєю структурою та функціями, які вони виконують. Маючи паракринний, аутокринний та ендокринний механізми дії, ці гормоноподібні речовини впливають на метаболізм ліпідів, гомеостаз глюкози, процеси згортання крові, ангіогенезу, утворення кісткової тканини, процеси запалення, пухлинного росту тощо [156].

Ліпотоксичність і порушення функції внутрішньоклітинних структур (мітохондрій, мікросом) корелюють з розвитком запальних процесів, а чинниками, що викликають загибель гепатоцитів і розвиток фіброзу, є надмірне утворення активних форм кисню (АФК), продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і прозапальних цитокінів [157–159]. Існують докази, що активація ядерного чинника транскрипції  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) і залежних від нього прозапальних сигнальних шляхів системно (в організмі в цілому) і локально в

печінці є важливими молекулярно-клітинними чинниками в етіології печінкової IP та дисфункції  $\beta$ -клітин. Транскрипційна активація NF- $\kappa$ B в клітинах Купфера опосередковує розвиток запальних реакцій в печінці через підвищення рівня експресії прозапальних цитокінів, в той час як активація цього транскрипційного фактора в гепатоцитах може посилювати захист клітин [160, 161].

Відомо, що взаємодія рецептора NF- $\kappa$ B і його ліганда (RANKL) призводить до активації NF- $\kappa$ B, в той час як остеопротегерін (OPG), діючи як рецептор-пастка, пов'язує RANKL і нейтралізує його біологічну дію [162]. Однак, роль цитокінової системи OPG / RANKL / RANK в розвитку гепатопатії при ЦД 2-го типу є недостатньо вивченою.

Ліганд рецептора активатора ядерного фактора транскрипції NF- $\kappa$ B (RANKL) відноситься до групи регуляторних глікопротеїнів нової цитокінової системи, що відноситься до сімейства фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), який через рецептор активатора ядерного фактора транскрипції NF- $\kappa$ B (RANK) бере участь у формуванні, диференціації і активації остеокластів [162]. У той же час, дана цитокінова система може мати значний вплив на функціональну активність клітин імунної системи, так як продемонстрована експресія RANK в макрофагах і дендритних клітинах, залучених в регулювання запальних та імунних реакцій [163].

Одна з функцій сигнального шляху RANKL/RANK в імунній системі полягає в контролі ауто толерантності Т-клітин, а також кількості регуляторних Т-клітин (Treg) [164]. Крім того, RANKL безпосередньо регулює вироблення прозапальних цитокінів в макрофагах [165]. Встановлено, що підвищення концентрації в сироватці розчинної RANKL може розглядатися як незалежний індуктор ризику розвитку ЦД типу 2. Системне або печінкове блокування RANKL на різних моделях ЦД типу 2 у тварин призводить до помітного поліпшення чутливості печінки до дії інсуліну і нормалізації концентрації глюкози в крові [166]. Так само як і RANKL, OPG експресується в клітинах імунної системи, зокрема в зрілих В-клітинах і макрофагах. Крім

того, встановлено суттєвий вплив цього цитокіну на системну чутливість до дії інсуліну [167].

Nelson J.E. та ін. визначили провідну роль протеїнази, що активуються мітогенами (MAPK) та NF-κB-опосередкованих запальних процесів у тяжкості перебігу НАЖХП та дефіциту вітаміну D<sub>3</sub> [6]. Дійсно, гіповітаміноз вітаміну D<sub>3</sub> асоціюється з тяжкістю НАЖХП [17, 29]. Спираючись на результати досліджень, добавки вітаміну D<sub>3</sub> можуть покращити ліпідний профіль та запальні медіатори у порівнянні з плацебо. Через той факт, що ожиріння спричиняє запалення та ІР, що є основними причинами НАЖХП, зниження ваги розглядається як стандартне лікування цієї хвороби [168]. Також, результати мета-аналізу показали, що пацієнти з НАЖХП мали на 26% підвищений ризик дефіциту вітаміну D<sub>3</sub> в порівнянні з контрольною групою [21]. Вітамін D<sub>3</sub> може безпосередньо впливати на метаболізм печінки. Доведено, що VDR присутні у гепатоцитах і їх експресія може зменшити запалення при хронічних захворюваннях печінки [169]. Дослідження *in vitro* показали, що VDR підсилює чутливість до інсуліну через підвищення експресії транспортеру глюкози 4 (GLUT4) у м'язах та модуляцію вільних жирних кислот [170]. Показано, що вітамін D<sub>3</sub> також справляє протифіброзний, антипроліферативний та протизапальний вплив на печінку [171]. Більше того, вітамін D<sub>3</sub> може зменшити концентрацію цитокератин 18 апоптичного фрагменту M30 як маркера ураження печінки [31, 172]. Дослідження на тваринах показали, що високий рівень кальцію може знизити масу тіла за рахунок зниження синтезу жирних кислот і посилення ліполізу [22].

Жодна стаття не вказала на значний вплив вітаміну D<sub>3</sub> на ферменти печінки, крім однієї, яка показала, що вітамін D<sub>3</sub> разом з карбонатом кальцію може зменшувати активність трансаміназ печінки. Також було виявлено, що добавка вітаміну D<sub>3</sub> може покращувати антропометричні показники і показники глікемічного індексу серед пацієнтів з НАЖХП [17].

Згідно з результатами недавніх систематичних оглядів і мета-аналізу перехресних досліджень і досліджень випадок-контроль, у пацієнтів з НАЖХП рівень 25(OH)D був значно нижче, ніж у контрольних [21, 173]. Вчені вважають, що більш низькі рівні 25(OH)D у пацієнтів з НАЖХП можуть сприяти прогресуванню хвороби.

Точний механізм дефіциту вітаміну D<sub>3</sub> при НАЖХП ще точно не відомий. Дослідження на тваринах показало, що підвищення рівня 25(OH)D в сироватці за допомогою фототерапії може пригнічувати розвиток НАЖХП у щурів шляхом зменшення НАСГ, апоптозу і фіброзу гепатоцитів [174]. Крім того, вітамін D<sub>3</sub>, впливаючи на рецептор, що активується проліфератором пероксисом, може модулювати метаболізм вільних жирних кислот, тим самим вітамін D<sub>3</sub> знижує індуковану ними IP. Отже, дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> через підвищення вільних жирних кислот в кровотоці і гепатоцитах може погіршити прогресування НАЖХП [23]. З чотирьох РКД, в яких вивчався вплив вітаміну D<sub>3</sub> на медіатори запалення, три показали значне зниження запалення [17].

Є дані, що вітамін D<sub>3</sub> може запобігати активації зірчастих клітин печінки, які збільшують клітинну трансформацію і проліферацію [175]. Дослідження на тваринах показало, що вплив вітаміну D на проліферацію зірчастих клітин печінки пов'язаний з антифіброзною дією [176]. Що було підтверджено у дослідженнях *in vitro* та *in vivo*, в яких також виявлено інгібування активності зірчастих клітин печінки вітаміном D<sub>3</sub> навіть при підвищенні вільних жирних кислот [171]. Описані вище ефекти роблять вітамін D<sub>3</sub> перспективною добавкою для лікування НАЖХП, пригнічуючи накопичення ліпідів в клітинах печінки [17].

На противагу вказаним вище дослідженням у 2014 році Sharifi та ін. провели РКД і показали, що вітамін D<sub>3</sub> статистично значуще не впливав на печінкові ферменти, окислювальний стрес та ступінь запалення у пацієнтів з НАЖХП [33].

## **1.5 Застосування вітаміну D<sub>3</sub> у пацієнтів з ЦД типу 2 та неалкогольною жирною хворобою печінки**

На сьогоднішній день важливою і актуальною проблемою є пошук оптимальної тактики та нових не токсичних підходів для попередження та лікування ЦД типу 2, які можуть бути вдосконалені для компенсації та внесення змін у питання хронічних ускладнень, особливо НАЖХП [177, 178]. Комплексна терапія НАЖХП заснована на наступних основних принципах: поступове зменшення маси тіла, оптимізація фізичної активності, раціональне харчування, відміна всіх потенційно гепатоксичних препаратів, корекція метаболічних порушень, лікування ІР, гіперглікемії, а також дислипідемії та оксидативного стресу [23, 146, 147, 150, 177, 179, 180].

В останній час у якості одного з найважливіших факторів дослідження ЦД типу 2 розглядають дефіцит вітаміну D<sub>3</sub>, який здатний посилити ІР і зменшити секрецію інсуліну в організмі людини та тварин [104, 137, 181–184]. Гіпокальціємія, що розвивається на фоні дефіциту вітаміну D<sub>3</sub> в організмі, може викликати зменшення глюкозо-індукованої секреції інсуліну в β-клітинах підшлункової залози. На сьогодні недостатність вітаміну D представляє собою пандемію, яка охоплює більшу частину людської популяції. Клінічні дослідження підтверджують, що вітамін D<sub>3</sub> залучений в модуляцію імунних відповідей при різних запальних та автоімунних захворюваннях [57, 97, 175].

Нині розглядають два ключових механізми впливу вітаміну D<sub>3</sub> на фізіологічні процеси, а саме на генному рівні та через епігенетичні ефекти - модифікація структурно-функціонального стану біологічних мембран та зміна активності регуляторних пептидів. Також все ще залишається недостатньо вивчено патогенетичну роль порушення метаболізму вітаміну D<sub>3</sub> та реалізацію VDR-опосередкованого гормонального впливу 1,25(OH)D в механізмі розвитку патологій печінки при ЦД типу 2. Припускається, що знижений

рівень активних метаболітів вітаміну D<sub>3</sub> в організмі при вказаній патології є наслідком зменшення його всмоктування в слизовій оболонці тонкої кишки, зменшення рівня поглинання вітаміну клітинами печінки, порушення його транспортування, а також інгібування вітамін D 25-гідроксилазних систем печінки.

Гормональна форма вітаміну D<sub>3</sub> ефективно регулює синтез цитокінів у різних тканинах [106]. На молекулярному рівні даний ефект можна реалізувати через VDR-опосередковану транскрипційну активацію NF-κB. Запалення за умов ЦД типу 2 може включати в себе зовнішні тонкі взаємодії різних типових клітин, серед інтегруючих компонентів взаємодії яких є система цитокінів [17].

На протипагу вказаних досліджень, у дослідженнях Barchetta I. та ін [23] використання 2000 МО/день холекальциферола не змінило експресії медіаторів запалення. Учасниками цього дослідження були пацієнти з ЦД типу 2, що асоційований з НАЖХП, в той час як інші дослідження були на пацієнтах з НАЖХП без інших супутніх захворювань. Різна досліджувана популяція може викликати незначний вплив вітаміну D<sub>3</sub> на медіатори запалення [17].

Також, в Центрі діабету університету Сапієнзи у 2016 році (Рим, Італія) було проведено плацебо контрольоване РКД високих доз перорального прийому вітаміну D<sub>3</sub> (2000 МО на добу протягом 24 тижнів), яке встановило, що пероральна добавка вітаміну D не покращувала НАСП або метаболічні / серцево-судинні параметри у пацієнтів з ЦД типу 2 з НАЖХП [31]. Це випробування показало, що нутрицевтичне втручання, засноване на пероральному прийомі вітаміну D<sub>3</sub> у високій дозі, не впливає на вміст печінкового жиру у пацієнтів з ЦД типу 2 та НАЖХП, тобто добавка холекальциферолу не покращила ні рівня трансаміназ, ні специфічних біомаркерів фіброгенезу у сироватці, таких як цитокератин 18-М30 (СК18-М30) та N-кінцевий пропептид проколаген III (P3NP). Аналогічно, клінічні маркери порушення функціональної активності печінки при НАЖХП, такі як співвідношення АЛТ/АСТ та FLI (жировий індекс печінки), не показали

значних змін після прийому вітаміну D<sub>3</sub>. Автори також перевірили гіпотезу щодо участі вітаміну D у модулюванні ІР, метаболічного профілю та глікемічного контролю у цих пацієнтів, але жоден із цих параметрів суттєво не змінився після 24-тижневого лікування вітаміном D<sub>3</sub> порівняно з групою плацебо. Так само добавки вітаміну D<sub>3</sub> не викликали специфічного впливу на ендотеліальну функцію та субклінічний атеросклероз. Крім того, оскільки не всі учасники дослідження показали низький рівень 25(OH)D на початковому рівні, автори постулювали, що добавка вітаміну D<sub>3</sub> може сприятливо впливати на НАЖХП лише у пацієнтів, які страждають на гіповітаміноз вітаміну D<sub>3</sub>.

Проте, найсучасніші дані мета-аналізу, що аналізували лише РКД з використанням вітаміну D<sub>3</sub> для лікування ЦД типу 2 у поєднанні з НАЖХП, опубліковані в медичному журналі (*Medicine (Baltimore)*, 2020) свідчать про ефективність та обґрунтованість використання вітаміну D<sub>3</sub> при вказаній коморбідній патології [30].

Отже дані літератури суперечливі, більшість досліджень стверджують про ефективність лікування вітаміном D<sub>3</sub> пацієнтів, які страждають НАЖХП і ЦД типу 2 [8, 23, 28–30], а інші доводять його не ефективність [31–33] і навіть токсичність його прийому [34–38]. У 2019 році світ отримав нове пандемічне захворювання, спричинене коронавірусною інфекцією. ВООЗ оголосила SARS-Cov-2 (COVID-19) глобальною пандемією. Дослідниками з Фонду лікарні королеви Єлизавети та Університету Східної Англії було проаналізовано роль вітаміну D<sub>3</sub> у профілактиці та лікуванні коронавірусної інфекції та смертності [5]. Автори порівняли середні рівні вітаміну D у громадян 20 європейських країн, що захворіли на коронавірус, зі статистикою смертності від COVID-19. Дослідники виявили, що особливо низький рівень вітаміну D спостерігався у жителів Іспанії і Італії, і найчастіше - серед людей похилого віку, які є найбільш вразливими перед коронавірусною інфекцією групою населення. У зв'язку з тим, що у осіб похилого віку переважно виявляється ЦД типу 2 та НАЖХП [185],

дослідження ролі вітаміну D<sub>3</sub> при цих метаболічних порушеннях набирає нової надзвичайної важливої актуальності.

Отже, безперечно актуальним є дослідження терапевтичного потенціалу препаратів вітаміну D<sub>3</sub> в комплексному лікуванні пацієнтів з недостатньою забезпеченістю організму вітаміном D<sub>3</sub> з метою розробки нових оптимальних схем терапії НАЖХП, асоційованої з ЦД типу 2. Вищесказане обумовлює необхідність глибокого і всебічного вивчення важливої наукової проблеми, яка полягає в необхідності клініко-експериментального обґрунтування ефективності застосування вітаміну D<sub>3</sub> для профілактики і корекції метаболічних порушень і структурно-функціональних змін печінки при ЦД типу 2.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1 Моделювання експериментального ЦД типу 2 у щурів

У дослідженнях використовували двомісячних білих щурів-самців лінії Wistar вагою  $230 \pm 12$  г у кількості 50 голів. Упродовж тижневої акліматизації і протягом всього експерименту тварини перебували у віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ за температури  $+18-22^{\circ}\text{C}$ , вологості 50-60%, природному світловому режимі “день-ніч” у пластикових клітках при вільному доступі до води і харчування. Вибір тварин для створення експериментальних груп проводився методом “випадкових чисел”. Усі маніпуляції проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006).

Тварини були розділені на дві групи: 1-а група (10 голів) – контрольні щури, які одержували стандартний лабораторний корм, 2-а група (40 голів) – щури з експериментальним ЦД типу 2, викликаним годуванням тварин протягом 60 діб висококалорійною дієтою (складалась на 54% з корму віварію, 25% жиру, 20% фруктози та 1% жовчі) і одноразовою ін'єкцією стрептозотоцину (STZ). Свіжо приготований розчин STZ (25 мг/кг в 0,1 М цитратному буфері, рН 4,5) вводили внутрішньо-очеревинно тваринам 2-ї групи на 61-у добу експерименту після 12-годинного голодування. Через два тижні (на 75-ту добу) в експериментальних щурів проводили контроль рівня глюкози біосенсорним методом (глюкометр OneTouch Select, Lifescan, Inc. a

Johnson& Johnson company, США) і формували групи – контрольну (10 щурів), діабетичну (14 щурів) та діабетичну, щури якої (14 голів) отримували перорально один раз на добу вітамін D<sub>3</sub> (холекальциферол; Sigma, США) у дозі 780 МО (20 мкг) на 1 кг маси тіла упродовж 30 діб. Підбір дози холекальциферолу, за якої підтримувався оптимальний рівень 25(OH)D (вище 120 нмоль/л) у сироватці крові контрольних та діабетичних тварин, було здійснено раніше у експериментах, проведених в Інституті біохімії ім О.В. Палладіна НАН України. У 30-денний період після формування груп всі тварини перебували на стандартному кормі віварію. На 105-ту добу від початку експерименту у тварин проводили інсулінотолерантний тест. Масу тіла тварин визначали при формуванні груп перед введенням STZ і після закінчення експерименту.

## **2.2 Тестування толерантності до інсуліну**

Перед проведенням тестування щури знаходились без їжі протягом 12 годин. Після вимірювання початкового (базального) рівня глюкози (0 хв) тваринам внутрішньо-очеревинно вводили розчин інсуліну (препарат «Актрапід НМ Пенфіл», Novo Nordisk, Данія; стоковий розчин містив 100 Од інсуліну у 1 мл) у дозі 0,7 Од на 1 кг маси тіла щура. За допомогою внутрішньовенного катетера через 30, 45, 60, 90 та 120 хвилин з моменту введення інсуліну відбирали проби крові та визначали концентрацію глюкози. Загальну площу під кривими у відповідь на введення інсуліну розраховували, використовуючи програму Microsoft Excel.

## **2.3 Виділення первинних гепатоцитів**

Гепатоцити ізолювали колагеназним методом, як описано Shiota M. і співавторами [186]. Після перфузії печінки холодним фізіологічним розчином через ворітну вену, її подрібнювали на невеликі фрагменти та інкубували при

+37°C протягом 30 хв у середовищі, що містило 0,05% колагенази IV типу (Sigma, США), 0,146 М NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2,0 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,7 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 0,7 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% альбуміну (рН 7,4). Зразки фільтрували, промивали та дисперговані клітини центрифугували. Чистоту фракції гепатоцитів контролювали цитохімічним методом після їх фарбування гематоксиліном Бомера. Кількість гепатоцитів підраховували за допомогою гемоцитометра.

#### **2.4 Визначення рівня утворення активних форм кисню (АФК) у первинних гепатоцитах**

Інтенсивність продукування АФК в ізольованих гепатоцитах аналізували за рівнем окислення специфічного зонду 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату (DCFH-DA, Sigma, США) і його перетворенням на флуоресцентний 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн (DCF) [187]. До 100 мкл суспензії гепатоцитів ( $0,5 \cdot 10^6$  клітин) додавали 1 мкл розчину DCFH-DA (2,5 мМ) та інкубували 15 хв при +37°C в темряві. Проби центрифугували при 1500 об/хв 10 хв, клітини двічі відмивали у PBS та ресуспендували у 0,5 мл PBS. Флуоресценцію реєстрували на протоковому цитофлуориметрі COULTER® EPICS™XL™ (Beckman Coulter, США) за каналом FL1 (515-535 нм) та при  $\lambda_{зб} = 488$  нм.

#### **2.5 Визначення біохімічних показників сироватки крові**

Для аналізу використовували сироватку крові тварин, яку готували за стандартним протоколом [188]. Забір крові здійснювали з ретроорбітального синуса безпосередньо перед забоєм тварин. Об'єм сироватки, який отримували з одного щура у середньому складав 1 мл. Про забезпеченість організму вітаміном D судили за серологічним рівнем 25(OH)D, який визначали імуноензимним методом, розробленим в Інституті біохімії ім. О.В.

Палладіна НАН України, з використанням поліклональних антитіл проти 25(OH)D і біотин-стрептавідинового способу візуалізації [189]. Визначення вмісту 25(OH)D проводили один раз в усіх досліджуваних групах тварин в кінці експерименту .

Визначення активностей АЛТ та АСТ у сироватці крові проводили за методом Райтмана-Френкеля з використанням стандартних наборів («Філісіт-Діагностика», Україна) згідно інструкції виробника. Для визначення активності АЛТ до 400 мкл субстратно-буферного розчину, що містив 0,1 моль/л фосфатного буферу, 0,2 моль/л D,L-альфа-аланіну та 2 ммоль/л оксоглутарової кислоти, вносили 80 мкл сироватки крові та інкубували 60 хвилини при +37°C. Реакцію зупиняли стоп-реагентом (1 ммоль/л 2,4-днітрофенілгідразин) та додавали 4 мл 0,4 Н NaOH. Оптичну густину вимірювали при  $\lambda = 500$  нм на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія). Активність АлАт вираховували, використовуючи калібрувальний графік [190].

Для визначення активності АСТ до 400 мкл субстратно-буферного розчину (0,1 моль/л фосфатний буфер, 0,1 моль/л L-аспарагінова кислота та 2 ммоль/л оксоглутарова кислот) вносили 80 мкл сироватки крові та інкубували 60 хвилини при +37°C. Реакцію зупиняли 1 мМ розчином 2,4-днітрофенілгідразином, після чого додавали 4 мл 0,4 Н NaOH. Оптичну густину вимірювали спектрофотометрично при  $\lambda = 500$  нм. Активність АсАт вираховували, використовуючи калібрувальний графік [190].

Вміст загального протеїну в сироватці крові визначали біуретовим методом. Концентрацію альбуміну вимірювали за реакцією з бромкрезоловим зеленим.

Загальні ліпіди, ТГ, вільні жирні кислоти та холестерин у сироватці крові тварин досліджували, використовуючи стандартні набори реагентів Biolatest (Erba Lachema, Чеська Республіка) згідно інструкції виробника [191].

## 2.6 Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Визначення експресії цільових генів у тканині печінки щурів проводили методом кількісної ПЛР у реальному часі (RT-qPCR). Тотальну РНК отримували з наважки подрібненої у рідкому азоті тканини (20 мг) з використанням набору innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Німеччина). Концентрацію РНК вимірювали за допомогою спектрофотометру/флуориметру DS-11 (DeNovix Inc., США).

Синтез кДНК проводили з використанням набору реагентів Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно інструкції виробника. Реакційна суміш загальним об'ємом 20 мкл містила 8 мкл стандартного буферного розчину, 2 мкл суміші дикоксирибонуклеотидів (dNTP), 2 мкл праймеру OligodT, 2 мкл рекомбінантної зворотної транскриптази (Enzyme mix) та об'єм мРНК, концентрація якої знаходилась у діапазоні 1 пг-5 мкг. Синтез кДНК проводили за режиму температур +50°C (30 хвилин) та +85°C (5 хвилин).

**Таблиця 2.1.** Перелік праймерів для проведення кількісної ПЛР у реальному часі.

Ген інтересу	Послідовність праймерів	Довжина продукту, bp
<i>RelA (NF-<math>\kappa</math>B)</i>	сенс 5'-GTACTTGCCAGACACAGACGA-3' антисенс 5'-CTCGGGAAGGCACAGCAATA-3'	149
<i>Ikb</i>	сенс 5'-TGAAGTGTGGGGCTGATGTC-3' антисенс 5'-AGGGCAACTCATCTTCCGTG-3'	195
<i>Tnfa</i>	сенс 5'-TCAGCGAGGACACCAAGG-3' антисенс 5'-CTCTGCCAGTTCCACATCTC-3'	196
<i>Cyp27a1</i>	сенс 5'-TCGACACATCCTGATTGGAAGG-3' антисенс 5'-TCTCATGCGGCTCAACACAG-3'	202
<i>Cyp2r1</i>	сенс 5'-CCTTCTGCTACTACTCGTGC-3' антисенс 5'-GCATGGTCTATCTCGCCAAA-3'	183
<i>Cyp27b1</i>	сенс 5'-TGGGTGCTGGGAACCTAACCC-3' антисенс 5'-TCGCAGACTGATCCACCTC-3'	113
<i>Vdr</i>	сенс 5'-TCATCCCTACTGTGTCCCGT-3' антисенс 5'-TGAGTGCTCCTTGGTTCGTG-3'	161
<i>Gapdh</i>	сенс 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	307

	антисенс 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
--	--------------------------------------	--

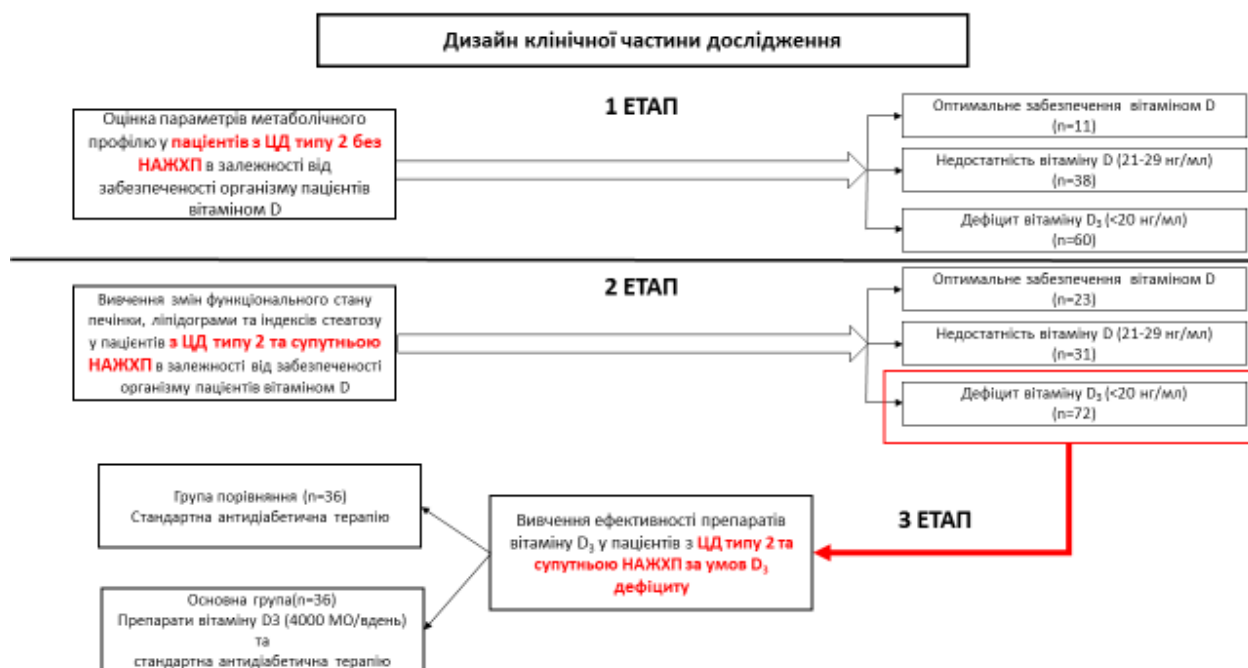
Полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі (RT-qPCR) проводили з використанням набору реагентів Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, США) згідно інструкції виробника. В 20 мкл реакційної суміші містилось 13 мкл SYBER Green/ROXqPCR Master mix, 2 мкл води, вільної від ДНКаз та РНКаз, 3 мкл суміші специфічних праймерів (сенс+антисенс) та 2 мкл кДНК. Температура відпалу праймерів +58°C, кількість циклів - 50. Специфічні праймери створювали з використанням on-line програмного забезпечення Primer Blast на платформі NCBI (табл. 2.1). Синтез праймерів здійснювала компанія «Metabion International AG».

Отримані дані були нормалізовані за референтним геном – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназою (GAPDH) та розраховані за методом  $\Delta\Delta C_t$ .

## 2.7 Клінічна характеристика хворих

Клінічна частина дисертаційної роботи проведена в 3 етапи на базі Київського міського клінічного ендокринологічного центру (КМКЕЦ). Дизайн дослідження представлений на **рис. 2.1**.

Згідно з поставленими завданнями на початковому етапі було проведено 2 крос-секційних одномоментних дослідження. В першому із них проаналізовано дані 109 пацієнтів із ЦД типу 2 без НАЖХП з метою оцінки ІР, функціональної активності  $\beta$ -клітин та параметрів метаболічного профілю залежно від забезпеченості організму вітаміном D. В інше, в аналіз включено результати 126 пацієнтів з ЦД типу 2 та асоційованою із ним НАЖХП для оцінки функціонального стану печінки, індексів стеатозу та параметрів метаболічного профілю в залежності від забезпеченості організму пацієнтів вітаміном D (**рис. 2.1**).



**Рис. 2.1.** Дизайн клінічної частини дослідження.

В обох дослідженнях залежно від забезпеченості організму вітаміном D пацієнти були розподілені на 3 групи відповідно до рекомендацій Європейської асоціації ендокринологів (ECE) [70]: група 1 – з оптимальним рівнем вітаміну D<sub>3</sub> (30 нг/мл); група 2 - D<sub>3</sub> недостатність (21-29 нг/мл); і група 3 – D<sub>3</sub> дефіцит (<20 нг/мл). Класифікацію ступеня забезпеченості організму вітаміном D наведено у **табл. 2.2.**

**Таблиця 2.2.** Класифікація ступеня забезпеченості організму вітаміном D [70].

Вміст 25(OH)D <sub>3</sub> у сироватці крові		Діагноз
нг/мл	нмоль/л	
>30	>75	оптимальний рівень забезпеченості
20-30	50-75	недостатність вітаміну D
<20	<50	дефіцит вітаміну D
>80	>200	D-гіпервітаміноз

На 3 етапі оцінювалась терапевтична ефективність препаратів вітаміну D<sub>3</sub> на фоні комбінації до стандартної антидіабетичної терапії. Для цього було проведено проспективне когортне дослідження, в яке включили 72 пацієнти із ЦД типу 2 та асоційованою НАЖХП з встановленим D-дефіцитом (група 3 етапу 2 клінічної частини), в яких були виявлені найбільш виражені зміни метаболічного профілю. Пацієнти були рівномірно розподілені на 2 групи. Хворі групи порівняння (n=36) отримували традиційну терапію, яка включала залежно від індивідуальних потреб відповідне дієтичне харчування, цукрознижувальні засоби (препарати сульфанілсечовини, бігуаніди, інсулін). Пацієнти основної групи (n=36) додатково отримували препарати вітаміну D<sub>3</sub>, який призначали на тлі традиційної терапії у дозі 4000 МО/добу терміном на 6 місяців. Добову дозу та тривалість курсу обирали згідно алгоритму розробленого в докторській дисертаційній роботі проф. Комісаренко Ю.І. Згідно даного алгоритму саме така доза є обґрунтованою враховуючи D-дефіцит на вихідному рівні, наявність ожиріння та хронічних ускладнень ЦД у даної когорти хворих[20].

Протокол був затверджений комісією з етики при Київському міському клінічному ендокринологічному центрі, а саме дослідження проводилося згідно основних рекомендацій Гельсінської Декларації (1979р). До початку та перед проведенням будь-яких процедур, мета і методологія дослідження були повністю роз'яснені учасникам, після чого всі пацієнти дали письмову інформовану згоду на участь у даному дослідженні.

До початку дослідження ціль та методичні аспекти роботи були повністю роз'яснені учасникам, і всі пацієнти надали письмову інформовану згоду до початку будь-яких процедур.

Діагноз ЦД встановлювали згідно з критеріями ВООЗ (1999р.) [192]:

1. Рівень глюкози плазми натще  $\geq 7,0$  ммоль/л або цільної капілярної крові  $\geq 6,1$  ммоль/л (не менше 8 годин до проведення аналізу).



2. Рівень глюкози плазми  $\geq 11,1$  ммоль/л при випадковому дослідженні за наявності класичних симптомів діабету (поліурія, полідипсія, невмотивована втрата маси тіла).

3. Рівень глюкози плазми  $\geq 11,1$  ммоль/л через 2 години після проведення перорального глюкозотолерантного тесту з використанням 75 г глюкози у людей зі схильністю до діабету.

4. Рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) понад 6,5 % є діагностичним критерієм ЦД (ВОЗ, 2011). Нормальним вважається рівень HbA1c до 6 %. Показники HbA1c в межах 6,0-6,5 % свідчать про наявність предіабету.

Діагноз НАЖХП був встановлений у відповідності до уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Неалкогольний стеатогепатит» (Наказ МОЗ України №826 від 06.11.2014) на основі клінічного аналізу захворювання, лабораторних (показники ліпідного та вуглеводного обміну, активності АЛТ, АСТ, співвідношення АСТ/АЛТ) та інструментальних (комплексне ехографічне обстеження, КТ) методів діагностики [193].

Всі хворі, які брали участь у дослідженні не зловживали алкоголем, споживання  $< 21$  алкогольної ОД/тиждень для чоловіків,  $< 14$  алкогольних ОД/тиждень для жінок протягом останнього року (1 алкогольна ОД – 10 грам чистого етанолу). У дослідження не включали пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки іншої етіології, а саме вірусними (HBV-, HCV-, HDV-інфекціями), автоімунними чи медикаментозно-індукованими гепатитами. Хвороба Вільсона-Коновалова, вроджена недостатність  $\alpha 1$ -антитрипсину та ідіопатичний гемохроматоз також була критерієм виключення.

## 2.8 Методологічна характеристика клінічних досліджень

У клінічній частині дослідження, поряд з опитуванням хворих, використовували об'єктивне обстеження, лабораторні та інструментальні дослідження.

Після підписання інформованої згоди у пацієнтів натщесерце були зібрані зразки сироватки крові і негайно заморожені при  $t -20^{\circ}\text{C}$ . Для кожного пацієнта отримано відповідні клінічні і демографічні дані. Антропометричні параметри включали вимірювання ваги та зросту з точністю до 100 г і 0,5 см відповідно. ІМТ розраховували як масу тіла в кілограмах, поділену на квадрат зросту в метрах (вага/зріст<sup>2</sup>). ОТ пацієнта вимірювалась без одягу, на 1 см вище верхніх передніх гребенів клубової кістки, на видиху в положенні стоячи.

Концентрацію 25(OH)D в сироватці крові оцінювали з допомогою електрохемілюмінесцентного білок-опосередкованого методу, який використовується для кількісного визначення вітаміну (Roche Diagnostics, Mannheim, Німеччина) з внутрішньо- та міждослідницьким коефіцієнтом варіації <5.5% та <7,0% відповідно. Для аналізу використовується білок, що зв'язує вітамін D (vitamin D binding protein - VDBP) в якості каркасного білка, який зв'язується з обома формами 25-OH D<sub>3</sub> і 25(OH)D<sub>2</sub>. В основі методу лежить 3-х етапний процес інкубації тривалістю 27 хвилин. На 1 етапі зразок сироватки інкубують з реагентом для попередньої обробки, який вивільняє загальний 25(OH)D<sub>3</sub> від VDBP. На етапі 2 попередньо оброблений зразок інкубують з міченим рутенієм VDBP, створюючи комплекс між 25(OH)D та рутенільованим VDBP [194]. Третій етап інкубації передбачає додавання покритих мікрочастинок стрептавідином і міченого біотином 25(OH)D. Вільні сайти рутенільованого VDBP стають зайнятими, утворюючи комплекс, що складається з міченого рутенієм VDBP і міченого біотином 25(OH)D. Весь комплекс зв'язується з твердою фазою через взаємодію біотину і стрептавідину [194]. На початковому етапі проводиться вимір стандартів, після чого моделюється калібрувальна крива, при оцінці якої визначається концентрація 25(OH)D<sub>3</sub> у зразках в нг/мл.

Для оцінки функції  $\beta$ -клітин (% B) і чутливості до інсуліну (% S) була використана модель HOMA2-IR, яка є модернізованою версією структурної математичної моделі на основі визначення концентрації глюкози плазми та інсуліну натще – HOMA (homeostasis model assesment), з визначенням індексу HOMA-IR за формулою вперше запропонованою Matthews та ін [195]:

$$\text{імунореактивний інсулін (мкОД/мл)} \times \text{глюкоза плазми натще} / 22,5 \quad (2.1)$$

Ця модель може бути розрахована з використанням програмного забезпечення, що поставляється Оксфордським центром ендокринології, діабету та метаболізму і доступно за посиланням <http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/index.php>. HOMA-2IR має наступні переваги: можливість розрахунку за допомогою С-пептиду замість інсуліну натще; розширений діапазон значень для інсуліну до 1-300 мкОД/л та 20-460 мг/дл для глюкози з поправкою на гіперінсулінемію та гіперглікемічні стани; поправка на печінкову та периферичну IP і рівень циркулюючого проінсуліну [196, 197]. Норма для даного параметру не перевищує 2,0.

Глюкозу в крові визначали, використовуючи глюкозооксидазний метод по Тринде. Рівень інсуліну в крові вимірювали за допомогою методу електрохемілюмінесцентного імуноаналізу (ECLIA) з діапазоном референтних значень 2,6-24,9 мОД/л (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Базель, Швейцарія). С-пептид вимірювали з використанням методу хемілюмінесцентного імуноаналізу комерційними наборами (Immulite, Siemens AG, Німеччина) із значенням в нг/мл (норма 0,9-4 нг/мл). HbA1c вимірювали за допомогою імунотурбодиметричного аналізу на автоматичному аналізаторі Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Базель, Швейцарія) з діапазоном референтних значень від 4,8% до 5,9%. Рівень HbA1c був стандартизований з еталонним методом, узгодженим з DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) та Національною програмою стандартизації

глікованого гемоглобіну NGSP – (National Glycohemoglobin Standardization Program) [198].

Індекс ТГ до глюкози (TyG) є новим методом скринінгу ІР, оскільки простий у використанні та вимагає визначення лише двох лабораторних визначень:

$$\ln [\text{ТГ натще (мг/дл)} \times \text{глюкоза натще (мг/дл)}] / 2 \quad (2.2)$$

Згідно даних Salazar J. та ін. порогове значення TyG індексу при якому констатують ІР складає  $>4,49$ , з чутливістю 82,6% та специфічністю 82,1% (AUC = 0,889, 95% ДІ: 0,854-0,924) [199].

Концентрацію загального холестерину (ЗХС), холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) та ТГ вимірювали з використанням ферментативних наборів зі стандартизованими реагентами (BioVendor, Чехія). Ліпопротеїни низької (ЛПНЩ) і дуже низької щільності (ЛПДНЩ) розраховували за формулою Friedewald [191], тільки якщо рівень ТГ був нижче 4,5 ммоль/л; при перевищенні зазначеного порогу, концентрація ЛПНЩ були виміряна за допомогою електрофорезу і денситометрії (BioVendor, Чехія):

$$\text{ХС ЛПНЩ} = \text{ЗХС} - (\text{ТГ} / 2,22) - \text{ХС ЛПВЩ} \quad (2.3)$$

Концентрацію холестерину в складі ХС ЛПДНЩ визначали за значенням співвідношення ТГ / 2,2.

Для оцінки функціонального стану печінки досліджували активність АЛТ, АСТ та ГГТ, визначали співвідношення АСТ/АЛТ. Активність АЛТ та АСТ визначався УФ кінетичним методом, загального білірубіну та загального білку колориметричним методом у відповідності з рекомендаціями виробника («ERBA Lachema», Чехія). В дослідження включали пацієнтів з активністю АЛТ, АСТ не вище 3-х порогів верхнього референтного значення та

співвідношенням АСТ/АЛТ менше 1 у пацієнтів з підвищеними трансаміназами [192].

Усім пацієнтам було проведено одномоментне ультразвукове обстеження печінки на приладі Soneus P7 (Ultrasign, Україна) з конвексним датчиком 1–6 МГц, що включало В-режим, доплерографію та ЗХЕГ. Система Soneus P7 призначена для проведення ультразвукових досліджень внутрішніх органів і поверхневих тканин; застосовується в амбулаторних, стаціонарних відділеннях, приватних медичних закладах. Soneus P7 (Ultrasign, Україна) – цифрова переносна доплерівська система, що застосовується для експертної неінвазивної діагностики дифузних захворювань печінки. Згідно Сертифікату відповідності (UA.TR.002.CB.0227-16), що виданий ТОВ «Ультрасайн», ультразвукові скануючі системи Soneus відповідають вимогам технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №753 від 02.10.2013 р.; Сертифікат видано органом з оцінки відповідності ДП «Харківстандартметрологія» (термін дії від 17.10.2016 р. до 16.10.2021 р.).

У В-режимі оцінювали положення печінки (відносно краю реберної дуги, доступність акустичних вікон). Досліджували обидві частки печінки й проводили біометрію їх передньо-заднього розміру при спокійному диханні пацієнта; описували контур (рівний чи нерівний) і передньо-нижній кут печінки (гострий чи заокруглений); ехогенність печінки (нормальна, знижена, підвищена); ехоструктуру – дрібно- (1–2 мм), середньо- (3–4 мм) і великозернисту (5 мм і більше)). У В-режимі за критеріями М. Hamaguchi оцінювали звукопровідність паренхіми печінки або згасання ультразвуку за товщиною печінки в передньо-задньому напрямку [200]. Діагностика НАЖХП на стадії стеатозу проводилася за наступними критеріями: збільшення розмірів печінки; форма не змінюється; контури рівні; ехопровідність органу знижена за рахунок того, що тканина, яка містить жирові включення, має здатність розсіювати, відображати і поглинати ультразвукове випромінювання в більшій мірі, ніж незмінена; підвищення ехогенності паренхіми печінки в

порівняні з кірковою речовиною правої нирки; акустичний ефект ослаблення ультразвуку в глибоких шарах паренхіми; структура паренхіми однорідна, відмічається «збіднення» судинного малюнка [192].

Відомо, що «золотим стандартом» діагностики НАЖХП і диференціації між стеатозом і НАСГ є пункційна біопсія печінки, але ця процедура є інвазивною і ризикованою для хворих на ЦД 2 типу [201, 202]. В останні десятиліття все більшої поширеності для діагностики та оцінки ефективності лікування пацієнтів з НАЖХП набувають малоінвазивні методи верифікації засновані на біохімічному дослідженні венозної крові. Ці методи умовно можна розділити на рутинні – показники ліпідограми, та розрахункові коефіцієнти: стеатотест (SteatoTest®), індекси жирового гепатозу (ІЖГ), шкала вмісту жиру при НАЖХП (NAFLD liver fat score) результати яких розраховуються на підставі спеціальних алгоритмів з декількох біохімічних показників [202]. Зовнішня валідність даних тестів підтверджена в загальній популяції і у осіб з морбідним ожирінням, вони дозволяють з різним ступенем точності прогнозувати результати і смертність, пов'язані з метаболічними, печінковими і серцево-судинними проявами [157].

Bedogni G. та співавт. вперше запропонували FLI (fatty liver index) у 2006 році як алгоритм у дослідженні Dionysos Nutrition & Liver Study [203]. Індекс варіює від 0 до 100 і розраховується через формулу, яка базується на наступних показниках ТГ і ГГТ, ІМТ та ОТ:

$$\text{ІЖГ} = \frac{(e^{0,953 \cdot \log_e(\text{ТГ}) + 0,139 \cdot \text{ІМТ} + 0,718 \cdot \log_e(\text{ГГТ}) + 0,053 \cdot \text{ОТ} - 15,745})}{(1 + e^{0,953 \cdot \log_e(\text{ТГ}) + 0,139 \cdot \text{ІМТ} + 0,718 \cdot \log_e(\text{ГГТ}) + 0,053 \cdot \text{ОТ} - 15,745})} * 100 \quad (2.4)$$

Індекс HSI (Hepatic steatosis index) розраховували за наступною формулою:

$$\text{HSI} = 8 \times (\text{співвідношення АЛТ/АСТ}) + \text{ІМТ} + 2 \text{ (якщо жінка)} + 2 \text{ (якщо є ЦД)} \quad (2.5)$$

Порогове значення  $HSI > 36,0$  підтверджує наявність стеатозу печінки у пацієнта з чутливістю 93,1%, специфічністю 92,4% та з діагностичною точністю – AUROC 0,812 [204].

## 2.9 Статична обробка отриманих результатів

Статистичний аналіз виконували за допомогою стандартного пакету програм SPSS версії 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) і GraphPad Prism, версія 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Кількісні зміни представлені у вигляді середньої величини та стандартного відхилення середньої величини ( $M \pm SD$ ), якісні у вигляді %. Для перевірки гіпотези про нормальний розподіл використовували одновибірковий тест Колмогорова-Смірнова. Для оцінки відмінності кількісних показників використовували однофакторний дисперсійний аналіз (One-Way ANOVA) і якщо результат був достовірним, виконувався апостеріорний тест Тускеу. Дані з непараметричним розподілом аналізували з використанням критерію Крускалла-Уолліса. При аналізі якісних змінних застосовували критерій  $\chi^2$ . Позначення значущих відмінностей між групами на діаграмах здійснювали з допомогою латинських літер *a*, *b*, *c*. Однакова літера над двома стовпчиками діаграми вказує на відсутність відмінностей між відповідними двома групами даних. Різні літери над двома стовпчиками діаграми відображають значущі відмінності між відповідними двома групами даних.

Зв'язок між концентрацією вітаміну D та метаболічними параметрами оцінювали за допомогою одновимірного кореляційного аналізу Пірсона.

Одновимірний та множинний логістичний регресійний аналіз був використаний для виявлення незалежних факторів, які асоційовані вітаміном D дефіцитом. Для цього дефіцит вітаміну D використовували якості залежної змінної, а в ролі предикторів протестували клініко-лабораторні параметри зміни яких були статистично достовірними в одновимірній моделі. Дані

представленні у вигляді відношення шансів (OR) з 95% довірчими інтервалами (95% ДІ). Рівень значущості вважали достовірним при  $p < 0,05$ .

Для оцінки внутрішньогрупових змін в динаміці лікування вітаміном D<sub>3</sub> використовували парний t-критерій Стюдента. Для міжгрупового порівняння з метою оцінки ефекту часу та призначеного лікування використано ANOVA аналіз з повторними вимірюваннями, з проведенням корекції за віком, статтю та ІМТ.

Обробку даних, отриманих на експериментальних тваринах, проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з врахуванням середнього значення (M) й стандартної похибки середнього ( $\pm m$ ). Для визначення достовірності відмінностей між отриманими величинами вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) з поправкою Бонферроні. Вірогідними вважали відмінності при  $p \leq 0,05$ . Опрацювання і статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Origin Lab 8.5.

Комісія з питань етики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України розглянула матеріали кандидатської дисертації і вважає, що клініко-лабораторне та експериментальне дослідження не містить підвищеного ризику для суб'єктів дослідження щодо проведення подібних досліджень (протокол засідання № 137 від 20 жовтня 2011).



**РОЗДІЛ 3**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ПАТОГЕНЕТИЧНИХ  
ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ МІЖ D ДЕФІЦИТОМ І РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО  
ДІАБЕТУ ТИПУ 2 ТА НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ  
ПЕЧІНКИ**

**3.1 Моделювання експериментального ЦД типу 2 у щурів та дослідження впливу вітаміну D<sub>3</sub> на асоційовані із ним метаболічні порушення**

За ЦД типу 2 ключову роль у розвитку каскаду метаболічних порушень відіграє ІР. Для найбільш адекватного експериментального відтворення патогенезу і клінічних симптомів ЦД типу 2 важливо, щоб порушення ліпідного обміну і периферична ІР передували розвитку гіперглікемії. У даному експерименті порушення чутливості периферичних тканин до дії інсуліну модулювали шляхом двомісячного утримання піддослідних щурів на висококалорійної дієти з підвищеним вмістом жирів і вуглеводів (фруктози).

**Таблиця 3.1.** Вплив висококалорійної дієти (HCD, 25% жиру і 20% фруктози) та стрептозотоцину (одноразово, 25 мг/кг) на масу тіла та рівень глюкози експериментальних тварин; M±m.

Показник	До введення STZ (61 доба)		Через 14 діб після ін'єкції STZ	
	Контроль	HCD	Контроль	HCD+STZ
Вага тварин, г	361,8 ± 10,5	437,3 ± 14,5*	369,3 ± 11,3	400,2 ± 17,0*
Глюкоза крові, ммоль/л	5,33 ± 0,12	5,61 ± 0,11	4,85 ± 0,12	11,02 ± 1,00*

\* -  $p \leq 0,05$  вірогідність змін порівняно з відповідним контролем.

Одним з важливих наслідків ІР периферичних тканин є порушення ліпідного обміну, що, в кінцевому підсумку, може сприяти збільшенню маси

тіла [205]. Маса тіла тварин контрольної групи, які отримували стандартну дієту віварію, зростала протягом усього експерименту, а рівень глюкози залишався стабільним в межах нормоглікемії (табл. 3.1, 3.2). У тварин, які отримували висококалорійну дієту упродовж 60 діб, при незмінній концентрації глюкози в крові маса тіла була вищою на 75,5 г порівняно з контрольними щурами. Збільшення маси тіла, в першу чергу за рахунок депонування жирів, і відсутність гіперглікемії підтверджують розвиток стадії предіабету, що відбувається найімовірніше на тлі ІР і компенсаторного підвищення секреції інсуліну, який перешкоджає розвитку гіперглікемії у тварин цієї групи.

Відомо, що поєднання ІР з дисфункцією  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози є важливим етапом патогенезу ЦД типу 2 [206]. Це означає, що для переходу від предіабету до маніфестації ЦД типу 2 необхідна часткова втрата певної кількості функціональних  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози. З цією метою на 61-у добу експерименту тваринам одноразово вводили стрептозотоцин в низькій дозі (25 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Через два тижні після ін'єкції STZ спостерігалася стійка тенденція до зниження маси тіла, що найбільш ймовірно пов'язано з прогресуючим порушенням вуглеводного і білкового обміну у щурів внаслідок розвитку ЦД типу 2. Важливо відзначити, що STZ протягом перших 4 днів викликав летальність експериментальних тварин на рівні 32%. Зазвичай така висока летальність характерна для експериментів з використанням породних щурів, зокрема лінії Wistar, на відміну від менш вираженої при використанні безпородних тварин [207].

Розвиток ЦД типу 2 і порушення вуглеводного гомеостазу у щурів після ін'єкції STZ підтверджується зростанням в 3 рази концентрації глюкози в сироватці крові (табл. 3.2). Значна гіперглікемія у тварин із ЦД типу 2 може, принаймні частково, свідчити про декомпенсацію ІР периферичних тканин з підвищеною секрецією інсуліну  $\beta$ -клітинами, які вижили. Такі порушення зазвичай характерні для більш пізньої стадії ЦД типу 2.

**Таблиця 3.2.** Вплив висококалорійної дієти (25% жиру і 20% фруктози) та стрептозотоцину (одноразово, 25 мг/кг) на масу тіла та біохімічні параметри сироватки крові щурів (на 105-ту добу);  $M \pm m$ .

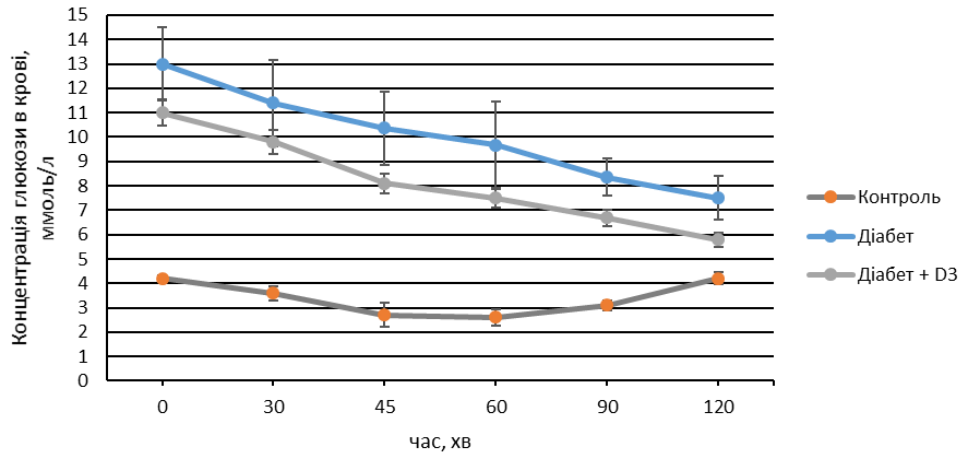
Показник	Контроль, n=10	ЦД типу 2, n=10	ЦД2 + D <sub>3</sub> , n=10
Вага тварин, г	384,8 ± 12,2	360,9 ± 12,7	368,3 ± 10,2
Глюкоза, ммоль/л	4,32 ± 0,12	13,10 ± 1,44*	11,00 ± 0,61 <sup>#</sup>
Загальні ліпіди, г/л	1,30 ± 0,25	3,51 ± 0,50*	2,15 ± 0,45 <sup>#</sup>
ТГ, ммоль/л	1,05 ± 0,04	4,30 ± 0,93*	1,89 ± 0,08 <sup>#</sup>
ЗХС, ммоль/л	2,89 ± 0,42	11,2 ± 1,75*	8,3 ± 0,73 <sup>#</sup>
ВЖК, мМ	0,52 ± 0,03	1,03 ± 0,07*	0,78 ± 0,06 <sup>#</sup>
Загальний протеїн, г/л	72,0 ± 3,1	66,2 ± 2,5*	70,1 ± 3,2
Альбумін, г/л	33,2 ± 1,3	29,0 ± 1,2*	31,8 ± 1,3 <sup>#</sup>
АЛТ, МО/л	21,5 ± 2,3	30,4 ± 2,0*	23,7 ± 2,1 <sup>#</sup>
АСТ, МО/л	60,8 ± 3,4	63,0 ± 3,1	57,5 ± 3,7

\* -  $p \leq 0,05$  вірогідність змін порівняно з показниками тварин контрольної групи; <sup>#</sup> -  $p \leq 0,05$  вірогідність змін порівняно з показниками тварин з ЦД типу 2.

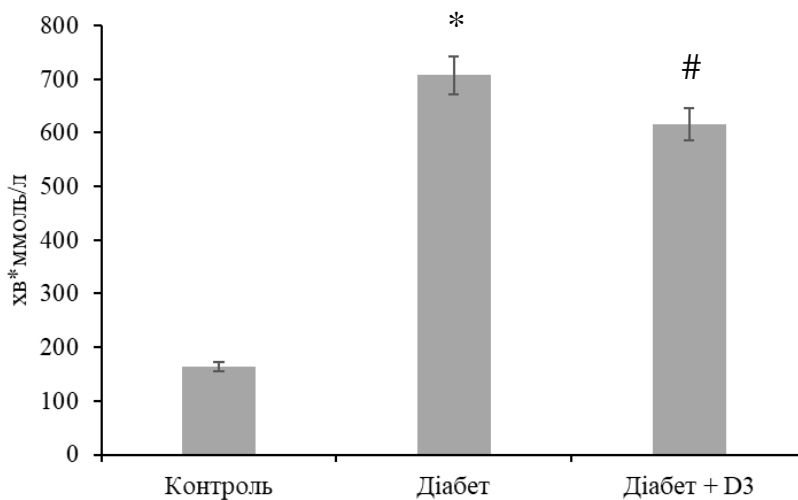
Інтраперитонеальний тест толерантності до екзогенного інсуліну, проведений через 74-и доби після введення STZ (на 105-у добу експерименту), показав істотне порушення чутливості до дії гормону в порівнянні з контрольною групою. У діабетичних тварин базальний рівень глюкози в крові після нічного голодування був статистично значущо підвищений і в усі інтервали часу після введення інсуліну (0,7 ОД/кг, **рис. 3.1А**). Концентрація глюкози в крові щурів контрольної групи під дією інсуліну досягала мінімальних значень через 45 хв (2,63 ммоль/л), в той час як в крові тварин з ЦД типу 2 – через 120 хв (7,50 ммоль/л). Площа під кривою, розрахована на підставі інсулінотолерантного тесту, збільшувалася в 3,8 рази у тварин з

експериментальним ЦД типу 2 в порівнянні з контролем, що вказує на істотне уповільнення утилізації глюкози периферичними тканинами через розвиток ІР (рис. 3.1Б).

А)



Б)



**Рис. 3.1.** Тест на толерантність до інсуліну у самців-щурів лінії Wistar, які отримували висококалорійну дієту та одноразову ін'єкцію стрептозотоцину (25 мг/кг), на 105-ту добу після початку експерименту. А – динаміка концентрації глюкози в крові щурів після внутрішньочеревинного введення інсуліну (0,7 Од/кг); Б – площа під кривою «час– концентрація глюкози». Дані представлено як  $M \pm m$ ; \* -  $p \leq 0,05$  у порівнянні з контролем; # -  $p \leq 0,05$  у порівнянні з ЦД2.

Тривалий прийом висококалорійної їжі, збагаченої жирами і вуглеводами, викликає ІР та порушення толерантності до глюкози, в першу чергу, в результаті розвитку ожиріння і дисліпідемії. Зокрема відомо, що інтенсивне надходження ВЖК з жирової тканини за рахунок активування ліполізу супроводжується більш вираженою ІР та погіршенням перебігу ЦД [208]. Високі концентрації ВЖК у сироватці крові призводять до збільшення внутрішньоклітинної концентрації ацил-КоА і диацилгліцерола, викликаючи активацію PKC- $\theta$  і фосфорилування інсулінового рецептора-1 (IRS-1) за залишком Ser307. Ці зміни гальмують активацію IRS-1-асоційованої PI3-кінази і пригнічують стимулювання інсуліном глюкозотранспортної системи [209]. ВЖК також пригнічують окислення глюкози (глюкозо-жирнокислотний цикл Рендла), підтримуючи і посилюючи стан ІР [210]. У свою чергу, гіперглікемія та оксидативний стрес сприяють виснаженню пулу інсуліну в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози та індукують їх загибель [211]. Крім того, інтенсивне надходження ВЖК з жирової тканини до гепатоцитів призводить до їх посиленого включення в триацилгліцероли, збільшення синтезу ліпопротеїнів дуже низької щільності та порушення рецепції інсуліну, що ще більше посилює розвиток ІР [212].

У відповідності із зазначеними спостереженнями, нами показано, що у тварин з ЦД типу 2 в 2,7 рази збільшувався вміст циркулюючих загальних ліпідів, майже в 2 рази – ВЖК і в 4 рази – ТГ. Ці зміни ліпідного обміну головним чином обумовлені стимулюванням ліполізу в жировій тканини, викликаного ІР, та ймовірно вторинним посиленням синтезу ТГ у печінці. Рівень загального холестерину в плазмі крові діабетичних тварин також суттєво підвищувався в порівнянні з контролем в 3,9 рази.

Порушення вуглеводного і ліпідного обміну за ЦД типу 2 супроводжувалося активацією катаболізму протеїнів. На це вказує незначне, але статистично значуще, зменшення рівня загального протеїну в сироватці крові (табл. 3.2). Виконуючи функцію білкового резерву організму, його дефіцит може свідчити про інтенсифікацію протеолізу не тільки за рахунок

протеїнів крові, але також м'язів і печінки. На тлі зниження загального рівня протеїну в сироватці крові діабетичних щурів, нами було встановлено також зменшення вмісту альбуміну на 12,6 %, одного з важливих біохімічних маркерів хронічних захворювань печінки. Нестача альбуміну в сироватці сигналізує про серйозне погіршення синтетичної здатності печінки за умов ЦД типу 2 [213]. Більш того, додатковим свідченням дисфункції печінки у тварин з експериментальним ЦД типу 2 є підвищення активності АЛТ на 41%. При цьому активність АСТ істотно не відрізнялася від показників контрольної групи (табл. 3.2). Підвищення активності печінкових ензимів, як правило, знаходиться в позитивній кореляції з порушенням структурно-функціональної цілісності клітинних структур печінки і прискореним виходом ензимів в загальний кровотік [151].

Виявлені зміни можуть, з одного боку, відображати вторинні порушення функції печінки, асоційовані з розвитком ЦД типу 2, а саме НАЖХП, а з іншого сприяти подальшому розвитку ІР та прогресуванню ЦД типу 2. У ряді клініко-експериментальних досліджень було показано, що виражена ІР може виникати при хронічній печінковій недостатності, яка викликана вірусними гепатитами В і С, а також після часткової гепатектомії [214]. Відомо, що при хронічних дифузних захворюваннях печінки ІР може бути обумовлена зменшенням кількості функціонально активних клітинних елементів, що є причиною зниження екстракції і метаболічного кліренсу інсуліну печінкою, пролонгованої гіперінсулінемії після прийому їжі і зменшення глікогенної ємності печінки [215].

Дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> пов'язують із ризиком виникнення різних хронічних захворювань, у тому числі ЦД та його ускладнень [183]. Більш того, терапевтичне застосування вітаміну D<sub>3</sub> у клінічній практиці призводило до часткової корекції порушеної толерантності до глюкози та гальмування розвитку ЦД як 1, так і 2 типу [216]. Це обумовило доцільність подальшого з'ясування механізмів протидіабетичної та цитопротекторної дії вітаміну D<sub>3</sub> на експериментальній моделі ЦД типу 2 у щурів.

Терапія вітаміном D<sub>3</sub> в дозі 780 МО/кг маси тіла упродовж 30 діб, підвищуючи чутливість периферичних тканин до інсуліну, сприяла посиленню утилізації глюкози в них, що проявлялося компенсацією вуглеводного обміну у тварин з ЦД типу 2. Так, базальний рівень глюкози знижувався на 16% під дією вітаміну D<sub>3</sub> (табл. 3.2). Дослідження глікемічної реакції на ін'єкцію інсуліну показало, що площа під кривою при проведенні тесту на толерантність до інсуліну знижувалася на 11,5% після введення холекальциферолу в порівнянні з групою діабетичних тварин (рис. 3.1). Вітамін D<sub>3</sub>, ймовірно опосередковано через виявлене підвищення чутливості периферичних тканин до інсуліну, модифікував ліполіз і ліпідний обмін в цілому, приводячи до часткового зниження рівня загальних ліпідів, ТГ, ВЖК і ЗХС в сироватці крові діабетичних щурів відповідно у 1,63, 2,27, 1,32 та 1,35 рази (табл. 3.2). При цьому холекальциферол, сповільнюючи динаміку втрати ваги діабетичних тварин, наближав цей показник до значень контрольної групи. Нарешті, введення вітаміну D<sub>3</sub> підвищувало рівень альбуміну та частково нормалізувало активність АЛТ в сироватці крові (табл. 3.2).

Таким чином, під дією вітаміну D<sub>3</sub> було виявлено помірне підвищення чутливості тканин до інсуліну, що супроводжувалося зниженням рівня глюкози і ліпідів у сироватці крові, а також частковою корекцією білкового обміну у експериментальних тварин з ЦД типу 2. Крім того, за біохімічним маркером активності АЛТ в сироватці крові було продемонстровано гепатопротекторну дію холекальциферолу в нормалізації порушень структурно-функціональної цілісності клітинних структур печінки.

Конкретні молекулярні механізми реалізації встановлених терапевтичних ефектів вітаміну D<sub>3</sub> залишаються не до кінці зрозумілими. На сьогодні доведено здатність вітаміну безпосередньо посилювати синтез інсуліну і його вивільнення з  $\beta$ -клітин підшлункової залози, а також збільшувати експресію рецептора інсуліну в периферичних тканинах [217]. Беручи участь в реалізації імунної функції і регулюванні цитокінових систем, опосередковано через зниження хронічного системного запалення в організмі,

вітамін D<sub>3</sub> може також чинити позитивний вплив на ожиріння та IP, а також захищати острівцеві β-клітин підшлункової залози від автоімунного руйнування [218]. До того ж можна вважати, що важливе місце в регулюванні інсулінової функції займає і модуляторний вплив вітаміну D<sub>3</sub> на пост-рецепторні події, тобто на здатність клітин периферичних тканин відповідати на дію гормону після зв'язування з рецептором.

Отже, при годуванні щурів дієтою з високим вмістом жирів і вуглеводів, а також одноразовому введенні стрептозотоцину в низькій дозі (25 мг/кг), надійно відтворюються патологічні процеси, характерні для ЦД типу 2. На даній моделі простежуються основні прояви порушень вуглеводного, ліпідного і білкового обміну, асоційовані з розвитком ЦД2, і продемонстровано ефективність терапевтичного застосування холекальциферолу в їх корекції. Створена модель є певною модифікацією існуючих патогенетично обґрунтованих моделей ЦД типу 2 з вираженою IP і відносним дефіцитом інсуліну [207]. Вона може успішно використовуватися для вивчення патогенезу ЦД типу 2 і вторинних порушень гепатобіліарної системи, а також для дослідження гепатопротекторної дії вітаміну D<sub>3</sub>.

### **3.2 NF-κB-асоційовані прооксидантні і прозапальні процеси у печінці за ЦД типу 2 та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>**

Оксидативний стрес, пов'язаний з підвищеним утворенням АФК і зниженням ефективності системи антиоксидантного захисту, привертає пильну увагу дослідників як один з універсальних механізмів деструктивних змін в патогенезі різних хронічних захворювань печінки [219]. Щоб з'ясувати можливе залучення прооксидантних процесів в розвиток гепатоцелюлярної дисфункції, асоційованої з ЦД типу 2, ми дослідили рівень генерування вільних радикалів у первинній культурі гепатоцитів. За допомогою АФК-чутливого зонду DCFH-DA було виявлено, що ЦД типу 2 призводить до збільшення утворення АФК в ізольованих гепатоцитах (рис. 3.2). Про це

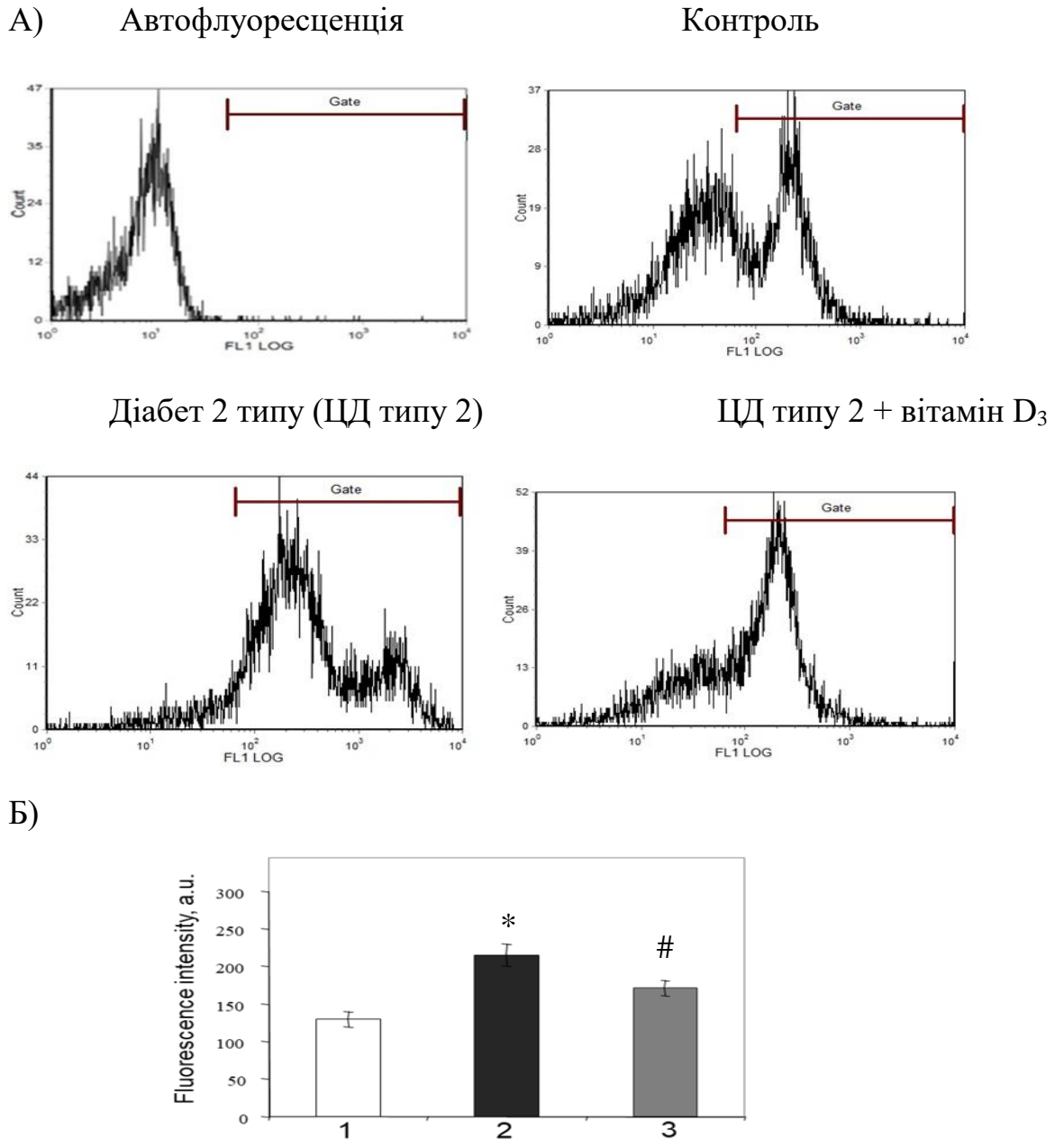


свідчить посилення інтенсивності флуоресценції окисленої форми зонду, DCF, майже на 70% в порівнянні з контрольними тваринами. Терапевтичне застосування вітаміну D<sub>3</sub> знижувало на 23% рівень продукування АФК ізольованими гепатоцитами у порівнянні з ЦД типу 2, що узгоджується з даними літератури про антиоксидантну дію цієї сполуки [220, 221].

Стратегічне положення на перехресті різних сигнальних шляхів у нормі та за патології займає ядерний фактор транскрипції κВ (NF-κВ) – клітинний сенсор оксидативного стресу і ключовий регулятор імунної відповіді, процесів запалення, виживання та апоптотичної загибелі клітин [222]. Індуковані ЦД типу 2 зміни активності NF-κВ і асоційованих з ним сигнальних шляхів можуть бути центральними молекулярно-клітинними подіями в розвитку дисфункції печінки. Однак, на сьогодні залишається не до кінця з'ясованими патофізіологічні наслідки порушення експресії NF-κВ у тканині печінки за ЦД типу 2, а також роль сигнальної системи NF-κВ у механізмі реалізації протидіабетичних та гепатопротекторних ефектів вітаміну D<sub>3</sub>.

Як відомо, найбільш поширена форма NF-κВ складається з великої субодиниці RelA (p65), яка формує гетеродимер зі структурно спорідненим протеїном p50. За звичайних умов димер NF-κВ знаходиться в цитоплазмі у неактивному комплексі з IκВ (інгібітором NF-κВ). У відповідь на дію клітинних стимулів активується АФК-залежна кіназа IκВ (ІКК), яка фосфорилує IκВ, що призводить до протеасомної деградації останнього. NF-κВ вивільнюється з інгібіторного комплексу, фосфорилується за специфічними залишками амінокислот та транслокується до ядра, де зв'язуючись зі специфічними послідовностями ДНК, регулює експресію різних генів [222, 223]. Вважається, що в імунних клітинах та резидентних макрофагах печінкової тканини транскрипційне активування NF-κВ сприяє індукції генів, які опосередковують запальні та проапоптотичні процеси, у той час як у гепатоцитах за дії патогенетичних стимулів (зокрема прозапальних цитокінів) може формуватися захисна відповідь – NF-κВ-опосередкована індукція генів виживання клітин [223]. Таке положення NF-κВ у регулюванні

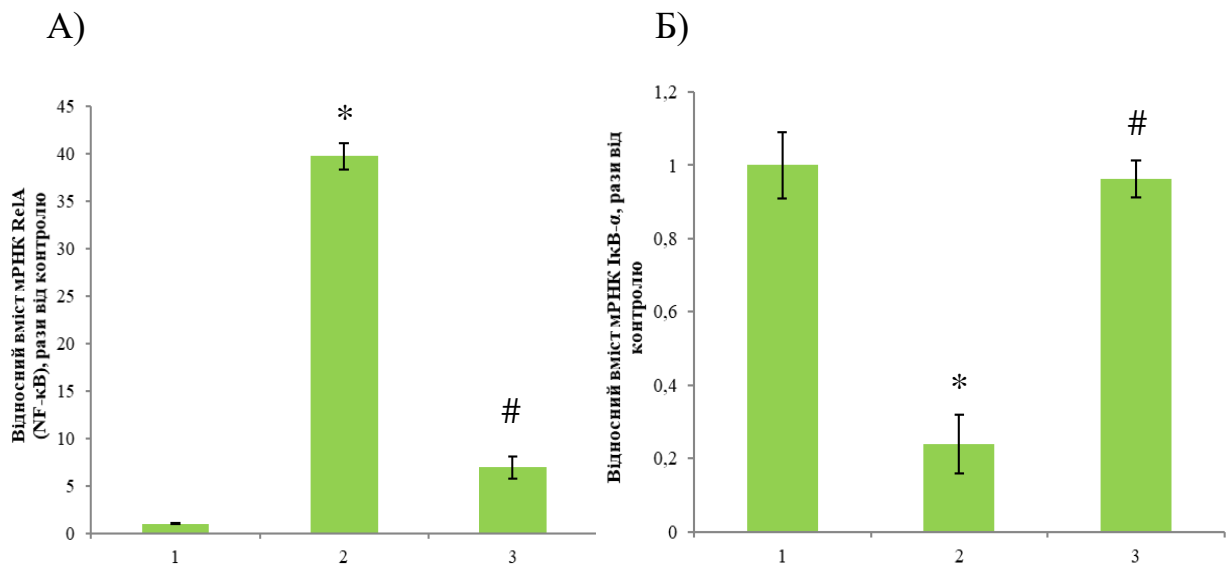
клітинних функцій дає можливість розглядати рівень експресії даного транскрипційного фактору та його активність в якості одного з найбільш універсальних та надійних маркерів розвитку оксидативно-нітрозативного стресу та прозапальних процесів у різних тканинах, включаючи печінкову [224].



**Рис. 3.2.** Рівень DCF-чутливого утворення активних форм кисню в ізольованих гепатоцитах за ЦД типу 2 та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>. Цитофлуорограми окислення DCFH-DA (count - кількість подій; FL1 LOG - інтенсивність флуоресценції). А – кількісний аналіз цитофлуорограм;

Б – 1 – контроль; 2 – ЦД типу 2; 3 – ЦД типу 2 + вітамін D<sub>3</sub>. Дані представлено як  $M \pm m$ ; \* -  $p \leq 0,05$  у порівнянні з контролем; # -  $p \leq 0,05$  у порівнянні з ЦД типу 2.

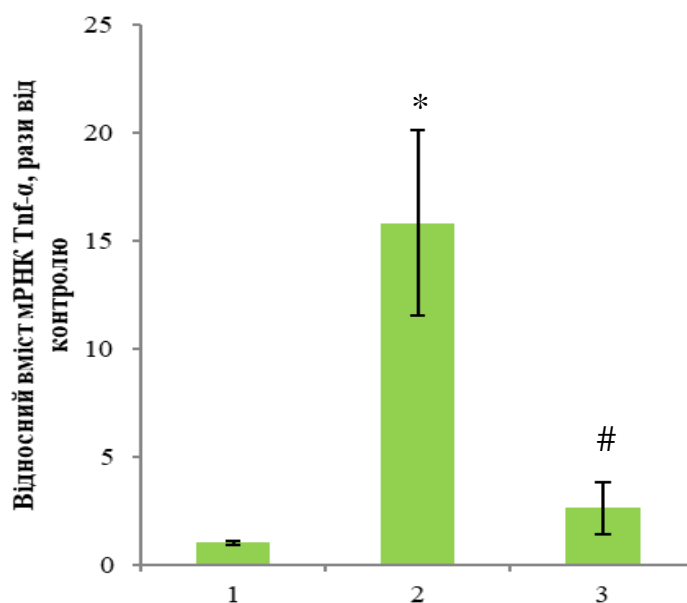
З використанням методу ПЛР у реальному часі, нами було показано, що розвиток ЦД 2 типу супроводжується надзвичайно вираженим зростанням вмісту мРНК *p65*, найпоширенішої субодиниці NF-κB, у печінці порівняно з контролем (**рис. 3.3А**). Посилення активування класичного каскаду NF-κB на транскрипційному рівні підтверджується також істотним зниженням у тканині печінки вмісту мРНК *IκB-α* у 3,3 рази (**рис. 3.3Б**). Продукт трансляції цього гену, протеїн IκB-α, як зазначалось, знаходиться у комплексі з NF-κB і, таким чином, перешкоджає його транслокації з цитозолу до ядра. Імовірна нестача протеїну IκB-α внаслідок пригнічення експресії його гену, сприятиме зняттю інгібіторного контролю активування і ядерної транслокації NF-κB з боку IκB-α.



**Рис. 3.3.** Експресія (А) мРНК *p65* (RelA) NF-κB та (Б) мРНК *IκB-α* у печінці щурів за цукрового діабету 2 типу та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>: 1 - контроль; 2 - діабет; 3 – діабет + вітамін D<sub>3</sub>. Дані представлено як  $M \pm m$ ; \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем, # -  $p < 0,05$  порівняно з ЦД2.

Отже, сукупно ці дані можуть свідчити про потенційне зростання транскрипційного активування NF-κB та залежної від нього експресії індукцйбельних генів, продукти яких можуть бути залучені в моделювання запальної відповіді, розвиток прооксидативних процесів та інтенсифікацію шляхів апоптотичної загибелі клітин. У порівнянні з тваринами із ЦД типу 2, введення вітаміну D<sub>3</sub> істотно пригнічувало синтез мРНК *p65* NF-κB, з одночасним підвищенням рівня мРНК *IκB-α* майже до контрольних значень. Ці дані чітко демонструють інгібувальну дію холекальциферолу на посилене за умов ЦД типу 2 активування сигнальних шляхів NF-κB. Як показують нещодавні дослідження, холекальциферол є негативним регулятором транскрипційної активності NF-κB на геномному рівні, ефекти якого опосередковуються через рецептори вітаміну D (VDR) [225].

З метою подальшого з'ясування молекулярних механізмів зростання експресії NF-κB за ЦД типу 2, досліджено можливість залучення одного із ключових модуляторів NF-κB-асоційованих сигнальних каскадів, а саме представника сімейства прозапальних цитокінів – фактору некрозу пухлин-альфа (TNF-α). Крім клітин імунної системи (головним чином моноцитів і макрофагів), адипоцити, ендотеліоцити, а також гепатоцити вважаються найважливішими джерелами синтезу TNF-α в тваринному організмі [226]. TNF-α є позаклітинним протеїном, отже його загальний пул у печінці може включати як локально синтезований в її тканині цитокін, так і той, що потрапляє до печінки із загального кровообігу. З огляду на це, ми вважали за доцільне визначення не стільки вмісту протеїну TNF-α у печінці, скільки його експресію на транскрипційному рівні (за матричною РНК), що дало б змогу найбільш адекватно оцінити індуковані діабетом зміни функціонування даної цитокінової системи саме у тканині печінки.



**Рис. 3.4.** Експресія мРНК *Tnf-α* у печінці щурів за ЦД типу 2 та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>: 1 - контроль; 2 - діабетичні тварини; 3 - діабетичні тварини, які отримували вітамін D<sub>3</sub>. Дані представлені у вигляді -  $M \pm m$ ; \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем, # -  $p < 0,05$  порівняно з ЦД типу 2.

На **рис. 3.4** продемонстровано збільшення у печінці діабетичних щурів вмісту мРНК прозапального цитокіну *Tnf-α* більш ніж 15 разів в порівнянні з контролем, що корелює з виявленим нами підвищення синтезу мРНК *p65 NF-κB*. У свою чергу з літературних джерел відомо, що підвищення синтезу TNF- $\alpha$  може стимулювати продукування й інших цитокінів, що залучені до активування лейкоцитів та подальшого розвитку запалення – IL-1, IL-6, IL-8 та інтерферон-гамма (INF- $\gamma$ ) [227]. Крім того, встановлене раніше іншими авторами підвищення за ЦД типу 2 рівня TNF- $\alpha$  в сироватці крові також вказує на системне хронічне запалення, асоційоване з розвитком даного захворювання [228]. Показано, що введення вітаміну D<sub>3</sub> призводило до зниження (в 5,3 рази) вмісту мРНК *Tnf-α* у тканині печінки (**рис. 3.4**), що узгоджується з його протизапальною дією та може бути додатковим чинником, який обумовлює інгібування посиленої експресії NF- $\kappa$ B за діабету.

Варто зазначити, що сімейство цитокінів фактору некрозу пухлин, у першу чергу TNF- $\alpha$ , займає провідне положення не тільки в здійсненні

імунних функцій і в розвитку метаболічного запалення, але і є одним з основних регуляторів енергетичного гомеостазу в цілому та найважливішим медіатором ІР [229]. Реалізуючи свою ліполітичну функцію шляхом регулювання експресії низки генів ліпідного обміну в адипоцитах, TNF- $\alpha$  координує функціональну взаємодію між жировою тканиною і інсулінозалежними органами і тканинами, зокрема поперечно-смугастою мускулатурою та печінкою [230]. Рівень експресії TNF- $\alpha$  характеризується високою позитивною кореляцією зі ступенем ожиріння і гіперінсулінемії. З сучасних позицій основний внесок TNF- $\alpha$  в розвиток ІР полягає в зниженні тирозинкіназної активності рецептора інсуліну і фосфорилування залишку серину в його субстраті IRS-1, що в свою чергу призводить до ослаблення трансдукції інсулінового сигналу [231]. Отже, продемонстровану нами посилену експресію TNF- $\alpha$  у печінці можна також розглядати як один із додаткових патогенетичних чинників розвитку ІР та ЦД типу 2.

Отримані результати вказують на те, що за умов експериментального ЦД типу 2 підвищення експресії багатofункціонального прозапального цитокіну TNF- $\alpha$  може сприяти активуванню в тканині печінки транскрипційної системи NF- $\kappa$ B, однак відкритим залишається питання за рахунок яких саме типів клітин це може відбуватись. Враховуючи, що на 80-85% печінкова тканина складається з гепатоцитів, а решту 15-20% становлять клітини Купфера (спеціалізовані макрофаги печінки) і ендотеліоцити, то доцільно припустити, що основний внесок у загальний пул експресії NF- $\kappa$ B у тканині печінки здійснюють саме гепатоцити. Проте, функціональна роль сигнального каскаду NF- $\kappa$ B у цих клітинах потребує подальших досліджень. Введення холекальциферолу діабетичним тваринам виявило коригувальну дію вітаміну на вміст РНК-транскриптів *Tnf- $\alpha$*  та ключових компонентів транскрипційної системи NF- $\kappa$ B (*p65* та *I $\kappa$ B- $\alpha$* ) у печінці, що в цілому узгоджується з літературними даними про важливу біорегуляторну роль вітаміну D<sub>3</sub> у модуляції окисного метаболізму та пригніченні прозапальних реакцій в різних тканинах тваринного організму, а беручи до уваги роль TNF- $\alpha$  як фактору

регулювання енергетичного гомеостазу – і в опосередкованій через зниження рівня TNF- $\alpha$  корекції дисфункції інсулінових рецепторів та гіперглікемії [230, 231].

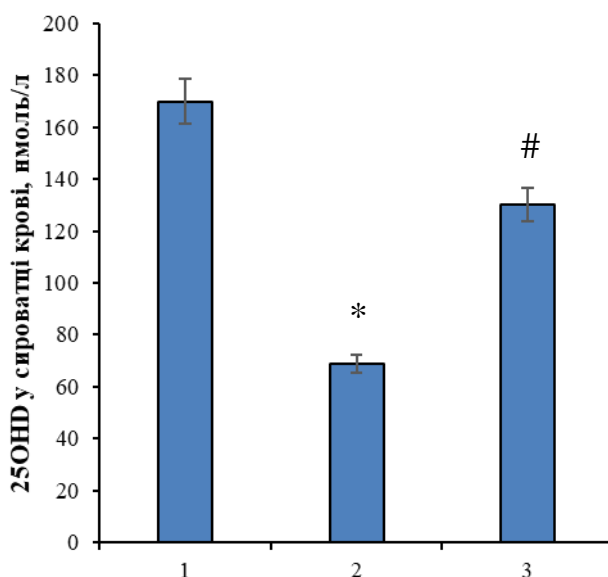
### **3.3 Дослідження стану вітамін D-авто-/паракринної системи печінки за експериментального ЦД типу 2 та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>**

З'являється все більше клінічних та експериментальних даних щодо гепатопротекторної дії вітаміну D<sub>3</sub> при лікуванні хронічних захворювань печінки, асоційованих з розвитком ЦД типу 2. Традиційні уявлення стосовно участі вітаміну D<sub>3</sub> в регулюванні процесів ремоделювання та мінералізації кісткової тканини останнім часом доповнені новими даними, які розширюють розуміння плеiotропних ефектів цього біоактивного стероїду, який регулює різні види обміну, проявляє протизапальну, імуномодуляторну дію та потужно впливає на процеси диференціювання, проліферування і апоптозу клітин [232]. Ця сполука реалізує біологічні ефекти за механізмом гормональної дії свого біоактивного похідного – 1,25-дигідроксивітамін D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, кальцитріол), який через специфічні рецептори (VDR) забезпечує транскрипційне регулювання експресії значної кількості генів у клітинах тваринного організму [225, 233].

Стан тканинної експресії цитохромів, відповідальних за утворення активних гідроксильованих похідних холекальциферолу, може відігравати істотну роль у порушенні biodоступності вітаміну D<sub>3</sub> та VDR-опосередкованого клітинного сигналювання за ЦД типу 2 та у механізмі гепатопротекторної дії холекальциферолу. Проте характер змін у експресії даних ізоензимів, а також рецептору вітаміну D<sub>3</sub>, у нормі та за патологій, розвиток яких тісно пов'язаний з недостатньою забезпеченістю організму вітаміном D<sub>3</sub>, є одним з недостатньо з'ясованих питань. З огляду на це, нашим наступним завданням було дослідження змін експресії ключових компонентів

вітамін D-авто-/паракринної системи печінки, асоційованих з експериментальним ЦД типу 2 та з'ясування ефективності вітаміну D<sub>3</sub> у їх корекції.

Показано, що ІР та гіперглікемія за експериментального ЦД типу 2 супроводжуються зниженням вмісту 25(OH)D, надійного маркера забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub>, у сироватці крові у 2,4 рази у порівнянні з контролем, що вказує на розвиток у діабетичних тварин вираженого D<sub>3</sub>-дефіциту (**рис. 3.5**). Введення вітаміну D<sub>3</sub> за цукрового діабету сприяло нормалізації вмісту 25(OH)D у сироватці крові майже до контрольних значень.



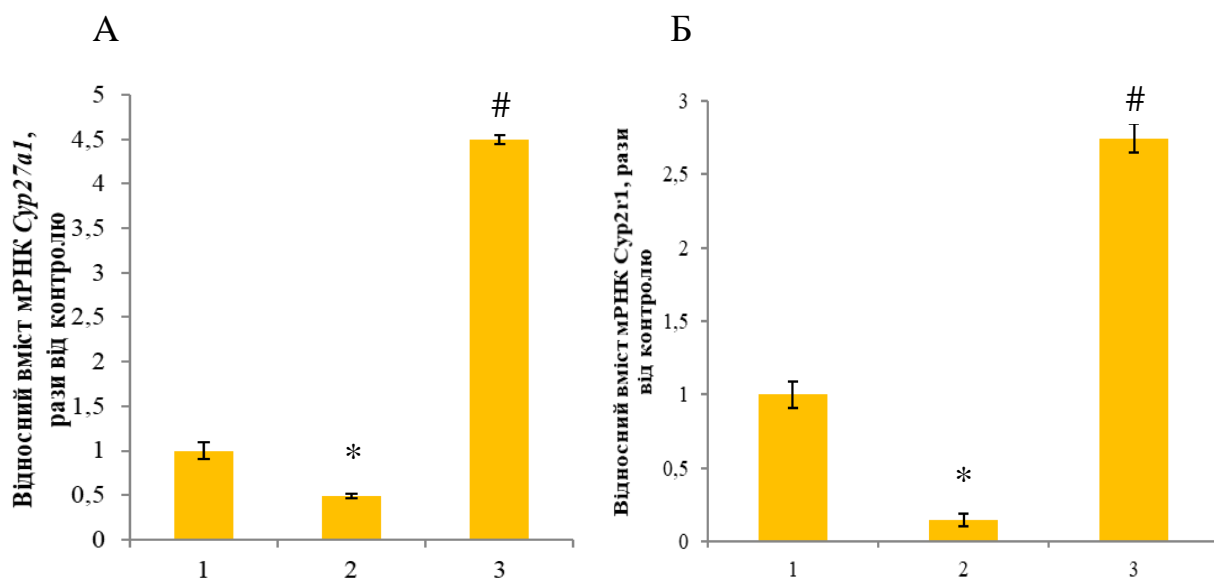
**Рис. 3.5.** Вміст 25(OH)D у сироватці крові щурів за ЦД типу 2 та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>. 1 – контроль; 2 – діабет; 3 – діабет + вітамін D<sub>3</sub>. Дані представлено як  $M \pm m$ ; \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем, # -  $p < 0,05$  порівняно з ЦД типу 2.

На сьогодні відомо щонайменше 6 ізоензимів з 25ОН-гідроксилазною активністю, серед яких CYP2C11, CYP2D25, CYP3A4, CYP2J1, CYP27A1 і CYP2R1 [234], однак найважливішими з них є CYP27A1 та CYP2R1, що експресуються у печінці та тканинах деяких інших органів і локалізовані у



мітохондріях і мікросомах відповідно. Оскільки перетворення холекальциферолу у 25ОНD переважно каталізують дві ізоформи цитохрому P450 (CYP27A1 та CYP2R1), то нашим наступним кроком стало з'ясування зв'язку між дефіцитом 25ОНD за ЦД типу 2 та змінами вмісту саме цих цитохромів у тканині печінки.

Нами встановлено, що рівень експресії мРНК *Cyp27a1* та *Cyp2r1* у печінці діабетичних щурів знижувався відповідно у 2 та 5 разів у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 3.6). При цьому, найбільш вираженої зміни зазнавала експресія ізоформи *Cyp2r1* як основного гідроксильюючого протеїну, що за даними літератури функціонує за більш низьких концентрацій субстрату – холекальциферолу. При введенні вітаміну D<sub>3</sub> спостерігалось значне підвищення вмісту мРНК як *Cyp27a1*, так і *Cyp2r1* (до значень, що відповідно більш ніж у 4,5 та 2,7 рази перевищують показники контролю) у порівнянні з ЦД типу 2.



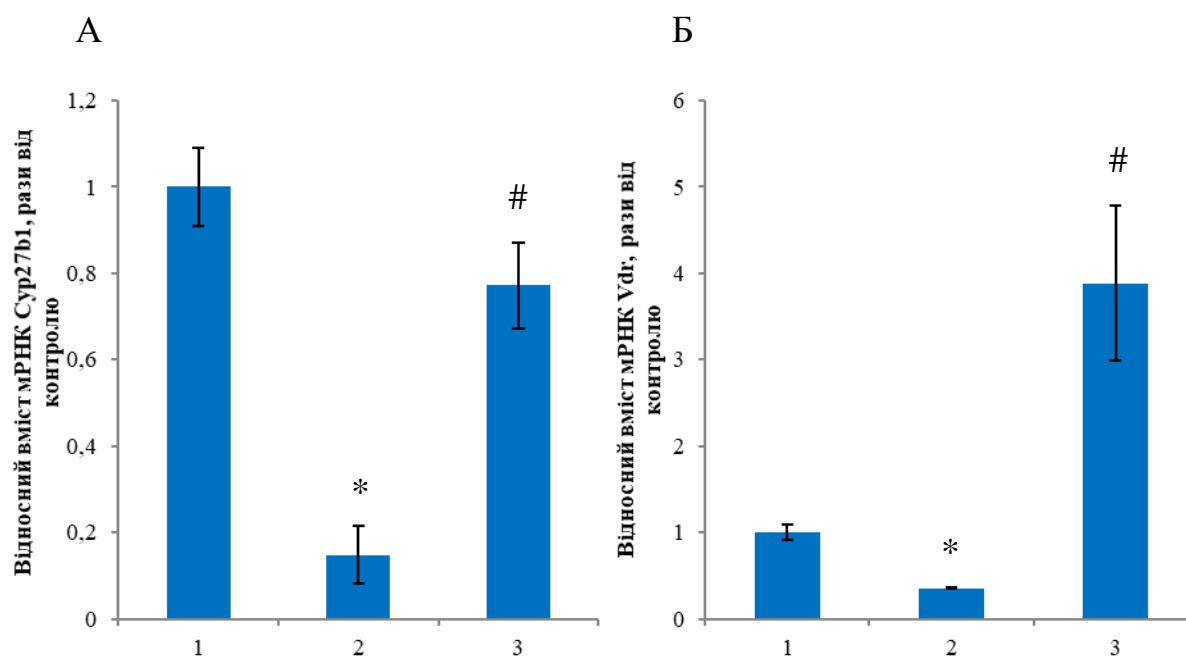
**Рис. 3.6.** Рівень мРНК вітамін D 25-гідроксилаз *Cyp27a1* (А) та *Cyp2r1* (Б) у печінці щурів за цукрового діабету 2 типу та при введенні вітаміну D<sub>3</sub>. 1 - контроль; 2 – ЦД типу 2; 3 - ЦД типу 2 + вітамін D<sub>3</sub>. Дані представлено як  $M \pm m$ ; \* -  $p < 0.05$  у порівнянні з контролем; # -  $p < 0.05$  у порівнянні з ЦД типу 2.

Оскільки активність мітросомального ізоензиму може інгібуватись продуктом реакції – 25(OH)D, то виявлений більш низький приріст експресії мРНК даного цитохрому цілком може бути результатом такого ефекту 25(OH)D на транскрипційному етапі синтезу CYP2R1. Мітохондріальна вітамін D 25-гідроксилаза (CYP27A1) функціонує при концентраціях субстрату вищих за фізіологічну [235]. Тому цілком обґрунтованим є продемонстроване більш виражене зростання вмісту мРНК *Cyp27a1* за введення тваринам вітаміну D<sub>3</sub> у високій терапевтичній дозі, що безпосередньо впливає на забезпечення надмірної інтенсивності процесів гідроксилювання холекальциферолу у гепатоцитах під дією цього цитохрому.

Наступним нашим етапом було дослідження експресії печінкової ізоформи 1 $\alpha$ -гідроксилази (CYP27B1), яка відповідає за синтез D-гормону кальцитріолу, який опосередковано через рецептори VDR забезпечує реалізацію функцій вітаміну D локально в різних тканинах організму [236]. Наші результати продемонстрували 5,8-разове зниження рівня мРНК *Cyp27b1*, **рис. 3.7А**. Порушення експресії *Cyp27b1*, швидше за все, є наслідком дефіциту вітаміну D і недостатнього продукування прогормону 25(OH)D в печінці діабетичних тварин. Введення холекальциферолу значно послаблювало (4,6-разове зростання рівня мРНК) негативний вплив діабету на синтез CYP27B1 в печінкової тканини, що також вказує на зв'язок цих змін з порушеною біодоступністю вітаміну D.

Механізм дії 1,25(OH)<sub>2</sub>D реалізується шляхом зв'язування зі специфічним клітинним рецептором гормону – VDR, членом надсімейства ядерних рецепторів стероїдних гормонів з класичною доменною структурою. Зв'язування ліганду індукує конформаційні зміни VDR, які сприяють гетеродимеризації з ретиноїдним X рецептором (RXR) і рекрутуванню до комплексу VDR-RXR ряду протеїнів, включаючи членів надсімейства коактиваторів стероїдних гормонів, а також мультимембранний коактиваторний комплекс протеїнів, що взаємодіють з D-рецепторами (DRIP, vitamin D receptor (VDR)-interacting proteins). Ці коактиватори викликають

ремоделювання хроматину через властиву гістонам модифікаційну активність, яка направлена на ключові компоненти ініціації транскрипції та регулювання промоторних ділянок. Таким чином, VDR функціонує як ліганд-керований транскрипційний фактор, який зв'язується з VDRE (елементами, чутливими до вітаміну D) у промоторних ділянках багатьох генів, в кінцевому рахунку, впливає на швидкість їх транскрипції РНК-полімеразою II [233, 237]. Разом з тим у реалізації ефектів 1,25-дигідроксивітаміну  $D_3$ , пов'язаних з транспортуванням  $Ca^{2+}$ , можливо, мають місце також негеномні механізми, що продемонстровано і для інших стероїдних гормонів [238]. Однак частина цих ефектів також реалізується через VDR.



**Рис. 3.7.** Рівень мРНК 25(OH)D-1 $\alpha$ -гідроксилази *Cyp27b1* (А) та *Vdr* (Б) у печінці щурів за ЦД типу 2 та при введенні вітаміну  $D_3$ . 1 - контроль; 2 – ЦД типу 2; 3 – ЦД типу 2 + вітамін  $D_3$ . Дані представлено як  $M \pm m$ ; \* -  $p < 0.05$  у порівнянні з контролем; # -  $p < 0.05$  у порівнянні з ЦД типу 2.

З огляду на розповсюдженість VDR у різних типах клітин і його ключову роль у забезпеченні гормональних ефектів 1,25(OH) $_2D_3$ , ми надалі вивчали експресію VDR у тканині печінки. Встановлено, що за ЦД типу 2 вміст мРНК

*Vdr* значно (в 3 рази) знижувався в цій тканині, що може свідчити про істотне порушення VDR-опосередкованого сигналювання у чутливих до дії вітаміну D<sub>3</sub> клітинах (рис. 3.7Б). Було виявлено виражений стимулюючий ефект вітаміну D<sub>3</sub> на експресію мРНК *Vdr*, яка досягала рівня в 4 рази вищого, ніж у контролі. Не виключено також, що встановлене нами пригнічення експресії всіх досліджуваних компонентів вітамін D-авто-/паракринної системи печінки може обумовлюватись посиленням оксидативним ушкодженням та загибеллю гепатоцитів. Цитохромові системи саме цих клітин забезпечують ключові етапи біотрансформації холекальциферолу (у першу чергу утворення 25(OH)D), а через VDR здійснюється біологічне сигналювання його гормонально активної форми на авто-/паракринному рівні регулювання функцій клітин печінки.

Таким чином, нами показано, що розвиток експериментального ЦД типу 2 у піддослідних тварин та хронічної дисфункції гепатобіліарної системи, виявлені в даному дослідженні, супроводжувались D-дефіцитним станом тварин. Фактор недостатнього рівня 25(OH)D у циркуляції та порушеного сигналювання через VDR може сприяти, в якості самостійних патогенетичних чинників, розвитку асоційованих з ЦД типу 2 патологічних змін у тканині печінки. Той факт, що істотна нормалізація біодоступності вітаміну D призводила також і до часткової корекції індукованих діабетом порушень багатьох видів обміну, прооксидантних і прозапальних процесів у тканині печінки, доводить, принаймні частково, суттєву роль D-дефіциту та дерегуляції вітамін D-авто-/паракринної системи в патогенезі ЦД типу 2 та діабетичних ускладнень. Важливим елементом індукованих діабетом змін є тісний зв'язок недостатності/дефіциту вітаміну D в організмі зі змінами VDR-залежних та NF-κB-асоційованих сигнальних шляхів у цитокиновій регуляції клітинних функцій у тканині печінки.

**Резюме:** В експериментальній частині використовували білих щурів-самців лінії Wistar вагою  $230 \pm 12$  г. Продемонстровано, що модель

експериментального ЦД типу 2 у щурів, характеризується розвитком ІР, порушеннями вуглеводного, ліпідного, білкового обміну та інтенсифікацію вільнорадикальних процесів, викликає ушкодження тканини печінки, що відбувається на тлі глибокого дефіциту вітаміну D<sub>3</sub> (зниження рівня 25(OH)D у сироватці крові).

Вперше встановлено, що дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> у тварин зумовлюється порушенням у синтезі компонентів вітамін D<sub>3</sub>-авто-/паракринної системи. За ЦД типу 2 відбувається значне пригнічення рівня експресії мРНК вітамін D-25-гідроксилази (*Cyp27a1*, *Cyp2r1*), 25(OH)D-1 $\alpha$ -гідроксилази (*Cyp27b1*) та рецептору вітаміну D (*Vdr*) у тканині печінки.

Виявлено, що недостатня забезпеченість організму експериментальних тварин вітаміном D<sub>3</sub> за умов ЦД типу 2 супроводжується істотною АФК-залежною індукцією експресії гену найбільш поширеної субодиниці NF- $\kappa$ B *p65* з одночасним зниженням рівня експресії інгібітору ядерного фактору NF- $\kappa$ B – *I $\kappa$ B- $\alpha$*  у тканині печінки, що може вказувати на активування NF- $\kappa$ B-опосередкованої транскрипції генів, продукти яких залучені в ключових подіях запальної відповіді та оксидативного ушкодження біоструктур. Також продемонстровано підвищення у тканині печінки експресії гену прозапального цитокіну *Tnf- $\alpha$* , асоційованого з транскрипційною системою NF- $\kappa$ B, що може бути свідченням розвитку оксидативного стресу, запальних реакцій та негативно позначатись на толерантності тканин організму до інсуліну.

Введення вітаміну D<sub>3</sub> тваринам із експериментальним ЦД типу 2, компенсуючи D<sub>3</sub>-дефіцитний стан, сприяло частковій нормалізації метаболічних процесів, незначному зниженню рівня глікемії, гальмуванню розвитку оксидативного стресу та ІР. Встановлено коригувальну дію вітаміну D<sub>3</sub> на стан вітамін D-авто-/паракринної системи та TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B сигнальний шлях тканини печінки, що реалізується на рівні транскрипційного регулювання експресії ключових генів даних систем. Блокування шляхів активування NF- $\kappa$ B та пригнічення запальних реакцій у печінці підкреслює

залежність розвитку оксидативного стресу та запалення від рівня забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub> та важливість антиоксидантного та протизапального компоненту в механізмі протидіабетичної та гепатопротекторної дії холекальциферолу.

## РОЗДІЛ 4

### Д ДЕФІЦИТ ТА ЗМІНИ МЕТАБОЛІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ТИПУ 2 ТА НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ

#### 4.1 Вивчення впливу D статусу на формування метаболічних порушень у пацієнтів із ЦД типу 2

На базі КМКЕЦ проведено одномоментне дослідження, в яке було включено 109 пацієнтів з ЦД типу 2 без НАЖХП. Основними критеріями включення були: вік від 18 до 75 років, наявність ЦД типу 2 встановленого згідно з критеріями ВООЗ [239], пацієнти, які до моменту включення отримували стабільну дозу інсуліну і/або пероральних гіпоглікемічних засобів щонайменше протягом 3 місяців та  $HbA1c < 12,0\%$ . Критерії виключення включали наявність ЦД 1 типу або вторинного діабету, злоякісних новоутворень і наявність в анамнезі гіперпаратиреозу, остеопорозу, нефролітіазу або гіперкальціємії. Також в дослідження не включали пацієнтів, які повідомили що за 3 місяця до початку, приймали протисудомні препарати або біологічні добавки із кальцієм чи вітаміном D<sub>3</sub>.

Всі пацієнти були розділені згідно сучасних рекомендацій Європейської ендокринологічної асоціації (ESE) щодо забезпеченості вітаміном D<sub>3</sub> [70] на 3 групи: група 1 (n = 11) – без встановленого дефіциту, з оптимальним рівнем вітаміну D (>30 нг/мл) - середній вік хворих склав  $57,45 \pm 8,49$ , тривалість ЦД –  $13,82 \pm 9,62$  роки; група 2 (n = 38) - недостатність вітаміну D (21-29 нг/мл) - середній вік пацієнтів  $61,97 \pm 9,79$ , тривалість ЦД –  $12,05 \pm 5,9$  років; та група 3 (n = 60) – дефіцит вітаміну D, який був діагностований при значенні <20 нг/мл - середній вік учасників  $60,43 \pm 10,47$ , тривалість ЦД –  $12,95 \pm 6,9$  років (табл. 4.1).

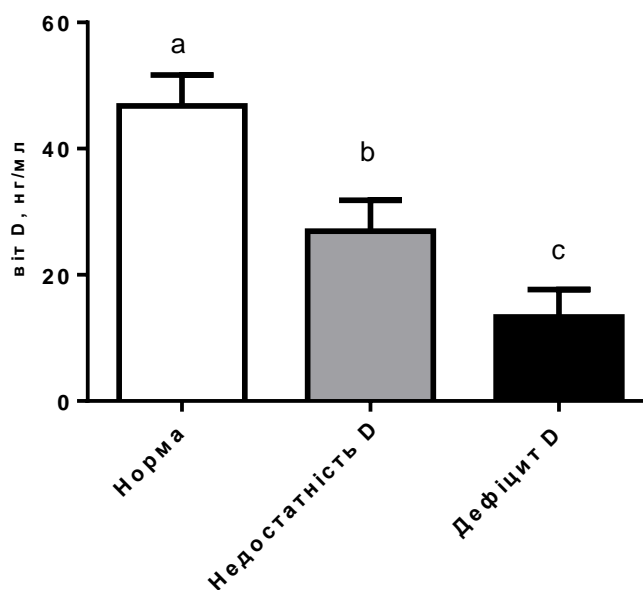
**Таблиця 4.1.** Базові антропометричні та клінічні параметри в обстежених пацієнтів

Показник	Норма (n=11)	p1	p2	D недостатність (n=38)	D дефіцит (n=60)	p3	p
Вік, роки	57,45±8,49	-	-	61,97±9,79	60,43±10,47	-	0,412
Тривалість ЦД, роки	13,82±9,621	-	-	12,05±5,90	12,95±6,9	-	0,705
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	29,19±3,52	-	-	31,10±5,27	32,92±6,82	-	0,107
ОТ, см	92,91±9,6	0,408	0,030	99,61±10,75	105,83±18,44	0,125	0,016
Метформін (n), %	7 (63,6)	-	-	32 (84,2)	50 (83,3)	-	0,264
Метформін, добова доза, мг	1292,85±526,33	-	-	1503,1±376,9	1535,8±437,4	-	0,317
Сульфонілсечовина, (%)	3 (27,3)	-	-	17 (44,7)	21 (35,0)	-	0,473
Інгібітори ДПП4, (%)	4 (36,4)	-	-	11 (28,9)	15 (25,0)	-	0,719

p - оцінка достовірності різниці між досліджуваними групами розрахована з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (One-Way ANOVA) або критерію Крускала-Уолліса. p 1-3 - для попарних порівнянь використано апостеріорний тест Тускеу. p1 – відмінність між оптимальним рівнем та D недостатністю. p2 – відмінність між оптимальним рівнем та D дефіцитом. p3 – відмінність між D недостатністю та дефіцитом. Вірогідною вважалася різниця при значенні p<0,05.

Групи хворих включені в дослідження не відрізнялися по віку (p=0,412) та статті. Між обстежуваними групами не відмічалось статистично достовірної різниці по тривалості ЦД типу 2 (p=0,705) **табл. 4.1**. Рівень сироваткового D<sub>3</sub> за групами представлено на **рис. 4.1**.

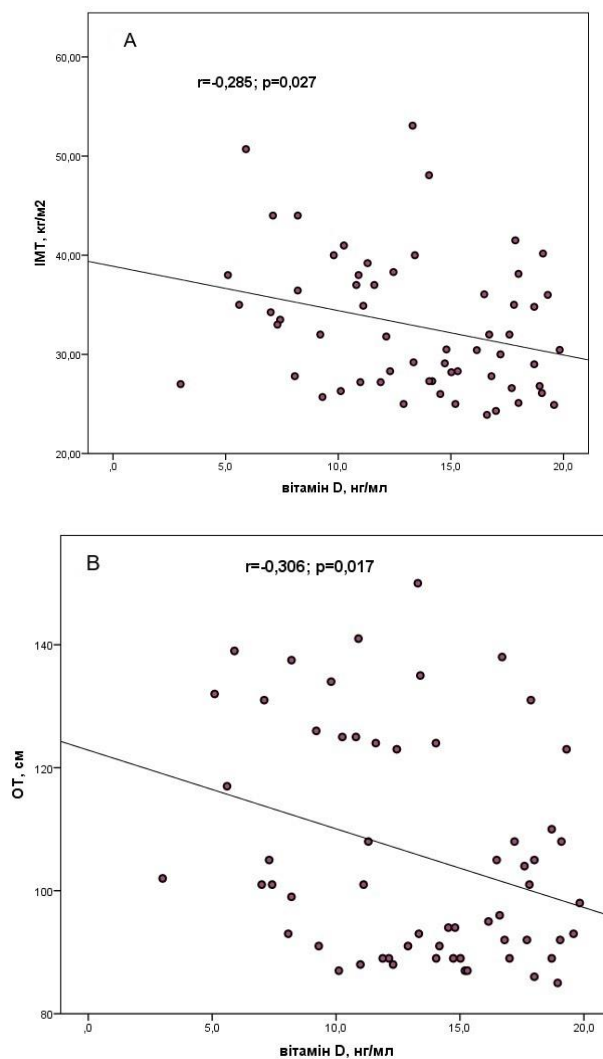




**Рис. 4.1.** Рівень вітаміну D у сироватці крові у пацієнтів досліджуваних груп. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . a, b, c - різні літери над двома стовпчиками діаграми відображають достовірні відмінності між відповідними двома групами ( $p < 0,05$ ).

ІМТ був підвищений у всіх пацієнтів, а його середнє значення зростало паралельно зі зменшенням концентрації вітаміну D в сироватці. Найвищий ІМТ спостерігався в групі дефіциту D –  $32,92 \pm 6,82 \text{ кг/м}^2$ , проте в порівнянні з пацієнтами інших обстежуваних груп статистично значущих відмінностей не виявлено ( $p = 0,107$ ). Поширеність ожиріння (визначалось як  $\text{ІМТ} > 30,0 \text{ кг/м}^2$ ) у пацієнтів із оптимальним рівнем D (група 1) склала 45,5% та відповідно 50,0% в групі з його недостатністю. Найвищу частоту ожиріння діагностовано у пацієнтів з дефіцитом D – 58,3%, проте статистично значущої різниці між групами по даному показнику не спостерігалось ( $p = 0,600$ ). Морбідне ожиріння ( $\text{ІМТ} > 40,0 \text{ кг/м}^2$ ) діагностовано лише у пацієнтів з зниженою концентрацією вітаміну D<sub>3</sub>. В групі з дефіцитом D морбідне ожиріння спостерігалось у 10 (16,7%) пацієнтів, що статистично достовірно не відрізнялось від групи недостатності D (група 2), в якій страждали даною патологією 2 (5,3%) учасників ( $p = 0,100$ ). З іншого боку, дефіцит вітаміну D асоційований з

вісцеральним ожирінням (табл. 4.2). Відмічено статистично значуще збільшення ОТ у групі дефіциту D в порівнянні з пацієнтами з його оптимальним рівнем ( $92,91 \pm 9,6$  проти  $105,83 \pm 18,44$  см,  $p=0,030$ ). Також ОТ в даній групі був вище в порівнянні із пацієнтами із недостатністю D, проте зміни були не достовірними ( $p=0,125$ ) [240].



**Рис. 4.2.** Кореляційний зв'язок між вітаміном D та антропометричними параметрами у пацієнтів із D дефіцитом. А – ІМТ; В – ОТ. ( $r$  – коефіцієнт кореляції по Пірsonу)

Встановлено, що лише в пацієнтів з D дефіцитом спостерігався зворотний кореляційний зв'язок середньої сили між вітаміном D<sub>3</sub> та ІМТ (рис. 4.2 А) і ОТ (рис. 4.2 В) [240].

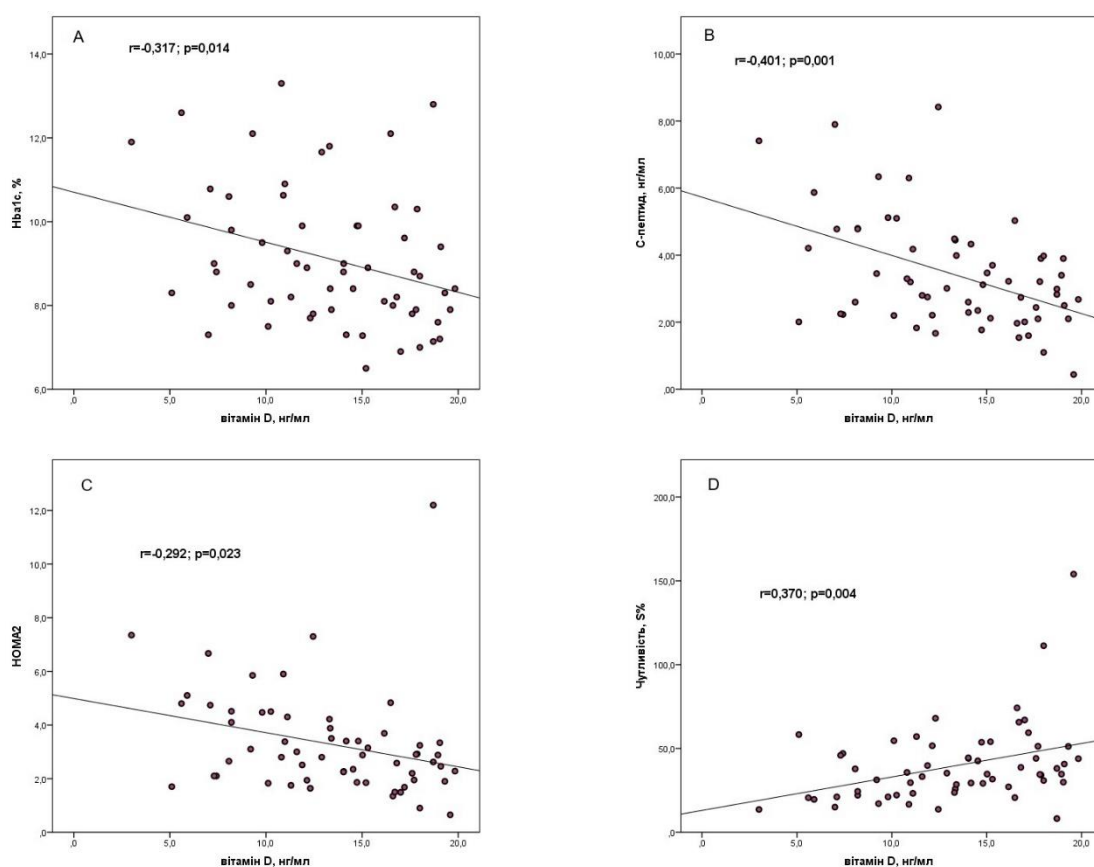
**Таблиця 4.2.** Базові лабораторні параметри в обстежених пацієнтів.

Показник	Норма (n=11)	p1	p2	D недоста тність (n=38)	D дефіцит (n=60)	p3	p
HbA1c, %	7,75± 1,06	0,156	0,016	8,69± 1,27	9,11± 1,63	0,354	0,017
C-пептид, нг/мл	2,37± 0,86	0,996	0,058	2,41± 0,96	3,41± 1,63	0,002	0,001
Глюкоза натще, ммоль/л	9,36± 2,13	-	-	9,99± 2,67	10,28± 2,92	-	0,579
НОМА2-IR	2,12± 0,71	0,963	0,057	2,25± 0,95	3,29± 1,89	0,004	0,002
Чутливість, %S	57,11± 32,07	0,965	0,138	54,69± 32,5	39,62± 23,41	0,027	0,016
Функція β- клітин, %B	51,06± 25,26	-	-	47,1± 26,67	60,92± 38,02	-	0,129
TyG індекс	4,95± 0,22	-	-	5,12± 0,32	5,17± 0,41	-	0,197
ЗХ, ммоль/л	5,65± 1,11	-	-	5,28± 1,04	5,81± 1,31	-	0,103
ТГ, ммоль/л	1,44± 0,60	0,358	0,048	2,18± 1,25	2,69± 1,87	0,284	0,039
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,63± 0,27	0,364	0,043	0,97± 0,56	1,21± 0,85	0,246	0,033
ЛПВЩ, ммоль/л	1,71± 0,28	-	-	1,43± 0,36	1,44± 0,43	-	0,105
ЛПНЩ, ммоль/л	3,30± 0,96	-	-	2,93± 0,72	3,15± 1,15	-	0,434

p - оцінка достовірності різниці між досліджуваними групами розрахована з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (One-Way ANOVA) або критерію Крускала-Уолліса. p 1-3 - для попарних порівнянь використано апостеріорний тест Tuckey. p1 – відмінність між оптимальним рівнем та D недостатністю. p2 – відмінність між оптимальним рівнем та D дефіцитом. p3 – відмінність між D недостатністю та дефіцитом. Вірогідною вважалася різниця при значенні  $p < 0,05$ .

Найбільш важке порушення вуглеводного обміну діагностовано у пацієнтів з дефіцитом вітаміну D (табл. 4.2). Згідно отриманих результатів ми спостерігали практично ідентичні значення індексу НОМА2-IR (2,12±0,71 проти 2,25±0,95,  $p=0,963$ ) та чутливості до інсуліну (S % - 57,11±32,07 проти

54,69±32,5,  $p=0,965$ ) відповідно у групі оптимального рівня D та його недостатності (група 2). Значення індексу HOMA2-IR було статистично достовірно вище на 46,2% ( $p=0,004$ ), а чутливості до інсуліну на 27,5% ( $p=0,027$ ) нижче в групі дефіциту D в порівнянні з його недостатністю (група 2) (табл. 4.2). Крім того статистично достовірне, підвищення С-пептиду як маркера IP відмічалось в групі дефіциту D в порівнянні з обома іншими групами обстежуваних (табл. 4.2) [240].



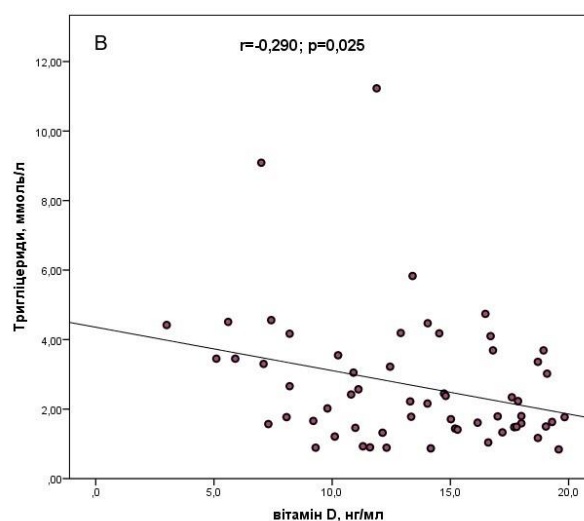
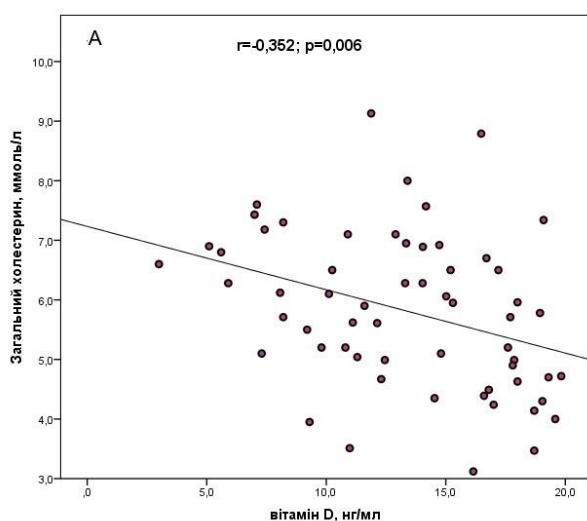
**Рис. 4.3. Кореляційний зв'язок між вітаміном D та показниками вуглеводного обміну у пацієнтів із D дефіцитом. А – HbA1c; В – С-пептид; С – HOMA-2IR; D – чутливість до інсуліну, S%. (r – коефіцієнт кореляції по Пірsonу).**

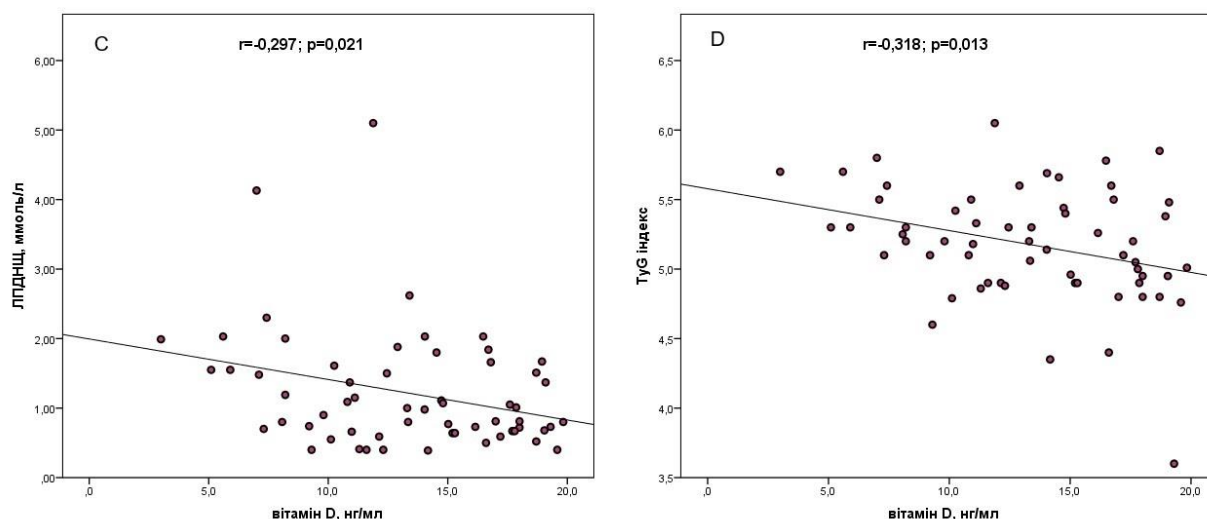
Ці зміни також супроводжується неадекватним глікемічним контролем. Середнє значення для HbA1c понад 9% спостерігалось лише в групі дефіциту D, що було статистично значущо вище в порівнянні із пацієнтами з оптимальним рівнем вітаміну, де даний показник склав 7,75±1,06% ( $p=0,016$ ).

Функціональна активність  $\beta$ -клітин статистично достовірно не змінилась між усіма групами незалежно від статусу вітаміну D (табл. 4.2).

В одновимірному кореляційному аналізі по Пірсона статистично достовірні кореляційні зв'язки виявлено лише в групі пацієнтів із D дефіцитом. Показниками, для яких виявлено негативний кореляційний зв'язок з концентрацією вітаміну D були – HbA1c, HOMA2-IR та чутливість до інсуліну (рис. 4.3A-D). Зворотній зв'язок максимальної сили виявлений між вітаміном D та C-пептидом ( $r=-0,401$ ,  $p=0,001$ ) (рис. 4.3В) [240].

Зрушення ліпідних параметрів різного ступеня вираженості діагностувалося у пацієнтів всіх обстежуваних груп. В цілому, спостерігалось підвищення проатерогенних частинок (ЗХ, ТГ, ЛПНЩ і ЛПДНЩ), паралельно зі зменшенням протекторних фракцій ЛПВЩ. Найбільш виражені зміни були констатовано у групі дефіциту D (табл. 4.2). Згідно отриманих результатів середнє значення ТГ склало  $2,69 \pm 1,87$  ( $p=0,033$ ), ЛПДНЩ – основного транспортера ТГ –  $1,21 \pm 0,85$  ммоль/л ( $p=0,039$ ), що практично в 2 рази статистично значущо вище в порівнянні із групою з оптимальним рівнем D. З іншої сторони спостерігалась лише тенденція до зростання даного класу ліпідів в порівнянні із групою недостатності D –  $p=0,284$  для ТГ та  $p=0,246$  для ЛПДНЩ відповідно (табл. 4.2) [240].





**Рис. 4.4.** Кореляційний зв'язок між вітаміном D та показниками ліпідного обміну у пацієнтів із D дефіцитом. А – загальний холестерин; В – ТГ; С – ЛПДНЩ; D – TyG індекс. (r – коефіцієнт кореляції по Пірsonу).

Також в пацієнтів із D дефіцитом виявлено статистично достовірний зворотній зв'язок слабкої сили між вітаміном D та концентрацією ТГ ( $r=-0,290$ ,  $p=0,025$ ) і ЛПДНЩ ( $r=-0,297$ ,  $p=0,021$ ) відповідно (рис. 4.4В, С). Рівень антиатерогенних ЛПВЩ був ідентичний у пацієнтів груп 2 і 3 – із зниженою концентрацією D. У групі з оптимальним забезпеченням D в середньому спостерігалась на  $0,3\pm 0,07$  ммол/л вища концентрація ЛПВЩ, проте зміни в міжгруповому аналізі були не значущими ( $p=0,434$ ). Рівень ЗХ статистично значущо не змінився в міжгруповому аналізі незалежно від забезпеченості вітаміном D. З іншої сторони в кореляційному аналізі Пірсона лише в групі D дефіциту виявлено негативний слабкий зв'язок між вітаміном D та ЗХ ( $r=-0,352$ ,  $p=0,006$ ) (рис. 4А, табл. 4.3) [240].

**Таблиця 4.3.** Кореляційний аналіз між рівнем вітаміну D та антропометричними, клінічними та лабораторними показниками

Показник	Норма (n=11)		D недостатність (n=38)		D дефіцит (n=60)	
	Середнє	СД	Середнє	СД	Середнє	СД
Вік, роки	0,103 (0,763)	-	0,013 (0,939)	-	0,199 (0,128)	-

продовження таблиці 4.3

Стать	-0,203 (0,549)	-	0,320 (0,050)	-	-0,071 (0,590)	-
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	-0,237 (0,484)	-	-0,117 (0,486)	-	-0,285 (0,027)*	-
Тривалість ЦД2, роки	0,074 (0,830)	-0,047 (0,913)	0,165 (0,323)	-0,135 (0,374)	-0,032 (0,808)	-0,043 (0,749)
ОТ, см	-0,292 (0,384)	-0,286 (0,493)	-0,216 (0,193)	-0,195 (0,262)	-0,306 (0,017)*	-0,186 (0,165)
НbA1c, %	-0,171 (0,615)	-0,172 (0,684)	-0,117 (0,484)	-0,123 (0,481)	-0,317 (0,014)*	-0,264 (0,047)*
С-пептид, нг/мл	0,198 (0,560)	0,728 (0,141)	0,063 (0,705)	0,106 (0,545)	-0,401 (0,001)*	-0,384 (0,003)*
Глюкоза, ммоль/л	-0,229 (0,499)	-0,302 (0,467)	-0,138 (0,409)	-0,081 (0,645)	-0,082 (0,530)	-0,097 (0,473)
НОМА2-IR	0,147 (0,666)	0,653 (0,079)	-0,024 (0,887)	0,031 (0,861)	-0,292 (0,023)*	-0,233 (0,081)
Чутливість, %S	-0,335 (0,315)	-0,632 (0,093)	-0,159 (0,341)	-0,192 (0,269)	0,370 (0,004)*	0,277 (0,037)*
Функція β- клітин, %B	0,196 (0,563)	0,400 (0,326)	0,054 (0,746)	0,065 (0,711)	-0,061 (0,648)	0,001 (0,994)
TyG індекс	0,593 (0,055)	0,741 (0,058)	-0,036 (0,828)	0,033 (0,850)	-0,318 (0,013)*	-0,285 (0,032)*
ЗХС, ммоль/л	0,313 (0,349)	0,261 (0,533)	-0,145 (0,385)	-0,243 (0,160)	-0,352 (0,006)*	-0,298 (0,025)*
ТГ, ммоль/л	0,570 (0,067)	0,667 (0,087)	-0,156 (0,351)	-0,152 (0,385)	-0,290 (0,025)*	-0,257 (0,054)
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,499 (0,118)	0,585 (0,127)	-0,150 (0,368)	-0,147 (0,398)	-0,297 (0,021)*	-0,264 (0,047)*
ЛПВЩ, ммоль/л	0,290 (0,386)	0,208 (0,621)	0,191 (0,250)	0,045 (0,800)	0,008 (0,949)	0,020 (0,885)
ЛПНЩ, ммоль/л	0,139 (0,683)	0,117 (0,782)	-0,217 (0,135)	-0,259 (0,134)	-0,205 (0,117)	-0,161 (0,230)

Дані представлені у вигляді r (p). \*- відмічений статистично достовірний кореляційний зв'язок

Нещодавно TyG індекс був запропонований в якості нового простого маркера IP [241]. У нашому дослідженні паралельно із погіршенням D статусу спостерігалось зростання TyG індексу. Максимального значення TyG індекс досяг у пацієнтів із дефіцитом D –  $5,17 \pm 0,41$ , проте рівня статистичної достовірності в порівнянні із іншими групами досягнуто не було ( $p=0,197$ ). В пацієнтів із дефіцитом D спостерігався негативний слабкий кореляційний

зв'язок між даним індексом та концентрацією вітаміну D ( $r=-0,318$ ,  $p=0,013$ ) (рис. 4.4D, табл. 4.3) [240].

В одновимірному аналізі Пірсона статистично достовірний кореляційний взаємозв'язок, як уже вище зазначалось, був виявлений лише в групі дефіциту D. За отриманими даними зворотний, різний за силою, проте здебільшого слабкий, кореляційний зв'язок встановлено між рівнем вітаміну D та антропометричними параметрами, рівнем ліпідів, показниками глікемічного контролю та маркерами IP (табл. 4.3, рис. 2-4). Тим не менш, після корекції на ІМТ, вік і стать - предиктори, які можуть вплинути на D статус, статистично значущий зв'язок, проте меншої сили залишився лише для HbA1c ( $r = -0,264$ ;  $p=0,047$ ), C-пептиду ( $r = -0,394$ ;  $p=0,003$ ), чутливості до інсуліну, S% ( $r= 0,277$ ;  $p=0,037$ ), TyG індексу ( $r=-0,285$ ;  $p=0,032$ ), ЗХ ( $r=-0,298$ ;  $p=0,025$ ) та ЛПДНЩ ( $r=-0,264$ ;  $p=0,047$ ) відповідно (табл. 4.3) [240].

**Таблиця 4.4.** Дані покрокового множинного логістичного регресійного аналізу з використанням в якості залежної змінної D дефіциту

Модель		Коефіцієнт регресії±SE	OR (95% ДІ)	P
Модель 1 (Нейджелкерк =0,274)	R <sup>2</sup>	Константа		
Метформін		1,647±0,858	5,191 (0,966-27,903)	0,046
HbA1c		1,036±0,410	2,819 (1,263-6,291)	0,001
Модель 2 (Нейджелкерк =0,218)	R <sup>2</sup>	Константа		
ЛПВЩ		-1,997±1,020	0,136 (0,018-1,002)	0,050
HbA1c		0,714±0,300	2,042 (1,134-3,677)	0,017

SE – стандартна похибка коефіцієнта регресії, R<sup>2</sup>– коефіцієнт детермінації.

В одновимірному логістичному регресійному аналізі незалежними предикторами, асоційованими з дефіцитом вітаміну D у пацієнтів з ЦД типу 2



були наступні фактори – HbA1c (OR 2,269; 95% ДІ 1,163-4,427;  $p=0,038$ ), HOMA2-IR (OR 2,204; 95% ДІ 1,046-4,643;  $p=0,038$ ), С-пептид (OR 1,907; 95% ДІ 1,003-3,625;  $p=0,049$ ), ОТ (OR 1,075; 95% ДІ 1,0-1,154;  $p=0,049$ ), ТГ (OR 3,280; 95 % ДІ 1,135-9,478;  $p=0,028$ ) і ЛПВЩ (0,180; 95% ДІ 0,030-1,080,  $p=0,049$ ) [240].

Всі змінні, які були статистично значущими в одновимірному аналізі, були включені в покроковий множинний логістичний регресійний аналіз. Як видно з **табл. 4.4**, було побудовано декілька регресивних моделей. Згідно яких незадовільний глікемічний контроль, який встановлювався по рівню HbA1c, був незалежно від прийому метформіну ( $R^2$  Нейджелкерк =0,274) і рівня ЛПВЩ ( $R^2$  Нейджелкерк =0,218) асоційований з дефіцитом вітаміну D [240].

Найбільш важливим, на нашу думку, є встановлення в регресійному аналізі, незалежного від глікемічного контролю зв'язку між дефіцитом вітаміну D і прийомом метформіну (OR 5,91; 95% CI 0,966-27,903 ). Підсилює дане твердження, той факт, що не виявлено статистичної достовірної різниці щодо процентного співвідношення між показниками пацієнтів різних груп, які отримують метформін ( $p=0,264$ ), так само як і середньодобова доза для метформіну була співставна для всіх груп ( $p=0,317$ ).

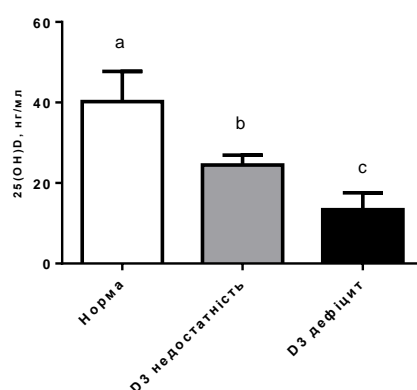
## **4.2 Вивчення впливу D статусу на формування метаболічних порушень у пацієнтів із ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП**

У відділеннях КМКЕЦ, після отримання згоди, відбувався набір пацієнтів для одномоментного дослідження. Когорту склали пацієнти із ЦД типу 2 віком понад 18 років, з супутньою НАЖХП.

В дослідження не включали пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки іншої етіології, а саме вірусними, автоімунними чи медикаментозно-індукованими гепатитами. У всіх пацієнтів оцінювався алкогольний анамнез і при виявленні зловживання хворі не включались в дослідження. Хвороба Вільсона-Коновалова, вроджена недостатність  $\alpha 1$ -

антитрипсину та ідіопатичний гемохроматоз також були критеріями виключення. Також в дослідження не включали пацієнтів, які повідомили що за 3 місяця до початку, приймали протисудомні препарати або біологічні добавки із кальцієм чи вітаміном D<sub>3</sub> [242].

В дослідження включено 126 пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП. В залежності від базового рівня вітаміну D (рис. 4.5), на основі сучасних рекомендацій Європейської ендокринологічної асоціації (ЕСЕ) щодо забезпеченості ним [70], пацієнти були розподілені до однієї із 3 груп [242].



**Рис. 4.5. Рівень вітаміну D у сироватці крові у пацієнтів досліджуваних груп.** Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . a, b, c - різні літери над двома стовпчиками діаграми відображають достовірні відмінності між відповідними двома групами ( $p < 0,05$ ).

Групи хворих включені в дослідження були співставні за віком ( $p=0,187$ ), тривалістю ЦД типу 2 ( $p=0,258$ ) та статті. До першої групи ( $n=23$ ) увійшли пацієнти з оптимальним рівнем вітаміну D ( $>30,0$  нг/мл). Середній вік хворих даної групи склав  $64,83 \pm 7,26$ , а тривалість ЦД –  $14,3 \pm 8,11$  роки. До двох інших груп включені пацієнти із зниженим базовим рівнем вітаміну D<sub>3</sub>: група 2 ( $n=31$ ) – з недостатністю вітаміну D ( $20-29,9$  нг/мл) та група 3 ( $n=73$ ) – з дефіцитом вітаміну D, який був діагностований при значенні  $<20$  нг/мл. Середній вік пацієнтів даних груп був ідентичним та відповідно склав  $60,68 \pm 10,08$  та  $60,72 \pm 10,15$  роки (табл. 4.5). Тривалість ЦД типу 2 у пацієнтів із дефіцитом D

склала  $13,42 \pm 6,78$  роки, а із недостатністю D –  $11,42 \pm 5,92$  роки, що статистично достовірно не відрізнялось [242].

**Таблиця 4.5.** Базові антропометричні та клініко-лабораторні параметри в обстежених пацієнтів

Показник	Норма (n=23)	p1	p2	D недоста тність (n=31)	D дефіцит (n=72)	p3	p
Вік, роки	$64,83 \pm 7,26$	-	-	$60,68 \pm 10,08$	$60,72 \pm 10,15$	-	0,187
Тривалість ЦД, роки	$14,3 \pm 8,11$	-	-	$11,42 \pm 5,92$	$13,42 \pm 6,78$	-	0,258
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	$28,46 \pm 3,64$	0,083	0,008	$31,88 \pm 5,28$	$32,65 \pm 6,45$	0,806	0,011
ОТ, см	$96,83 \pm 7,94$	0,607	0,026	$100,32 \pm 8,37$	$105,23 \pm 16,06$	0,204	0,020
АЛТ, ОД/л	$25,76 \pm 8,0$	-	-	$31,08 \pm 21,95$	$32,00 \pm 21,36$	-	0,420
АСТ, ОД/л	$26,54 \pm 13,63$	-	-	$22,64 \pm 14,27$	$27,63 \pm 17,68$	-	0,360
Білірубін, мкмоль/л	$11,9 \pm 3,81$	-	-	$10,42 \pm 4,12$	$9,62 \pm 4,23$	-	0,071
Лужна фосфатаза, ОД/л	$81,33 \pm 23,2$	-	-	$81,15 \pm 23,1$	$79,3 \pm 20,29$	-	0,960
ГГТ, ОД/л	$44,24 \pm 17,27$	-	-	$43,06 \pm 17,58$	$51,17 \pm 19,4$	-	0,078
Ліпаза, ОД/л	$25,5 \pm 12,59$	-	-	$45,32 \pm 38,97$	$43,87 \pm 45,63$	-	0,577
Амілаза, ОД/л	$45,8 \pm 14,02$	-	-	$44,5 \pm 19,33$	$46,86 \pm 21,45$	-	0,963
HSI	$39,67 \pm 4,37$	0,529	0,032	$41,46 \pm 5,55$	$43,34 \pm 6,59$	0,314	0,031
FLI	$64,96 \pm 17,72$	0,099	0,007	$75,89 \pm 19,02$	$79,21 \pm 19,61$	0,700	0,010
TyG індекс	$5,02 \pm 0,26$	-	-	$5,13 \pm 0,34$	$5,18 \pm 0,38$	-	0,175

p - оцінка достовірності різниці між досліджуваними групами розрахована з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (One-Way ANOVA) або критерію Крускала-Уолліса. p 1-3 - для попарних порівнянь використано апостеріорний тест Tukey. p1 – відмінність між оптимальним рівнем та D

недостатністю.  $p_2$  – відмінність між оптимальним рівнем та D дефіцитом.  $p_3$  – відмінність між D недостатністю та дефіцитом. Вірогідною вважалася різниця при значенні  $p < 0,05$ .

Аналіз отриманих даних продемонстрував, що у 92,8 % обстежуваних хворих виявлена надмірна маса тіла або ожиріння різного ступеня. Надмірна маса тіла спостерігалась у 65,2 % пацієнтів групи 1, водночас як у хворих груп 2 і 3 зі зменшеною концентрацією D, в більше ніж 60 % діагностовано ожиріння різного ступеня, що було статистично значущо вище в порівнянні із групою без дефіциту D ( $p=0,027$ ). Морбідне ожиріння ( $IMT > 40,0 \text{ кг/м}^2$ ) діагностовано лише у пацієнтів груп із зниженою концентрацією вітаміну D. В групі з дефіцитом D морбідне ожиріння спостерігалось у 10 (13,9%) пацієнтів, що статистично достовірно не відрізнялось від групи недостатності D, в якій страждали даною патологією 2 (6,5%) учасників ( $p=0,113$ ). Одночасно із вищою поширеністю ожиріння, ми діагностували проградієнтне зростання IMT та ОТ паралельно із зменшенням концентрації вітаміну D в сироватці [242]. Середні значення для IMT та ОТ в групі дефіциту D склали  $32,65 \pm 6,45 \text{ кг/м}^2$  і  $105,23 \pm 16,06 \text{ см}$ , що було статистично достовірно вище в порівнянні із пацієнтами із його оптимальним рівнем ( $28,46 \pm 3,64 \text{ кг/м}^2$  ( $p=0,008$ ) і  $96,83 \pm 7,94 \text{ см}$  ( $p=0,026$ ). У пацієнтів із D недостатністю середні значення IMT склали  $31,88 \pm 5,28 \text{ кг/м}^2$ , а ОТ -  $100,32 \pm 8,37 \text{ см}$ , що статистично достовірно не відрізнялось від інших обстежуваних груп (**табл. 4.5**) [242].

Важливо відзначити, що у пацієнтів з  $IMT < 30 \text{ кг/м}^2$ , але з накопиченням вісцерального жиру або дисфункцією жирової тканини спостерігається НАЖХП без порушення активності печінкових ферментів [202, 243]. Згідно з результатами, спостерігалась тенденція до підвищення активності трансаміназ паралельно із зниженням рівня вітаміну D. Проте середні значення не перевищували норми та не спостерігалось статистично достовірної різниці між показниками обстежуваних груп. Як видно із **таблиці 4.5** середні значення для АЛТ склали  $25,76 \pm 8,0$ ;  $31,08 \pm 21,95$  та  $32,0 \pm 21,36 \text{ ОД/л}$  ( $p=0,420$ ),

а для АСТ –  $26,54 \pm 13,63$ ;  $22,64 \pm 14,27$  та  $27,63 \pm 17,68$  ОД/л ( $p=0,360$ ) відповідно для групи оптимального забезпечення вітаміном D, недостатності та відповідно дефіциту D. Активність ГГТ, іншого показника функціонального стану печінки, також була найвищою в групі D<sub>3</sub> дефіциту –  $51,17 \pm 19,4$  ОД/л, проте в порівнянні із іншими групами статистично достовірного характеру дані зміни не носили ( $p=0,078$ ). Середнє значення для ГГТ в групі оптимального забезпечення D склало –  $44,24 \pm 17,27$  та відповідно  $43,06 \pm 17,58$  ОД/л для пацієнтів із D недостатністю (**табл. 4.5**). Рівень лужної фосфатази був практично ідентичним у пацієнтів обстежуваних когорт та статистично достовірно не відрізнявся ( $p=0,960$ ) [242].

Порушення пігментного обміну печінки в усіх обстежуваних групах виявлено не було, про що свідчить нормальний рівень загального білірубіну та відсутність статистично достовірної різниці по даному показнику ( $p=0,071$ ). Максимальне значення для білірубіну діагностовано у пацієнтів із оптимальним забезпеченням вітаміном D –  $11,9 \pm 3,81$  мкмоль/л (**табл. 4.5**).

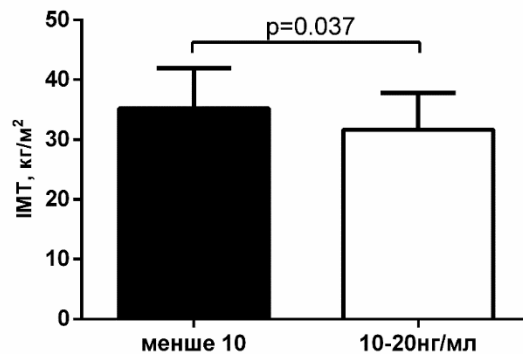
Згідно отриманих результатів не відмічалось статистично значущої різниці по показникам, які характеризують зовнішньосекреторну функцію підшлункової залози. Середнє значення амілази було на одному рівні серед пацієнтів всіх груп ( $p=0,963$ ). На відміну від амілази, рівень ліпази був практично в 2 рази вищий у пацієнтів з груп із зниженою концентрацією D, в порівнянні із групою оптимального забезпечення, де середнє значення склало  $25,5 \pm 12,59$  ОД/л ( $p=0,577$ ) [242].

В дослідженні проаналізовано зміни індексів стеатозу печінки (HSI та FLI) в контексті забезпеченості організму вітаміном D. Максимальне значення для обох індексів діагностовано у пацієнтів із дефіцитом вітаміну D, що статистично значущо відрізнялось від пацієнтів із групи оптимального забезпечення (HSI –  $43,34 \pm 6,59$  проти  $39,67 \pm 4,37$ ;  $p=0,032$  та відповідно для FLI –  $79,21 \pm 19,61$  проти  $64,96 \pm 17,72$ ;  $p=0,007$ ). В групі недостатності вітаміну D середнє значення для HSI склало  $41,46 \pm 5,55$ , а для FLI –  $75,89 \pm 19,02$ , що не

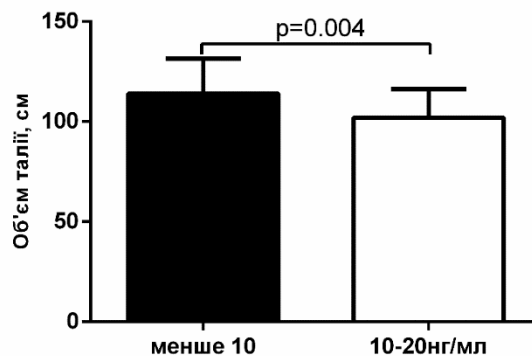
було значущим в порівнянні із обома іншими групами обстежуваних (табл. 4.5) [242].

Нещодавно TuG індекс був запропонований в якості нового простого маркера ІР. В подальших дослідженнях було продемонстровано, що TuG індекс незалежно асоційований із стеатозом печінки [244], а порогове значення  $TuG \geq 8,5$  є достатньо ефективним діагностичним маркером НАЖХП з AUC 0,782 та володіє вищою діагностичною цінністю в порівнянні із АЛТ [245]. У нашому дослідженні паралельно із погіршенням D статусу спостерігалось зростання TuG індексу. Максимального значення TuG індекс досяг у пацієнтів із дефіцитом вітаміну D –  $5,18 \pm 0,38$ , проте рівня статистичної значущості в порівнянні із іншими групами досягнуто не було ( $p=0,175$ ) [242].

**A**



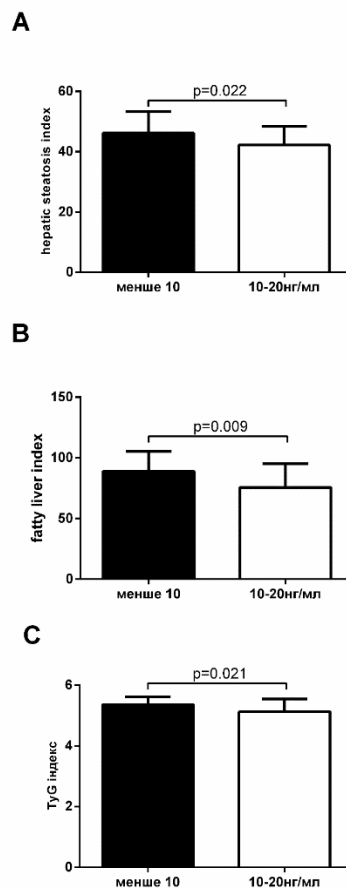
**B**



**Рис. 4.6.** Антропометричні параметри пацієнтів із вираженим D дефіцитом та рівнем вітаміну в діапазоні >10-20 нг/мл (M±SD).

Останнім часом все більшої актуальності набуває проблема вираженого дефіциту вітаміну D, який діагностується при його концентрації менше 10нг/мл. В нашому дослідженні проведено субаналіз в групі дефіциту вітаміну D, в якому проаналізовано зміни антропометричних параметрів та метаболічних показників у пацієнтів через призму даної проблеми. Виражений дефіцит констатовано в 22 пацієнтів, що становило 27,7 % учасників групи 3 [242].

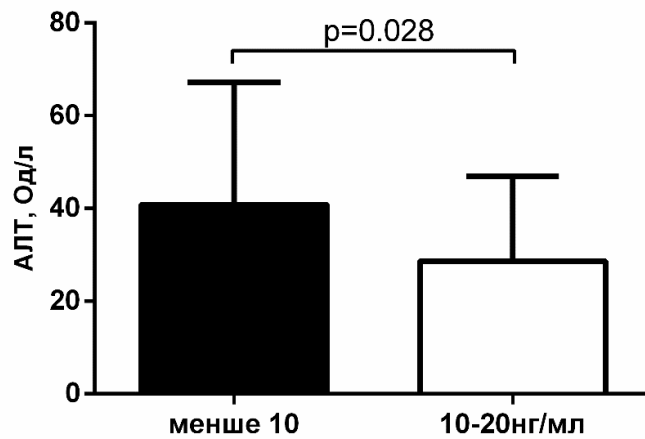
Встановлено, що у пацієнтів із вираженим дефіцитом D спостерігається статистично достовірне збільшення ІМТ ( $p=0,037$ ) та ОТ ( $p=0,004$ ) на 12 % в порівнянні із пацієнтами з діапазоном вітаміну від 10-20 нг/мл (рис. 4.6) [242].



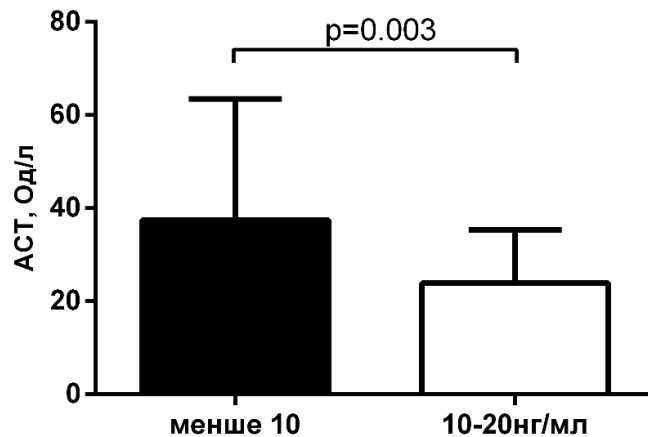
**Рис. 4.7.** Індекси стеатозу печінки та TyG пацієнтів із вираженим D дефіцитом та рівнем вітаміну в діапазоні 10-20 нг/мл ( $M\pm SD$ ).

Індекси стеатозу печінки (HSI та FLI), а також TuG індекс були статистично значущо вищими в пацієнтів із вираженим дефіцитом D в порівнянні із підгрупою D>10 нг/мл: HSI –  $46,19 \pm 7,1$  проти  $42,24 \pm 6,1$  ( $p=0,022$ ), FLI –  $88,75 \pm 16,57$  проти  $75,54 \pm 19,59$  ( $p=0,009$ ) та відповідно для TuG –  $5,35 \pm 0,26$  проти  $5,11 \pm 0,41$  ( $p=0,021$ ) (рис. 4.7) [242].

**А**



**В**



**Рис. 4.8.** Активність трансаміназ печінки у пацієнтів із вираженим D дефіцитом та рівнем вітаміну в діапазоні 10-20 нг/мл ( $M \pm SD$ ).

У пацієнтів із вираженим дефіцитом вітаміну D активність печінкових трансаміназ була статистично достовірно вищою в 1,5 рази в порівнянні із підгрупою вітамін D>10 нг/мл. Проте середні значення не перевищували



норми. Як видно із **рис. 4.8** середнє значення для АЛТ склало  $40,85 \pm 26,29$  проти  $28,6 \pm 18,3$  ОД/л ( $p=0,028$ ), а для АСТ –  $37,4 \pm 26,08$  проти  $23,87 \pm 11,4$  ОД/л ( $p=0,003$ ) відповідно [242].

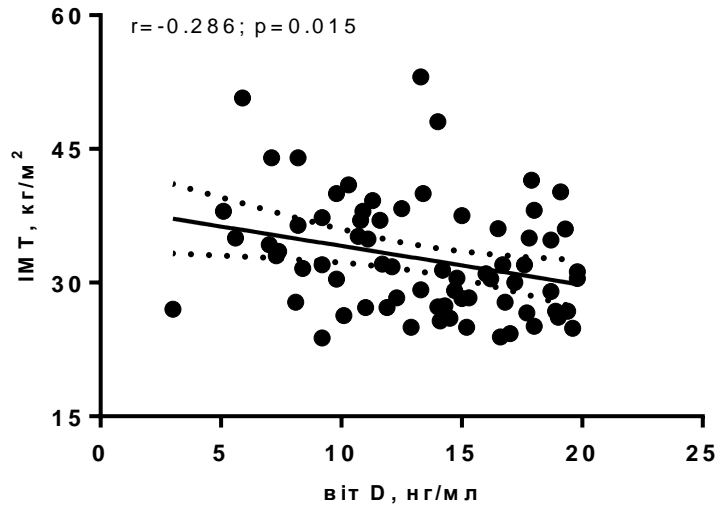
**Таблиця 4.6.** Кореляційний аналіз між рівнем вітаміну D та антропометричними, клінічними та лабораторними показниками

Показник	Норма (n=23)		D недостатність (n=31)		D дефіцит (n=72)	
	r	p	r	p	r	p
Вік, роки	-0,038 (0,863)	-	-0,114 (0,541)	-	-0,285 (0,015)*	-
Стать	-0,260 (0,231)	-	0,113 (0,544)	-	-0,105 (0,381)	-
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,059 (0,789)	-	0,138 (0,460)	-	-0,286 (0,015)*	-
Тривалість ЦД2, роки	0,019 (0,933)	-0,102 (0,669)	0,130 (0,485)	0,328 (0,158)	-0,074 (0,540)	-0,009 (0,949)
ОТ, см	0,127 (0,564)	0,236 (0,317)	0,065 (0,727)	-0,058 (0,809)	-0,364 (0,002)*	-0,342 (0,004)*
АЛТ, ОД/л	-0,064 (0,772)	-0,011 (0,964)	0,225 (0,223)	-0,256 (0,276)	-0,283 (0,016)*	-0,166 (0,173)
АСТ, ОД/л	-0,331 (0,122)	-0,251 (0,286)	0,265 (0,150)	-0,085 (0,723)	-0,371 (0,001)*	-0,285 (0,018)*
ГГТ, ОД/л	-0,238 (0,274)	-0,259 (0,270)	0,077 (0,682)	-0,016 (0,948)	-0,346 (0,003)*	-0,243 (0,044)*
HSI	-0,212 (0,332)	-0,272 (0,260)	0,141 (0,451)	0,329 (0,157)	-0,303 (0,010)*	-0,128 (0,299)
FLI	-0,047 (0,830)	0,150 (0,541)	0,244 (0,186)	-0,314 (0,178)	-0,381 (0,001)*	-0,255 (0,036)*
TyG індекс	-0,147 (0,504)	-0,004 (0,988)	0,118 (0,529)	-0,209 (0,376)	-0,341 (0,003)*	-0,294 (0,014)*
ЗХ, ммоль/л	0,183 (0,404)	0,180 (0,447)	-0,331 (0,069)	-0,402 (0,079)	-0,376 (0,001)*	-0,280 (0,020)*
ТГ, ммоль/л	-0,261 (0,230)	0,207 (0,308)	-0,083 (0,658)	-0,110 (0,643)	-0,303 (0,010)*	-0,230 (0,057)
ЛПНЦ, ммоль/л	0,011 (0,094)	0,685 (0,520)	-0,479 (0,038)*	-0,440 (0,052)	-0,430 (0,004)*	-0,228 (0,151)

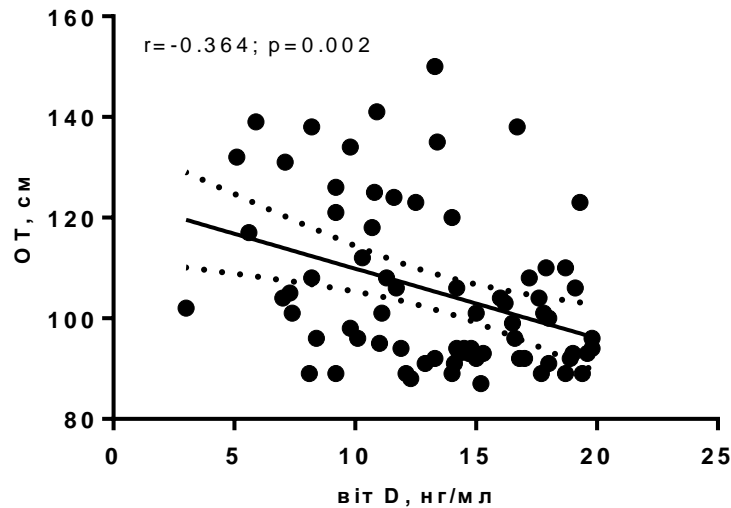
Дані представлені у вигляді r (p). \*- відмічений статистично достовірний кореляційний зв'язок

В одновимірному аналізі Пірсона в групі недостатності вітаміну D статистично достовірний кореляційний взаємозв'язок виявлено лише для ЛПНЩ ( $r=-0,479$ ;  $p=0,038$ ), який втратив достовірний характер після поправки на ІМТ, вік і стать ( $r=-0,440$ ;  $p=0,052$ ) (табл. 4.6) [246].

**А**



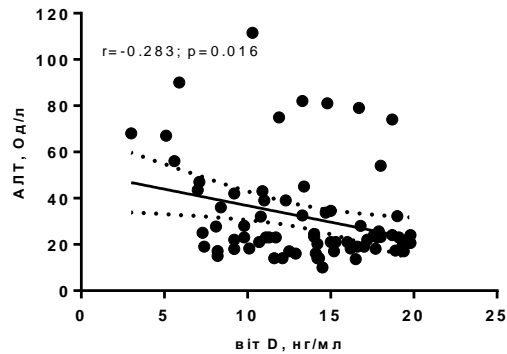
**В**



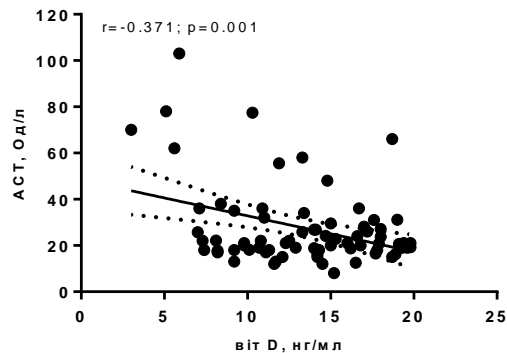
**Рис. 4.9.** Кореляційний зв'язок між вітаміном D та антропометричними параметрами у пацієнтів із D дефіцитом. ( $r$  – коефіцієнт кореляції по Пірsonу)

Проте, основні зміни констатовано в пацієнтів із групи дефіциту вітаміну D. Згідно отриманих результатів виявлено негативний кореляційний зв'язок слабкий за силою між вітаміном D і віком пацієнтів ( $r = -0,285$ ;  $p = 0,015$ ) та їх антропометричними параметрами, а саме ІМТ ( $r = -0,286$ ;  $p = 0,015$ ) та ОТ ( $r = -0,364$ ;  $p = 0,002$ ) (рис. 4.9, табл. 4.6) [246].

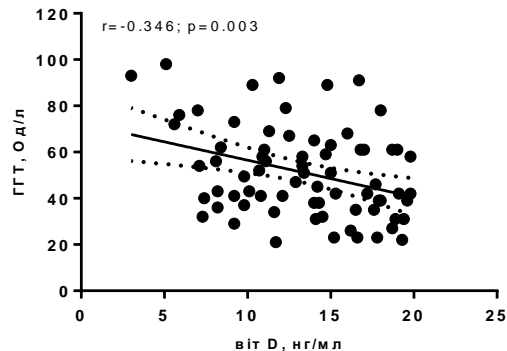
А



В



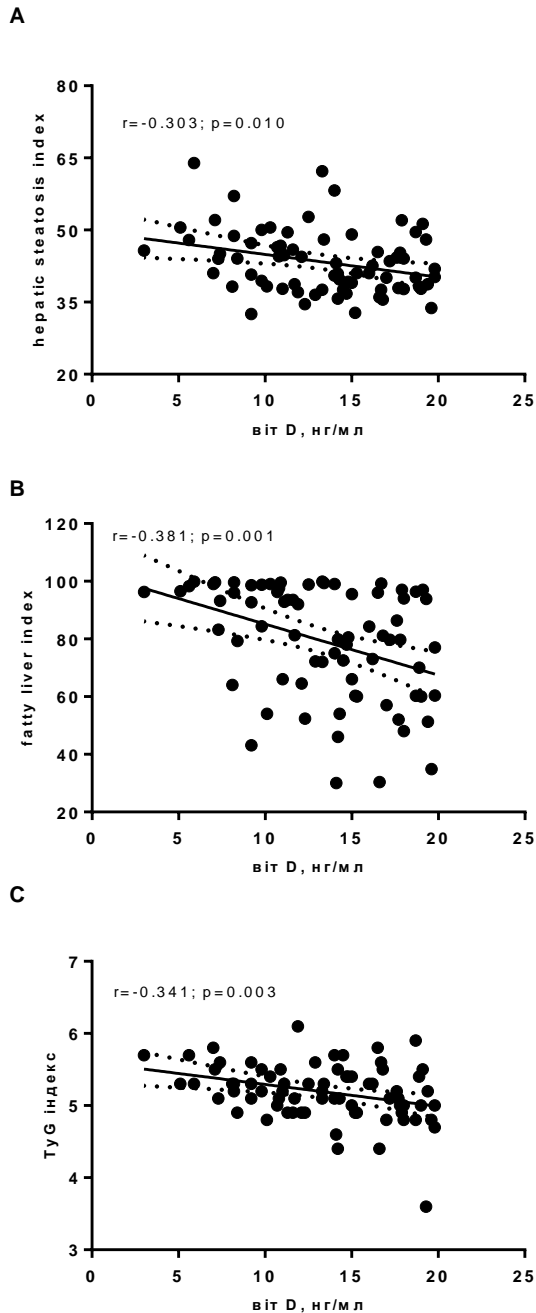
С



**Рис. 4.10.** Кореляційний зв'язок між вітаміном D та активністю трансаміназ у пацієнтів із D дефіцитом. ( $r$  – коефіцієнт кореляції по Пірсону).

За отриманими даними зворотний, різний за силою, проте здебільшого слабкий, кореляційний зв'язок встановлено між рівнем вітаміну D та активністю трансаміназ, індексами стеатозу печінки та рівнем ліпідів (табл. 4.6, рис. 4.10, рис. 4.11, рис. 4.12).

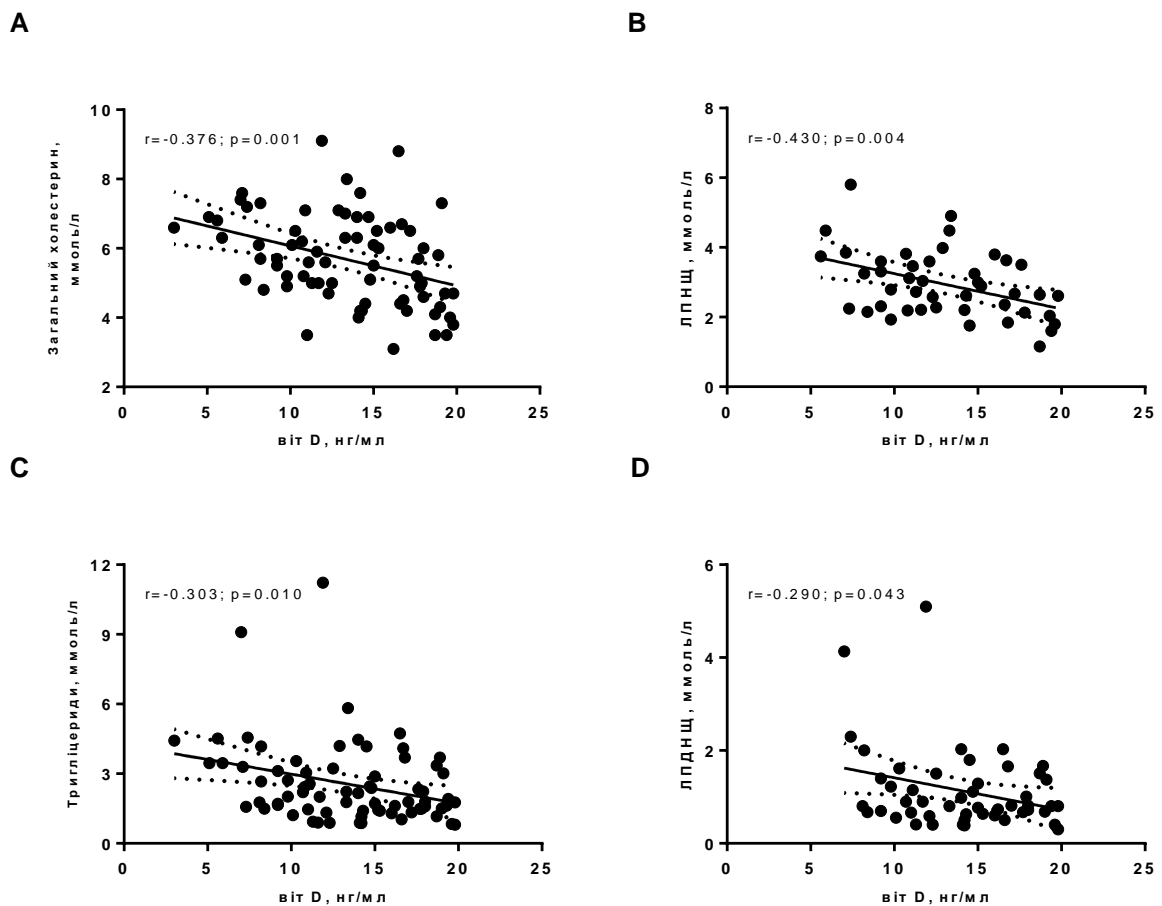
Зв'язок максимальної сили констатовано для активності АСТ – ( $r = -0,371$ ;  $p=0,001$ ) (рис. 4.10, табл. 4.6) [246].



**Рис. 4.11.** Кореляційний зв'язок між вітаміном D та індексами стеатозу печінки у пацієнтів із D дефіцитом. ( $r$  – коефіцієнт кореляції по Пірsonу).

Серед проаналізованих індексів стеатозу печінки найбільш виражений негативний кореляційний зв'язок виявлено між рівнем вітаміну D та FLI ( $r = -0,381$ ;  $p=0,001$ ) (рис. 4.11, табл. 4.6) [246].

На рис. 4.12 представлено одновимірний кореляційний аналіз Пірсона в групі D між рівнем вітаміну та показниками ліпідограми [246].



**Рис. 4.12.** Кореляційний зв'язок між вітаміном D та показниками ліпідограми у пацієнтів із D дефіцитом. ( $r$  – коефіцієнт кореляції по Пірсону)

Тим не менш, після корекції на ІМТ, вік і стать – предиктори, які можуть вплинути на D статус, статистично достовірний зв'язок, проте меншої сили залишився лише для ОТ ( $r = -0,342$ ;  $p=0,004$ ), АСТ ( $r = -0,285$ ;  $p=0,018$ ), ГГТ ( $r = -0,243$ ;  $p=0,044$ ), ТуG індексу ( $r = -0,294$ ;  $p=0,014$ ), FLI ( $r = -0,255$ ;  $p=0,036$ ) та ЗХС ( $r = -0,280$ ;  $p=0,020$ ) відповідно (табл. 4.6) [246].

В одновимірному логістичному регресійному аналізі незалежними предикторами, асоційованими з дефіцитом вітаміну D у пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП були наступні фактори – ОТ (OR 1,055; 95% ДІ 1,006-1,106; p=0,004), HSI (OR 1,108; 95% ДІ 1,010-1,2173; p=0,031), FLI (OR 1,034; 95% ДІ 1,010-1,058; p=0,005), ТГ (OR 1,716; 95% ДІ 1,016-2,897; p=0,043) та ІМТ (OR 1,181; 95 % ДІ 1,051-1,327; p=0,005) [246].

**Таблиця 4.7.** Дані покрокового множинного логістичного регресійного аналізу з використанням в якості залежної змінної дефіциту вітаміну D

Модель	Коефіцієнт регресії±SE	OR (95% ДІ)	P
Модель 1 (Нейджелкерк R <sup>2</sup> =0,215)			
Константа	-5,671±2,43		
HSI	0,164±0,062	1,178 (1,043-1,331)	0,008
АЛТ	0,083±0,036	1,087 (1,013-1,166)	0,021
АСТ	-0,086±0,036	0,918 (0,855-0,985)	0,017
Модель 2 (Нейджелкерк R <sup>2</sup> =0,328)			
Константа	-5,442±3,784		
ІМТ	0,324±0,141	1,381 (1,049-1,823)	0,022
Тривалість ЦД	-0,109±0,058	0,896 (0,800-1,005)	0,060
Модель 3 (Нейджелкерк R <sup>2</sup> =0,358)			
Константа	-22,063±8,811		
HSI	0,256±0,121	1,292 (1,020-1,637)	0,034
ТyG індекс	2,912±1,284	18,386 (1,484-227,8)	0,023
Модель 4 (Нейджелкерк R <sup>2</sup> =0,163)			
Константа	-0,635±0,880		
FLI	0,030±0,013	1,030 (1,005-1,057)	0,021
АСТ	-0,061±0,029	0,940 (0,889-0,995)	0,032
АЛТ	0,057±0,030	1,058 (0,997-1,123)	0,064

SE – стандартна похибка коефіцієнта регресії, R<sup>2</sup>– коефіцієнт детермінації.

Всі змінні, які були статистично значущими в одновимірному аналізі, були включені в покроковий множинний логістичний регресійний аналіз. Згідно отриманих результатів, незалежно від активності трансаміназ HSI ( $R^2$  Нейджелкерк =0,215), а також FLI ( $R^2$  Нейджелкерк =0,163) були асоційовані з дефіцитом вітаміну D. Згідно інших логістичних моделей, HSI та TuG індекси ( $R^2$  Нейджелкерк =0,358), а також ІМТ та тривалість ЦД типу 2 ( $R^2$  Нейджелкерк =0,328) були незалежними предикторами асоційованими із дефіцитом D в даній когорті пацієнтів (табл. 4.7).

**Резюме:** У пацієнтів із ЦД типу 2 продемонстровано, що дефіцит вітаміну D асоційований із більш вираженою ІР, ожирінням і неадекватним глікемічним контролем порівнянно з оптимальним рівнем або його недостатністю. Індекс НОМА2-ІР ( $2,12 \pm 0,71$  проти  $2,25 \pm 0,95$ ,  $p=0,963$ ) та чутливість до інсуліну (S % -  $57,11 \pm 32,07$  проти  $54,69 \pm 32,5$ ,  $p=0,965$ ) у групі оптимального рівня D та його недостатності (група 2) були практично ідентичними. При дефіциті вітаміну D показник НОМА2-ІР був статистично достовірно вище на 46,2% ( $p=0,004$ ), а чутливість до інсуліну нижче на 27,5% ( $p=0,027$ ). Функціональна активність  $\beta$ -клітин статистично достовірно не змінилась між усіма групами незалежно від статусу вітаміну D. Після корекції на ІМТ, вік і стать між концентрацією вітаміну D і HbA1c ( $r = -0,264$ ;  $p=0,047$ ), НОМА2-ІР, С-пептидом ( $r = -0,394$ ;  $p=0,003$ ) та S % ( $r = 0,277$ ;  $p=0,037$ ) встановлено зворотній кореляційний зв'язок лише в групі пацієнтів із  $D_3$  дефіцитом. Регресійний аналіз продемонстрував, що прийом метформіну асоційований з дефіцитом вітаміну D в пацієнтів із ЦД типу 2, незалежно від рівня HbA1c.

У пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП спостерігається тенденція до підвищення активності трансаміназ паралельно із зниженням рівня вітаміну D. Максимальне значення індексів жирового гепатозу діагностовано у пацієнтів із дефіцитом вітаміну D, що статистично достовірно відрізнялось від пацієнтів із групи оптимального забезпечення (HSI –  $43,34 \pm 6,59$  проти

39,67±4,37; p=0,032 та відповідно для FLI – 79,21±19,61 проти 64,96±17,72; p=0,007). Для TyG індексу продемонстрована тенденція до його зростання одночасно із погіршенням статусу вітаміну D (p=0,175). В субаналізі встановлено, що виражений D дефіцит (<10 нг/мл) характеризується статистично значущо вищими показниками індексів жирового гепатозу, антропометричними параметрами та активністю трансаміназ в порівнянні із показниками пацієнтів із рівнем D в діапазоні від 10-20 нг/мл.

В одновимірному аналізі Пірсона в групі недостатності D статистично достовірний кореляційний взаємозв'язок виявлено лише для ЛПНЩ (r=-0,479; p=0,038), який втратив достовірний характер після поправки на ІМТ, вік і стать (r=-0,440; p=0,052). В групі D дефіциту, після корекції на ІМТ, вік і стать - предиктори, які можуть вплинути на D статус, статистично значущий здебільшого слабкий, кореляційний зв'язок встановлено між рівнем вітаміну D та об'ємом талії (r =-0,342; p=0,004), АСТ (r =-0,285; p=0,018), ГГТ (r=-0,243; p=0,044), TyG індексом (r=-0,294; p=0,014) та FLI (r=-0,255; p=0,036) відповідно. Використовуючи покроковий множинний логістичний регресійний аналіз, вперше продемонстровано, що незалежно від активності трансаміназ HSI (R<sup>2</sup> Нейджелкерк =0,215), а також FLI (R<sup>2</sup> Нейджелкерк =0,163) були асоційовані з дефіцитом вітаміну D.



## РОЗДІЛ 5

### ОЦІНКА КЛІНІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАМІСНОЇ ТЕРАПІЇ ВІТАМІНОМ D<sub>3</sub> У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ТИПУ 2 ТА СУПУТНЬОЮ НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ D

Підґрунтям даного етапу клінічної частини роботи були попередньо проведені нами перехресні дослідження, в яких проаналізовано зміни основних антропометричних параметрів, показників функціонального стану печінки, вуглеводного та ліпідного обмінів у пацієнтів з ЦД типу 2 та НАЖХП відповідно до базового D статусу [240, 242]. Пацієнти були розподілені на 3 групи відповідно до рекомендацій Європейської асоціації ендокринологів: група 1 – з оптимальним рівнем вітаміну D (30 нг/мл); група 2 - D недостатність (21-29 нг/мл); і група 3 – D дефіцит (<20 нг/мл) [70]. З допомогою використання кореляційно-регресійного аналізу було встановлено, що дефіцит вітаміну D у пацієнтів з ЦД типу 2 та НАЖХП асоційований з більш вираженою ІР, ожирінням, неадекватним глікемічним контролем та зростанням індексів жирового гепатозу у порівнянні з оптимальним рівнем або його недостатністю. Усіх пацієнтів із D дефіцитом ми в подальшому відібрали для проведення проспективного дослідження з вивчення оцінки впливу 6-місячної терапії препаратами вітаміну D<sub>3</sub> в дозі 4000 МО вдень.

Дослідження було проведено на базі Київського міського клінічного ендокринологічного центру з включенням 72 пацієнта з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП з підтвердженим D<sub>3</sub> дефіцитом. Іншим критерієм включення була стабільна доза інсуліну і/або пероральних гіпоглікемічних засобів щонайменше протягом 3 місяців та рівень HbA<sub>1c</sub><11,0%.

Критерії виключення включали наявність ЦД 1 типу або вторинного діабету, хронічних дифузних захворювань печінки іншої етіології, зловживання алкоголем, злякисних новоутворень і наявність в анамнезі гіперпаратиреозу, остеопорозу, нефролітіазу або гіперкальціємії. Також в

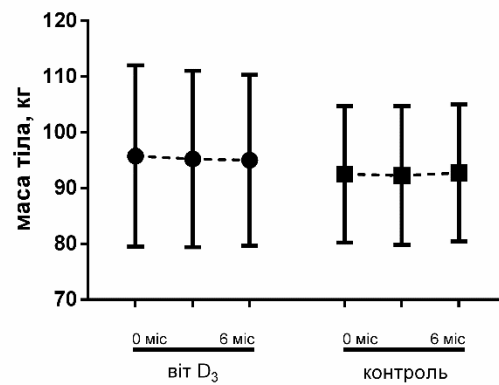
дослідження не включали пацієнтів, які повідомили що за 3 місяця до початку, приймали протисудомні препарати або біологічні добавки із кальцієм чи вітаміном D<sub>3</sub>.

Для вивчення ефективності застосування препаратів вітаміну D<sub>3</sub> загалом проліковано 72 пацієнти з НАЖХП та ЦД типу 2 на фоні встановленого D дефіциту, які рівномірно були розподілені на 2 групи. Хворі групи порівняння (n=36) отримували традиційну терапію, яка включала залежно від індивідуальних потреб відповідне дієтичне харчування, цукрознижувальні засоби (препарати сульфанілсечовини, бігуаніди, інсулін). Середній вік хворих даної групи склав 55,7±11,2, тривалість ЦД – 11,6±6,8 роки. Пацієнти основної групи (n=36) додатково отримували препарати вітаміну D<sub>3</sub>, які призначали на тлі традиційної терапії у дозі 4000 МО/добу терміном на 6 місяців. Середній вік хворих даної групи склав 59,6±10,7, тривалість ЦД – 9,3±6,9 років.

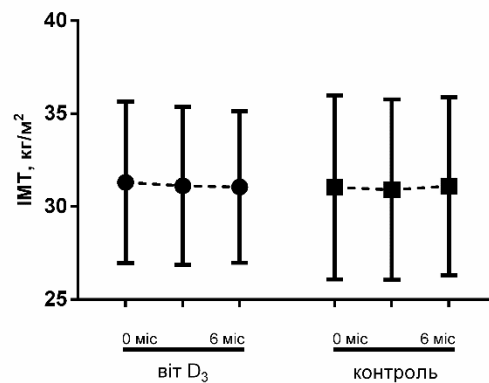
Перед початком, через 3 місяці і після лікування оцінювали антропометричні (маса тіла, ІМТ, ОТ), параметри глікемічного контролю (глікемія натще, HbA1c), ІР, індекси стеатозу, показники функціонального стану печінки (активність трансаміназ) і ліпідного (рівні ЗХС, ТГ та ліпопротеїнів у крові) обміну.

Зміни антропометричних показників у динаміці лікування обстежуваних груп представлені на **рис. 5.1**. У внутрішньогруповому аналізі не виявлено статистично значущої різниці по всім параметрам в динаміці лікування, проте відмічається різнонаправленість змін залежно від призначеної терапії.

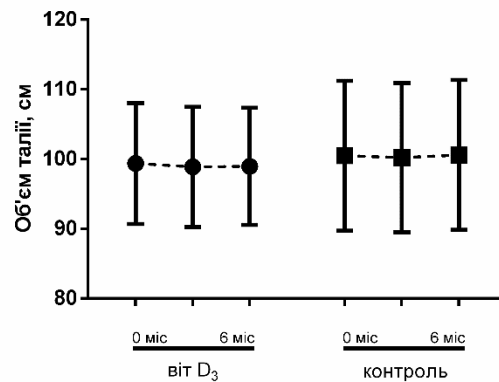
A



B



C



**Рис. 5.1.** Зміни антропометричних параметрів в динаміці лікування обстежуваних груп: **A** – маса тіла; **B** – індекс маси тіла; **C** – об'єм талії. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистично значущою вважалася різниця при  $p < 0,05$ .

В пацієнтів основної групи відмічено тенденцію до зниження антропометричних показників в часовому проміжку, яка була максимально вираженою через 6 місяців прийому вітаміну D<sub>3</sub>. Так маса тіла в середньому

знижилась на 0,78 (-0,08; 1,67;  $p=0,104$ ) кг, ІМТ - 0,25 (-0,05; 0,52;  $p=0,112$ ) кг/м<sup>2</sup> та ОТ на 0,42 (0,01; 0,78;  $p=0,057$ ) в порівнянні із показниками вихідного рівня (табл. 5.1).

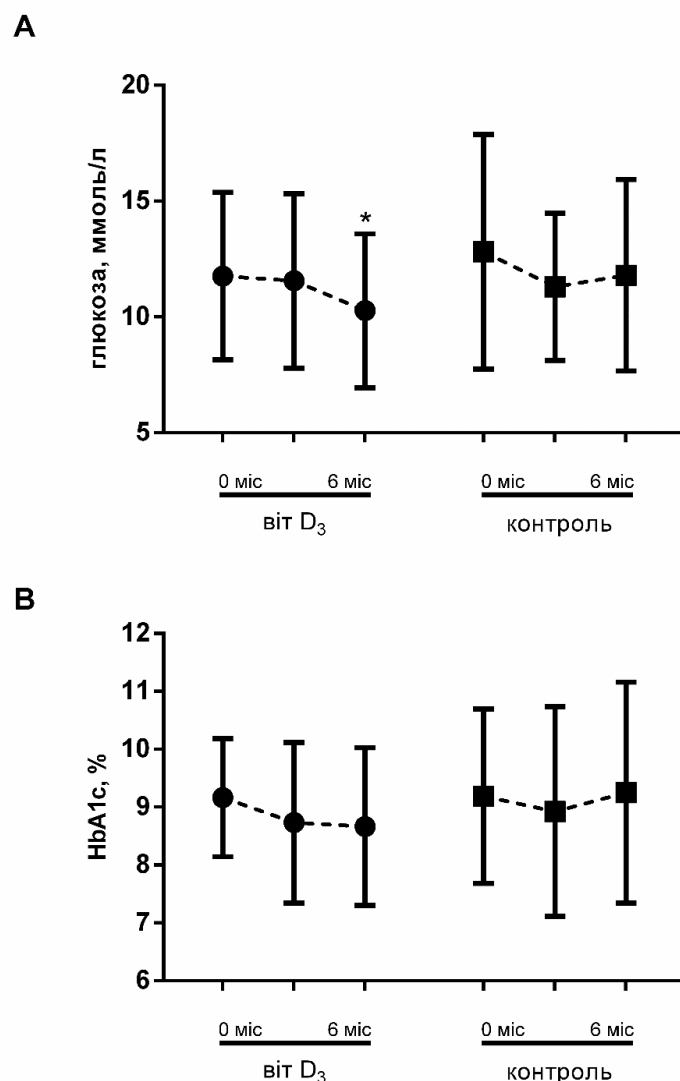
**Табл. 5.1.** Міжгруповий аналіз змін антропометричні параметрів.

Показник	Вихідний рівень	Середні зміни в абсолютному значенні		р	
		Δ 3 місяці	Δ 6 місяців	ефект часу	ефект лікування
<b>ІМТ, кг/м<sup>2</sup></b>				0,444	0,110
вітD3	31,30±4,35	0,18 (-0,13; 0,50)	0,25 (-0,05; 0,52)		
контроль	31,04±4,95	0,13 (-0,19; 0,51)	-0,06 (-0,36; 0,23)		
<b>Маса тіла, кг</b>				0,532	0,156
вітD3	95,78±16,2 2	0,54 (-0,28; 1,44)	0,78 (-0,08; 1,67)		
контроль	92,5±12,25	0,22 (-0,73; 1,15)	-0,21 (-1,19; 0,64)		
<b>ОТ, см</b>				0,126	0,160
вітD3	99,37±8,68	0,47 (-0,05; 0,89)	0,42 (0,01; 0,78)		
контроль	100,47±10, 74	0,26 (-0,14; 0,71)	-0,11 (-0,50; 0,23)		

Дані на вихідному рівні представлені у вигляді  $M \pm SD$ , середні зміни в часовому проміжку як  $M$  (95 % ДІ). Для міжгрупового порівняння з метою оцінки ефекту часу та призначеного лікування використано ANOVA аналіз з повторними вимірюваннями, з проведенням корекції за віком, статтю та ІМТ.

В групі порівнянні через 3 місяці відмічалась тенденція до зниження антропометричних показників, але через 6 місяців виявлено статистично не значуще зростання маси тіла в середньому на 0,21 (-1,19; 0,64;  $p=0,652$ ) кг, ІМТ - 0,06 (-0,36; 0,23;  $p=0,691$ ) кг/м<sup>2</sup> та ОТ на 0,11 (-0,50; 0,23;  $p=0,543$ ) в порівнянні із показниками вихідного рівня (табл. 5.1, рис. 5.1). Варто відзначити, що у міжгруповому аналізі статистично значущого впливу на

антропометричні показники в динаміці лікування вітаміном D<sub>3</sub> по всім часовим проміжкам виявлено не було (табл. 5.1).



**Рис. 5.2.** Зміни параметрів глікемічного контролю в динаміці лікування обстежуваних груп: **А** – глікемія натще; **В** – HbA1c. Дані представлені у вигляді M±SD. Статистично значущою вважалася різниця при p<0,05.

Згідно отриманих результатів встановлено, що використання в якості додатку до стандартної антидіабетичної терапії вітаміну D<sub>3</sub> було асоційоване з статистично значущим зниженням глікемії натще через 6 місяців лікування від 11,75±3,60 до 10,26±3,31 (p=0,041) (рис. 5.2А). З іншої сторони через 3 місяці від початку лікування рівень глюкози також знизився, проте зміни не були статистично значущими (рис. 5.2А). В групі порівняння спостерігалась

тенденція до зниження глікемії натще в обох часових проміжках, проте більш вираженою була через 3 місяці (рис. 5.2А). Як видно із табл. 5.2 в міжгруповому аналізі статистично значущих змін глікемії натще в динаміці не відмічалось.

**Табл. 5.2.** Міжгруповий аналіз змін параметрів вуглеводного обміну в обстежуваних пацієнтів.

Показник	Вихідний рівень	Середні зміни в абсолютному значенні		р	
		Δ 3 місяці	Δ 6 місяців	ефект часу	ефект лікування
<b>НbA1c, %</b>				0,248	0,381
вітD3	9,16±1,02	0,43 (-0,08; 0,90)	0,50 (-0,08; 1,07)		
контроль	9,18±1,5	0,26 (-0,37; 0,89)	-0,05 (-0,58; 0,43)		
<b>Глюкоза натще, ммоль/л</b>				0,143	0,385
вітD3	11,75±3,6	0,20 (-1,35; 1,56)	0,49 (0,22; 2,82)		
контроль	12,81±5,07	1,51 (-0,30; 3,63)	1,01 (-1,42; 3,02)		
<b>С-пептид, нг/мл</b>				0,567	0,817
вітD3	2,58±1,66	-0,04 (-0,28; 0,19)	-0,01 (-0,33; 0,34)		
контроль	2,41±1,2	-0,21 (-0,66; 0,25)	-0,14 (-0,72; 0,45)		
<b>НОМА-2IR</b>				0,678	0,574
вітD3	2,76±1,41	0,15 (-0,27; 0,57)	0,31 (-0,13; 0,76)		
контроль	2,65±1,0	0,04 (-0,44; 0,59)	-0,01 (-0,49; 0,50)		
<b>Чутливість до інсуліну, %S</b>				0,971	0,600
вітD3	44,41±21,86	1,73 (-6,63; 11,29)	-1,65 (-9,88; 6,47)		
контроль	42,6±14,35	-2,11	0,36		

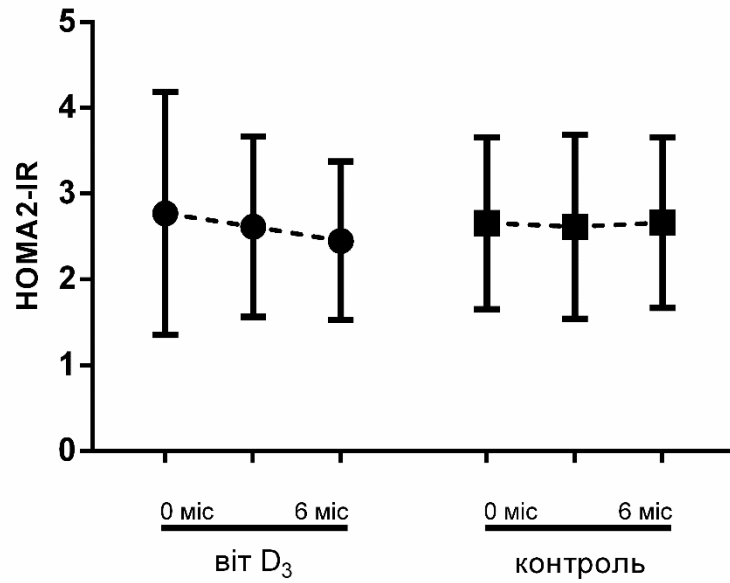
		(-14,25; 6,40)	(-7,08; 7,80)		
<b>Функція <math>\beta</math>-клітин, %В</b>				0,792	0,309
вітD3	47,03 $\pm$ 42,46	3,12 (-9,93; 21,61)	-3,94 (-16,45; 12,11)		
контроль	38,52 $\pm$ 29,04	-7,41 (-17,18; 1,88)	-3,71 (-18,91; 14,34)		

Дані на вихідному рівні представлені у вигляді  $M \pm SD$ , середні зміни в часовому проміжку як  $M(95\% \text{ ДІ})$ . Для міжгрупового порівняння з метою оцінки ефекту часу та призначеного лікування використано ANOVA аналіз з повторними вимірюваннями, з проведенням корекції за віком, статтю та ІМТ.

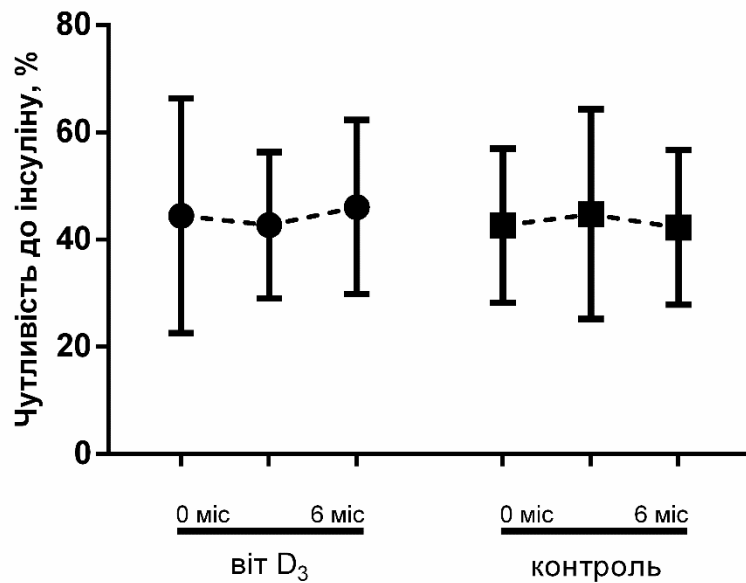
Рівень іншого параметру глікемічного контролю - HbA1c, у основній групі пацієнтів в середньому знизився на 0,43 % ( $p=0,109$ ) через 3 місяці, та залишився практично на такому ж рівні і через 6 місяців – 0,50 (-0,08; 1,07;  $p=0,092$ ). В обох часових інтервалах зміни були статистично не значущими в порівнянні із вихідним рівнем. В групі порівняння спостерігалась наступна динаміка змін даного показника: на початковому етапі ми відмітили тенденцію до зниження HbA1c на 0,26 (-0,37; 0,89;  $p=0,432$ ), проте в подальшому його значення повернулось практично до вихідного рівня. В міжгруповому регресійному аналізі статистично значущих змін HbA1c в динаміці лікування не виявлено.

Паралельно із покращенням параметрів глікемічного контролю у пацієнтів основної групи, які отримували замісну терапію вітаміном D<sub>3</sub> спостерігалось зниження ІР. Як видно із **рис. 5.3** через 6 місяців лікування вітаміном D<sub>3</sub> спостерігалась тенденція до зниження індексу НОМА-2ІР на 0,31 (-0,13; 0,76;  $p=0,191$ ) та покращення чутливості до інсуліну (S %) на 1,65 (-9,88; 6,47;  $p=0,697$ ) в порівнянні із показниками вихідного рівня (**табл. 5.2**).

A



B

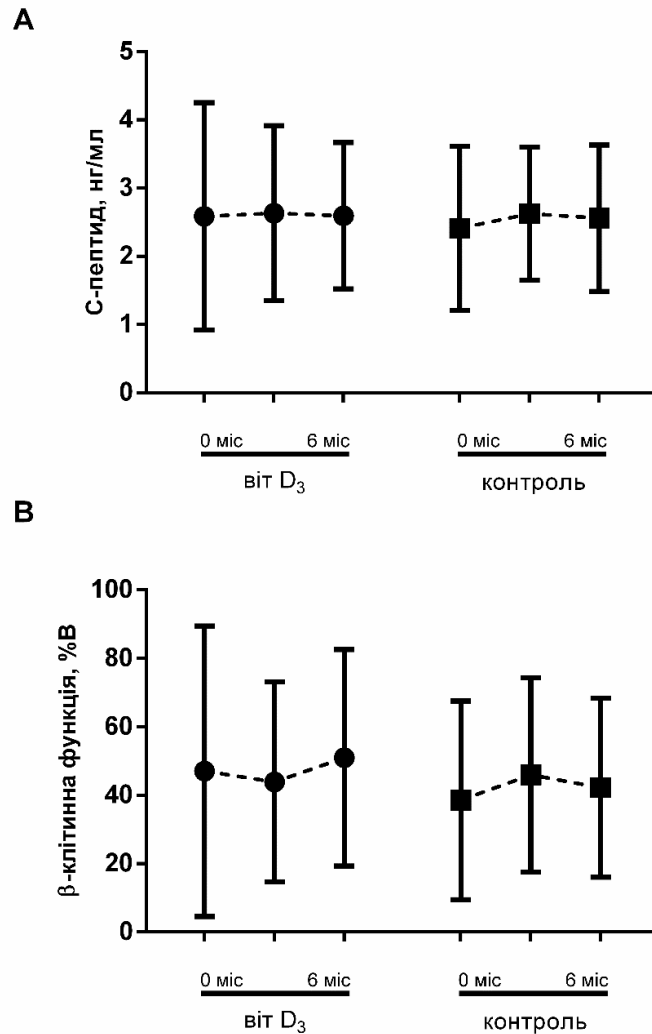


**Рис. 5.3.** Зміни індексів ІР в динаміці лікування обстежуваних груп: А – НОМА2-ІР; В – чутливість до інсуліну, S %. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистично значущою вважалася різниця при  $p < 0,05$ .

На противагу в групі порівняння, індекс НОМА2-ІР практично залишився ідентичним вихідному рівню, водночас як S (%) в динаміці лікування погіршився. Незважаючи на негативну динаміку індексів ІР в групі порівняння, в міжгруповому аналізі з використанням регресійного аналізу з



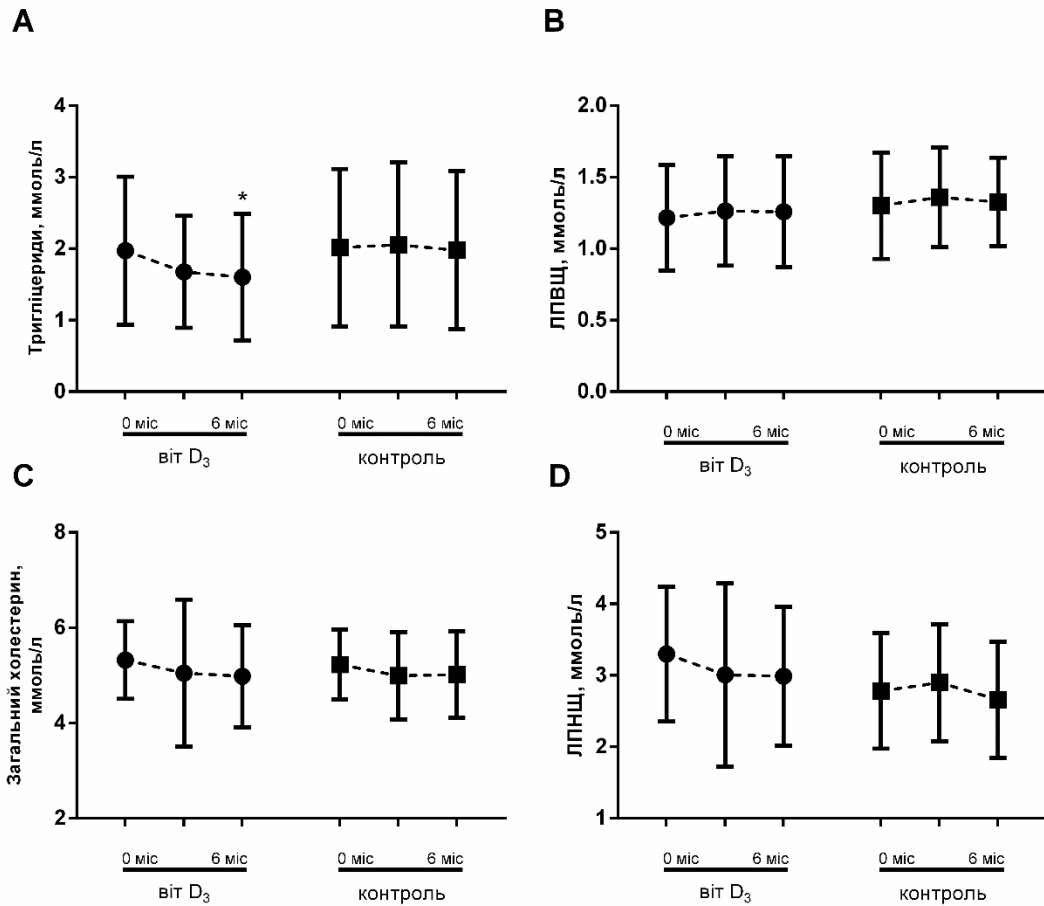
повторними вимірюваннями, ми не виявили статистично значущої різниці між змінами даних параметрів в залежності від отримуваної терапії ( $p=0,574$  для НОМА2-IR;  $p=0,600$  для S, %) та на протязі всього періоду лікування ( $p=0,678$  для НОМА2-IR;  $p=0,971$  для S, %) (табл. 5.2).



**Рис. 5.4.** Зміни С-пептиду (А) та функціональної активності β-клітин в динаміці лікування обстежуваних груп. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистично значущою вважалася різниця при  $p < 0,05$ .

Рівень С-пептиду під впливом лікування вітаміном D<sub>3</sub>, а також в пацієнтів із групи порівняння залишився не зміним через 6 місяців інтервенційного періоду. З іншої сторони через 6 місяців як у пацієнтів основної так і в групі порівняння спостерігалась тенденція до покращення

функції  $\beta$ -клітин на 3,94 (-16,45; 12,11;  $p=0,588$ ) 3,71 (-18,91; 14,34;  $p=0,669$ ) відповідно (табл. 5.2). Проте з іншої сторони обидва параметри статистично достовірно не змінилися в міжгруповому аналізі (табл. 5.2).



**Рис. 5.5.** Зміни показників ліпідограми в динаміці лікування обстежуваних груп: **A** – тригліцериди; **B** – ЛПВЩ; **C** – загальний холестерин; **D** – ЛПНЩ. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистично значущою вважалася різниця при  $p < 0,05$ .

Аналіз змін ліпідних параметрів сироватки крові обстежуваних груп представлено на **рис. 5.5**. Серед досліджуваних показників статистично значущо під впливом лікування препаратом вітаміну D<sub>3</sub> змінився лише рівень ТГ. Встановлено, що на вихідному рівні концентрація ТГ в крові склала  $1,97 \pm 1,03$  ммоль/л і знизилась після 6 місяців лікування до  $1,60 \pm 0,88$  ммоль/л ( $p=0,013$ ). Для інших показників ліпідограми основної групи встановлено не

значуще зниження рівнів ЗХС в середньому на 0,34 (-0,07; 0,72) ммоль/л ( $p=0,124$ ), ЛПНЩ – 0,30 (-0,14; 0,76) ммоль/л ( $p=0,192$ ) та підвищення ЛПВЩ на 0,04 (-0,17; 0,12) ммоль/л ( $p=0,547$ ) після 6 місяців лікування (рис. 5.5 В-D, табл. 5.3).

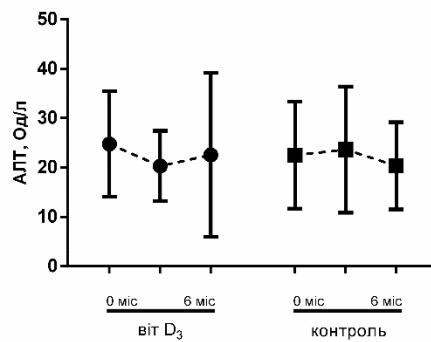
**Табл. 5.3.** Міжгруповий аналіз змін параметрів ліпідограми в обстежуваних пацієнтів.

Показник	Вихідний рівень	Середні зміни в абсолютному значенні		p	
		Δ 3 місяці	Δ 6 місяців	ефект часу	ефект лікування
<b>ЗХС, ммоль/л</b>				0,184	0,880
вітD3	5,31±0,81	0,27 (-0,38; 0,93)	0,34 (-0,07; 0,72)		
контроль	5,22±0,73	0,23 (-0,12; 0,61)	0,21 (-0,11; 0,60)		
<b>ТГ, ммоль/л</b>				0,199	0,266
вітD3	1,97±1,03	0,29 (-0,02; 0,62)	0,37 (0,13; 0,64)		
контроль	2,01±1,10	-0,04 (-0,35; 0,25)	0,03 (-0,30; 0,38)		
<b>ЛПВЩ, ммоль/л</b>				0,520	0,913
вітD3	1,21±0,36	-0,04 (-0,19; 0,09)	-0,04 (-0,17; 0,12)		
контроль	1,29±0,37	-0,05 (-0,13; 0,01)	-0,02 (-0,13; 0,10)		
<b>ЛПНЩ, ммоль/л</b>				0,317	0,548
вітD3	3,29±0,94	0,29 (-0,34; 0,93)	0,30 (-0,14; 0,76)		
контроль	2,78±0,80	-0,11 (-0,39; 0,18)	0,11 (-0,18; 0,45)		

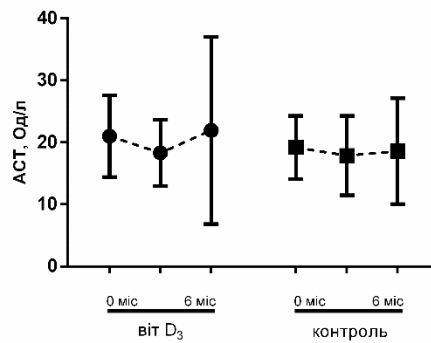
Дані на вихідному рівні представлені у вигляді  $M \pm SD$ , середні зміни в часовому проміжку як  $M(95\% \text{ ДІ})$ . Для міжгрупового порівняння з метою оцінки ефекту часу та призначеного лікування використано ANOVA аналіз з повторними вимірюваннями, з проведенням корекції за віком, статтю та ІМТ.

Рівень ТГ в групі порівняння не змінився через 3 та 6 місяців. В іншому схожа тенденція змін параметрів ліпідограми спостерігалась в групі порівняння, проте зміни носили менш виражений характер порівняно із пацієнтами які отримували вітамін D<sub>3</sub>. Згідно отриманих результатів рівень ЗХС в середньому знизився на 0,21 (-0,11; 0,60) ммоль/л (p=0,466), ЛПНЩ – 0,11 (-0,18; 0,45) ммоль/л (p=0,291) та ЛПВЩ підвищились на 0,02 (-0,13; 0,10) ммоль/л (p=0,599) після 6 місяців лікування (рис. 5.5 В-D, табл. 5.3).

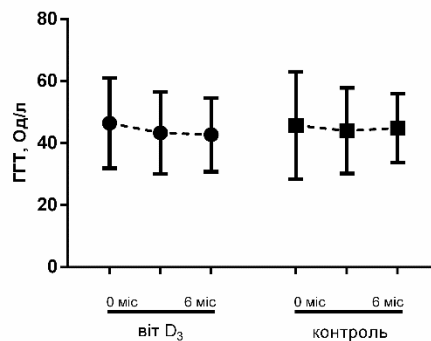
**А**



**В**



**С**



**Рис. 5.6. Зміни активності трансаміназ в динаміці лікування обстежуваних груп: А – АЛТ; В – АСТ; С – ГГТ. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистично значущою вважалася різниця при  $p < 0,05$ .**

Активність трансаміназ як один із основних лабораторних параметрів, що характеризує функціональну активність та запально-некротичні зміни в тканині печінки також вивчались в даному дослідженні (рис. 5.6 А-С, табл. 5.4).

**Табл. 5.4.** Міжгруповий аналіз змін індексів стеатозу печінки та активності трансаміназ в обстежуваних пацієнтів.

Показник	Вихідний рівень	Середні зміни в абсолютному значенні		р	
		Δ 3 місяці	Δ 6 місяців	ефект часу	ефект лікування
<b>АЛТ, Од/л</b>				0,604	0,211
вітD3	24,78±10,69	4,47 (-0,42; 9,52)	2,21 (-8,23; 10,04)		
контроль	22,52±10,84	-1,11 (-5,49; 2,92)	2,17 (-2,20; 6,64)		
<b>АСТ, Од/л</b>				0,174	0,688
вітD3	21,0±6,59	2,68 (-0,66; 6,43)	-0,94 (-9,77; 4,88)		
контроль	19,17±5,1	1,29 (-1,19; 3,72)	0,58 (-3,44; 4,43)		
<b>ГГТ, Од/л</b>				0,256	0,620
вітD3	46,49±14,55	3,12 (-0,82; 7,15)	3,75 (0,17; 7,51)		
контроль	45,76±17,36	1,7 (-2,94; 6,42)	0,88 (-3,64; 5,17)		
<b>HSI</b>				0,189	0,171
вітD3	43,37±5,89	0,75 (-0,35; 2,04)	1,4 (0,11; 2,69)		
контроль	42,8±6,27	-1,49 (-3,47; 0,46)	-0,08 (-1,79; 1,65)		
<b>FLI</b>				0,793	0,027
вітD3	73,21±20,82	2,64 (-1,38; 6,74)	3,29 (0,79; 5,79)		
контроль	72,4±21,34	-0,71 (-5,24; 3,16)	-2,11 (-5,11; 0,35)		

<b>TyG індекс</b>				0,066	0,487
вітD3	5,13±0,32	0,06 (-0,05; 0,18)	0,13 (0,03; 0,24)		
контроль	5,23±0,34	0,12 (0,01; 0,25)	0,07 (-0,05; 0,22)		

Дані на вихідному рівні представлені у вигляді  $M \pm SD$ , середні зміни в часовому проміжку як  $M(95\% \text{ ДІ})$ . Для міжгрупового порівняння з метою оцінки ефекту часу та призначеного лікування використано ANOVA аналіз з повторними вимірюваннями, з проведенням корекції за віком, статтю та ІМТ.

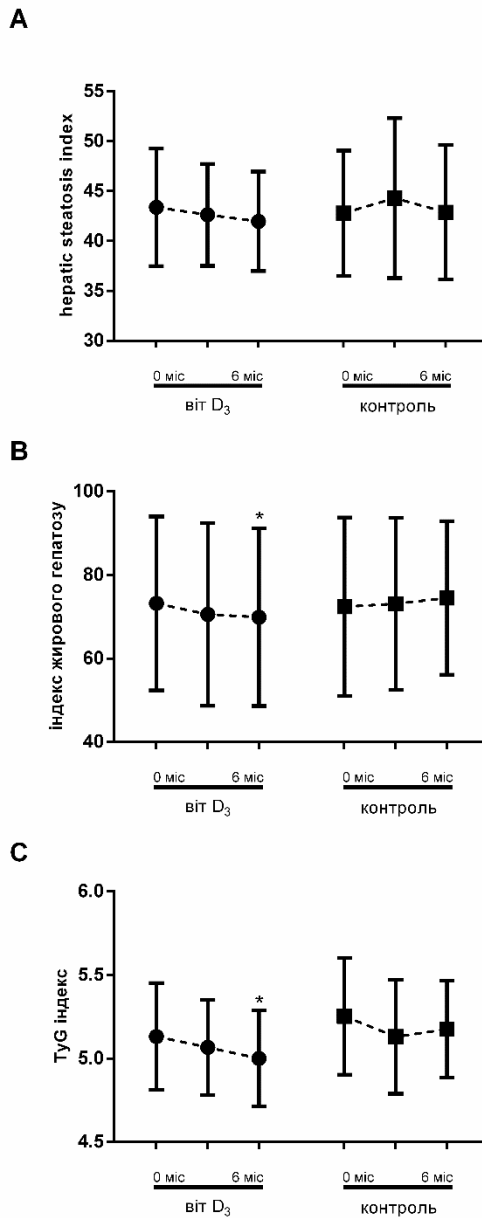
Активність АЛТ (**рис. 5.6 А, табл. 5.4**) максимально знизилась в середньому на 4,47 (-0,42; 9,52) ОД/л ( $p=0,119$ ) після курсу вітаміну D<sub>3</sub> через 3 місяці. В групі порівняння в даний часовий проміжок навпаки спостерігали статистично не значуще підвищення активності АЛТ на 1,11 (-5,49; 2,92) ОД/л (1,11 ( $p=0,616$ )) (**рис. 5.6 А, табл. 5.4**). Через 6 місяців спостереження в обох обстежуваних групах активність АЛТ знизилась в середньому на 2 ОД/л, що було статистично не значуще в порівнянні із вихідними показниками.

Активність АСТ через 3 місяці періоду інтервенції в обох обстежуваних групах знизилась, а через 6 ми спостерігали статистично не значуще підвищення АСТ в середньому на 0,94 (-9,77; 4,88) ОД/л ( $p=0,811$ ) після курсу вітаміну D<sub>3</sub>, та зниження на 0,58 (-3,44; 4,43) ОД/л ( $p=0,781$ ) в групі порівняння відповідно (**рис. 5.6 В, табл. 5.4**).

Згідно отриманих результатів активність ГГТ статистично не значуще знизилась по всім часовим проміжкам в обох обстежуваних групах (**рис. 5.6 С, табл. 5.4**), проте максимально вираженою була різниця після курсу вітаміну D<sub>3</sub>. Активність ГГТ на вихідному рівні склала  $46,49 \pm 14,55$  ОД/л і знизилась у пацієнтів основної групи через 6 місяців інтервенції до  $43,36 \pm 13,22$  ОД/л ( $p=0,066$ ) (**рис. 5.6 С, табл. 5.4**).

Варто відзначити, що в дане дослідження включались пацієнти в основному із НАСП та без ознак виражених запально-некротичних змін, та більш того підвищення активності трансаміназ більше чим в 3 рази верхнього референтного значення було критерієм виключення. Тому середні значення

для активності всіх трансаміназ не перевищувало верхнього референтного значення, а зміни в динаміці лікування не носили статистично значущого характеру, що було підтверджено як у внутрішньо- так і міжгруповому аналізах (табл. 5.4).



**Рис. 5.7.** Зміни індексів стеатозу печінки в динаміці лікування обстежуваних груп: **A** – HSI; **B** – FLI; **C** – TyG індекс. Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Статистично значущою вважалася різниця при  $p < 0,05$ .

Очікувано, що основні зміни лабораторних параметрів в динаміці лікування стосувались індексів жирового гепатозу, оскільки основну когорту

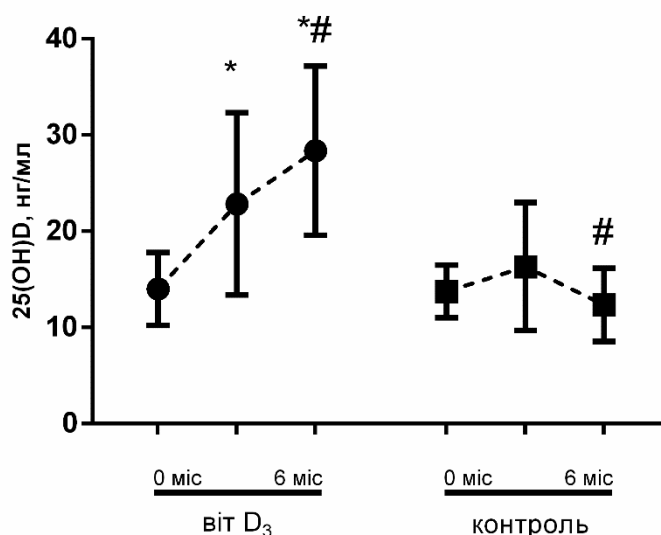
обстежуваних склали пацієнти із ЦД типу 2 та НАЖХП з превалюванням НАСП. У внутрішньогруповому аналізі, встановлено, що використання вітаміну D<sub>3</sub> асоційоване із зниженням індексів стеатозу в пацієнтів із ЦД типу 2 та НАЖХП. Згідно отриманих результатів через 3 місяці лікування спостерігалось не достовірне зниження FLI та TuG індексу. Так Δ через 3 місяці для FLI становила 2,64 (-1,38; 6,74; p=0,214) та відповідно для TuG – 0,06 (-0,05; 0,18; p=0,276). Через 6 місяців інтервенційного періоду, під впливом лікування вітаміном D<sub>3</sub> в основній групі спостерігалось подальше зниження обох індексів, яке набуло статистично значущого характеру в порівнянні із показниками вихідного рівня. Між показниками Δ3 та Δ6 місяців статистично значущої різниці не виявлено. Базове значення для FLI склало 73,21±20,82 та для TuG - 5,13±0,32, а після 6-ти місячного курсу лікування вітаміном D<sub>3</sub> знизилось відповідно до 69,91±21,27 (p=0,023) та 5,00±0,28 (p=0,024). В групі порівняння зміни вищезазначених індексів носили тенденційний характер, проте для FLI в динаміці лікування зростав, а TuG індекс навпаки знижувався, з максимально вираженим ефектом через 3 місяці. В міжгруповому аналізі ANOVA з повторними вимірюваннями, статистично значущі зміни залишились лише для FLI при акценті на ефекті лікування (p=0,027) (рис. 5.7 В, С, табл. 5.4).

У пацієнтів основної групи встановлено, прогредієнтне зниження індексу HSI в динаміці лікування, проте на відміну від інших індексів стеатозу зміни носили тенденційний характер. Згідно отриманих результатів на вихідному рівні середнє значення для HSI склало 43,37±5,89 та знизилось після 6 місяців курсової терапії вітаміном D<sub>3</sub> до 41,97±4,98 (p=0,060) (рис. 5.7 С, табл. 5.4). В групі порівняння середнє значення даного індексу в динаміці лікування зросло в обох часових проміжках. В міжгруповому аналізі з оцінкою ефекту призначеного лікування (p=0,189) та часу (p=0,171) статистично значущих змін для HSI виявлено не було (табл. 5.4).

Підсумовуючи результати отримані в ході дослідження, можна спостерігати не достовірне покращення основних глікемічних та



метаболічних параметрів в групі порівняння через 3 місяці з наступним вираженим погіршенням через 6 місяців. Встановлену закономірність частково можна пояснити сезонністю включення пацієнтів в дослідження з наступною відповідною динамікою змін середнього значення вітаміну D<sub>3</sub> в групі порівняння (рис. 5.8).



**Рис. 5.8.** Зміни вітаміну D<sub>3</sub> в динаміці лікування обстежуваних груп. Дані представлені у вигляді M±SD. Статистично значущою вважалася різниця при p<0,05. \* - статистично значуща різниця в порівнянні із вихідним рівнем; # - статистично значуща різниця в порівнянні із показником 3-х місяців.

Основний етап набору в дослідження тривав в пізній весняний та початок літнього періоду, з максимальною інсоляцією характерною для даних широт, тому на вихідному рівні показник вітаміну D в групі порівняння склав 13,75±2,72 нг/мл, після 3-х місяців його значення зросло до 16,32±6,65нг/мл, що було статистично не значимо в порівнянні із базовим значенням. Більшість пацієнтів групи порівняння завершили участь в дослідженні в зимовий період. Оскільки вони не отримували замісної терапії препаратами вітаміну D<sub>3</sub> та на фоні сезонного браку сонячного випромінювання, концентрація вітаміну D<sub>3</sub> в їх сироватці крові склала 12,35±3,8 нг/мл, що було статистично значущо нижче в порівнянні із значенням 3-х місячного рівня (p=0,013) та більш того

відмічалось прогресування  $D_3$ -дефіциту, оскільки показник знизився нижче базового рівня.

В пацієнтів основної групи на фоні замісної терапії спостерігалось прогредієнтне статистично значуще зростання концентрації вітаміну  $D_3$  в сироватці крові. Рівень вітаміну  $D_3$  на вихідному рівні склав  $14,00 \pm 3,78$ , через 3 місяці його концентрація зросла до  $22,82 \pm 9,46$  нг/мл ( $p < 0,001$  в порівнянні із вихідним рівнем), а через 6 місяців досягла рівня  $28,38 \pm 8,80$  нг/мл, що було статистично значущо вище в порівнянні із показниками обох попередніх часових інтервалів. Середнє значення для концентрації вітаміну  $D_3$  не досягло критерію його оптимального забезпечення в організмі, проте аналіз індивідуальних змін виявив, що у понад 60 % пацієнтів основної групи даного критерію було досягнуто. Все вище зазначене, обумовлює доцільність використання препаратів вітаміну  $D_3$  у пацієнтів із його дефіцитом в дозі 4000 МО/доба на курс не менше 6 місяців з метою покращення параметрів глікемічного контролю та метаболічного профілю у хворих на ЦД типу 2 з НАЖХП.

**Резюме:** Для вивчення ефективності застосування препаратів вітаміну  $D_3$  нами загалом проліковано 72 пацієнти з НАЖХП та ЦД типу 2 на фоні встановленого  $D$  дефіциту, які рівномірно були розподілені на 2 групи. Хворі групи порівняння ( $n=36$ ) отримували виключно традиційну антидіабетичну терапію, а основної групи ( $n=36$ ) додатково отримували препарати вітаміну  $D_3$ , які призначали у дозі 4000 МО/добу терміном на 6 місяців. Антропометричні параметри статистично значущо в динаміці лікування не змінились у пацієнтів обох обстежуваних груп.

Використання вітаміну  $D_3$  було асоційоване з статистично значущим зниженням глікемії натще через 6 місяців лікування від  $11,75 \pm 3,60$  до  $10,26 \pm 3,31$  ( $p=0,041$ ). Рівень  $HbA_{1c}$ , у основній групі пацієнтів в середньому знизився на 0,43 % ( $p=0,109$ ) через 3 місяці, та не змінився і через 6 місяців – 0,50 (-0,08; 1,07;  $p=0,092$ ). В обох часових інтервалах зміни були статистично

не значущими в порівнянні із вихідним рівнем. Паралельно із покращенням параметрів глікемічного контролю у пацієнтів основної групи, спостерігалась тенденція до зниження індексу HOMA-2IR на 0,31 (-0,13; 0,76;  $p=0,191$ ) та покращення чутливості до інсуліну ( $S\%$ ) на 1,65 (-9,88; 6,47;  $p=0,697$ ) в порівнянні із показниками вихідного рівня.

Аналіз змін ліпідних параметрів продемонстрував, що статистично значущо під впливом лікування препаратом вітаміну  $D_3$  змінився лише рівень ТГ ( $1,97\pm 1,03$  проти  $1,60\pm 0,88$  ммоль/л,  $p=0,013$ ).

Активність трансаміназ як один із основних лабораторних параметрів, що характеризує функціональну активність та запально-некротичні зміни в тканині печінки статистично значущо не змінились, проте варто відзначити, що в дане дослідження включались пацієнти в основному із НАСП.

У внутрішньогруповому аналізі, встановлено, що використання вітаміну  $D_3$  асоційоване із зниженням індексів стеатозу: FLI та TyG індексу. Базове значення для FLI склало  $73,21\pm 20,82$  та для TyG -  $5,13\pm 0,32$ , а після 6-ти місячного курсу лікування вітаміном  $D_3$  знизилось відповідно до  $69,91\pm 21,27$  ( $p=0,023$ ) та  $5,00\pm 0,28$  ( $p=0,024$ ).

Підсумовуючи результати отримані в ході дослідження, можна спостерігати не достовірне покращення основних глікемічних та метаболічних параметрів в групі порівняння через 3 місяці з наступним вираженим погіршенням через 6 місяців. Встановлену закономірність частково можна пояснити сезонністю включення пацієнтів в дослідження. Основний етап набору в дослідження тривав в пізній весняний та початок літнього періоду, з максимальною інсоляцією характерною для даних широт, а більшість пацієнтів завершили участь в дослідженні в зимовий період. Оскільки вони не отримували замісної терапії препаратами вітаміну  $D_3$  та на фоні сезонного браку сонячного випромінювання, в них відмічалось прогресування  $D_3$ -дефіциту.

В пацієнтів основної групи на фоні замісної терапії спостерігалось прогредієнтне статистично значуще зростання концентрації вітаміну  $D_3$  в

сироватці крові, з досягненням оптимального забезпечення організму вітаміном у понад 60 % пацієнтів. Все вище зазначене, обумовлює доцільність використання препаратів вітаміну D<sub>3</sub> у пацієнтів із його дефіцитом в дозі 4000 МО/доба на курс не менше 6 місяців з метою покращення параметрів глікемічного контролю та метаболічного профілю у хворих на ЦД типу 2 з НАЖХП.

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Наведений огляд літератури свідчить про надзвичайну важливість підтримання в організмі достатньої кількості вітаміну D для нормального функціонування організму людини [2, 40, 43, 50]. Дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> в даний час визнаний пандемією з вираженими клінічними ефектами [1]. Його поширеність варіюється в залежності від географічного положення, сезону та етнічної приналежності. Незважаючи на певні відмінності у лабораторних підходах, які використовуються для визначення порогової величини D та його дефіциту у різних країнах, очевидним є факт, що практично в усіх регіонах світу реєструються субоптимальні рівні 25(OH)D у широких верств населення [247].

На сьогодні механізми протизапального і гепатопротекторного дії вітаміну D<sub>3</sub> (холекальциферолу) і в цілому наукове обґрунтування можливості його ефективного застосування в клініці ЦД 2-го типу активно вивчається в науковій літературі [6, 8, 17, 19–27]. Також залишаються недостатньо розробленими підходи і показання до комплексного лікування вітаміну D-дефіцитних станів у пацієнтів, які страждають НАЖХП і ЦД 2-го типу. Дані літератури суперечливі, більшість досліджень стверджують про ефективність лікування вітаміном D<sub>3</sub> пацієнтів, які страждають НАЖХП і ЦД 2-го типу [8, 23, 28–30], а інші доводять його не ефективність [31–33] і навіть токсичність його прийому [34–38].

Отже, безперечно актуальним є дослідження терапевтичного потенціалу препаратів вітаміну D<sub>3</sub> в комплексному лікуванні пацієнтів з недостатньою забезпеченістю організму вітаміном D<sub>3</sub> з метою розробки нових оптимальних схем терапії НАЖХП, асоційованої з розвитком ЦД типу 2. Вищесказане обумовлює необхідність глибокого і всебічного вивчення важливої наукової

проблеми, яка полягає в необхідності експериментального обґрунтування ефективності застосування вітаміну D<sub>3</sub> для профілактики і корекції метаболічних порушень і структурно-функціональних змін у печінці при ЦД 2-го типу, що і обумовило мету дисертаційної роботи.

За ЦД типу 2 ключову роль у розвитку каскаду метаболічних порушень відіграє ІР. Для найбільш адекватного експериментального відтворення патогенезу і клінічних симптомів ЦД типу 2 важливо, щоб порушення ліпідного обміну і периферична ІР передували розвитку гіперглікемії. У даному експерименті ІР модулювали шляхом двомісячного утримання піддослідних щурів на висококалорійної дієті з підвищеним вмістом жирів і вуглеводів (фруктози). Відомо, що поєднання ІР з дисфункцією β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози є важливим етапом патогенезу ЦД типу 2 [206]. З цією метою на 61-у добу експерименту тваринам одноразово вводили стрептозоточин в низькій дозі (25 мг/кг, внутрішньоочеревинно).

Інтраперитонеальний тест толерантності до екзогенного інсуліну, проведений через 74-и доби після введення STZ (на 105-у добу експерименту), показав істотне порушення чутливості до дії гормону в порівнянні з контрольною групою.

Дієта із підвищеним вмістом жирів, викликає ІР та порушення толерантності до глюкози, в першу чергу, в результаті розвитку ожиріння і дисліпідемії. Зокрема відомо, що інтенсивне надходження ВЖК з жирової тканини за рахунок активування ліполізу супроводжується більш вираженою ІР та погіршенням перебігу ЦД [208]. Високі концентрації ВЖК у сироватці крові призводять до збільшення внутрішньоклітинної концентрації ацил-КоА і диацилгліцерола, викликаючи активацію РКС-θ і фосфорилування інсулінового рецептора-1 (IRS-1) за залишком Ser307. Ці зміни гальмують активацію IRS-1-асоційованої PI3-кінази і пригнічують стимулювання інсуліном глюкозотранспортної системи [209]. ВЖК також пригнічують окислення глюкози (глюкозо-жирнокислотний цикл Рендла), підтримуючи і посилюючи стан ІР [210]. У свою чергу, гіперглікемія та оксидативний стрес

сприяють виснаженню пулу інсуліну в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози та індують їх загибель [211]. У відповідності із зазначеними спостереженнями, нами показано, що у тварин з ЦД типу 2 в 2,7 рази збільшувався вміст циркулюючих загальних ліпідів, майже в 2 рази – ВЖК і в 4 рази – ТГ.

Свідченням дисфункції печінки у тварин з експериментальним ЦД типу 2 є підвищення активності АЛТ на 41%. При цьому активність АСТ істотно не відрізнялася від показників контрольної групи. Підвищення активності печінкових ензимів, як правило, знаходиться в позитивній кореляції з порушенням структурно-функціональної цілісності клітинних структур печінки і прискореним виходом ензимів в загальний кровотік [151]. У ряді клініко-експериментальних досліджень було показано, що виражена ІР може виникати при хронічній печінковій недостатності, яка викликана вірусними гепатитами В і С, а також після часткової гепатектомії [214]. Відомо, що при хронічних дифузних захворюваннях печінки ІР може бути обумовлена зменшенням кількості функціонально активних клітинних елементів, що є причиною зниження екстракції і метаболічного кліренсу інсуліну печінкою, пролонгованої гіперінсулінемії після прийому їжі і зменшення глікогенної ємності печінки [215].

Дефіцит вітаміну  $D_3$  пов'язують із ризиком виникнення різних хронічних захворювань, у тому числі ЦД та його ускладнень [183]. Більш того, терапевтичне застосування вітаміну  $D_3$  у клінічній практиці призводило до часткової корекції порушеної толерантності до глюкози та гальмування розвитку ЦД як 1, так і 2 типу [216]. Це обумовило доцільність подальшого з'ясування механізмів протидіабетичної та цитопротекторної дії вітаміну  $D_3$  на експериментальній моделі ЦД типу 2 у щурів.

Терапія вітаміном  $D_3$  в дозі 780 МО/кг маси тіла упродовж 30 діб, підвищуючи чутливість периферичних тканин до інсуліну, сприяла посиленню утилізації глюкози в них, що проявлялося компенсацією вуглеводного обміну у тварин з ЦД типу 2. Крім того, за біохімічним маркером активності АЛТ в сироватці крові було продемонстровано гепатопротекторну

дію холекальциферолу в нормалізації порушень структурно-функціональної цілісності клітинних структур печінки.

Конкретні молекулярні механізми реалізації встановлених терапевтичних ефектів вітаміну D<sub>3</sub> залишаються не до кінці зрозумілими. На сьогодні доведено здатність вітаміну безпосередньо посилювати синтез інсуліну і його вивільнення з β-клітин підшлункової залози, а також збільшувати експресію рецептора інсуліну в периферичних тканинах [217]. Беручи участь в реалізації імунної функції і регулюванні цитокінових систем, опосередковано через зниження хронічного системного запалення в організмі, вітамін D<sub>3</sub> може також чинити позитивний вплив на ожиріння та IP, а також захищати острівцеві β-клітин підшлункової залози від аутоімунного руйнування [218]. До того ж можна вважати, що важливе місце в регулюванні інсулінової функції займає і модуляторний вплив вітаміну D<sub>3</sub> на пост-рецепторні події, тобто на здатність клітин периферичних тканин відповідати на дію гормону після зв'язування з рецептором.

Оксидативний стрес, пов'язаний з підвищеним утворенням АФК і зниженням ефективності системи антиоксидантного захисту, привертає пильну увагу дослідників як один з універсальних механізмів деструктивних змін в патогенезі різних хронічних захворювань печінки [219]. Щоб з'ясувати можливе залучення прооксидантних процесів в розвиток гепатоцелюлярної дисфункції, асоційованої з ЦД типу 2, ми дослідили рівень генерування вільних радикалів у первинній культурі гепатоцитів. Терапевтичне застосування вітаміну D<sub>3</sub> знижувало на 23% рівень продукування АФК ізольованими гепатоцитами у порівнянні з ЦД типу 2, що узгоджується з даними літератури про антиоксидантну дію цієї сполуки [220, 221].

Стратегічне положення на перехресті різних сигнальних шляхів у нормі та за патології займає ядерний фактор транскрипції κB (NF-κB) – клітинний сенсор оксидативного стресу і ключовий регулятор імунної відповіді, процесів запалення, виживання та апоптотичної загибелі клітин [222]. Індуковані ЦД типу 2 зміни активності NF-κB і асоційованих з ним сигнальних шляхів



можуть бути центральними молекулярно-клітинними подіями в розвитку дисфункції печінки. Однак, на сьогодні залишається не до кінця з'ясованими патофізіологічні наслідки порушення експресії NF-κB у тканині печінки за ЦД типу 2, а також роль сигнальної системи NF-κB у механізмі реалізації протидіабетичних та гепатопротекторних ефектів вітаміну D<sub>3</sub>.

Як відомо, найбільш поширена форма NF-κB складається з великої субодиниці RelA (p65), яка формує гетеродимер зі структурно спорідненим протеїном p50. За звичайних умов димер NF-κB знаходиться в цитоплазмі у неактивному комплексі з IκB (інгібітором NF-κB). У відповідь на дію клітинних стимулів активується АФК-залежна кіназа IκB (IKK), яка фосфорилує IκB, що призводить до протеасомної деградації останнього. NF-κB вивільнюється з інгібіторного комплексу, фосфорилується за специфічними залишками амінокислот та транслокується до ядра, де зв'язуючись зі специфічними послідовностями ДНК, регулює експресію різних генів [222, 223].

З використанням методу ПЛР у реальному часі, нами було показано, що розвиток ЦД 2 типу супроводжується надзвичайно вираженим зростанням вмісту мРНК *p65*, найпоширенішої субодиниці NF-κB.

З метою подальшого з'ясування конкретних молекулярних механізмів зростання експресії NF-κB за ЦД типу 2, було доцільно дослідити можливість залучення одного із ключових модуляторів NF-κB-асоційованих сигнальних каскадів, а саме представника сімейства прозапальних цитокінів – фактору некрозу пухлин-альфа (TNF-α). Крім клітин імунної системи (головним чином моноцитів і макрофагів), адипоцити, ендотеліоцити, а також гепатоцити вважаються найважливішими джерелами синтезу TNF-α в тваринному організмі [226]. TNF-α є позаклітинним протеїном, отже його загальний пул у печінці може включати як локально синтезований в її тканині цитокін, так і той, що потрапляє до печінки із загального кровообігу. З огляду на це, ми вважали за доцільне визначення не стільки вмісту протеїну TNF-α у печінці, скільки його експресію на транскрипційному рівні (за матричною РНК), що

дало б змогу найбільш адекватно оцінити індуковані діабетом зміни функціонування даної цитокінової системи саме у тканині печінки.

Показано, що введення вітаміну D<sub>3</sub> призводило до зниження (в 5,3 рази) вмісту мРНК *Tnf-α* у тканині печінки (рис. 3.4), що узгоджується з його протизапальною дією та може бути додатковим чинником, який обумовлює інгібування посиленої експресії NF-κB за діабету.

З'являється все більше клінічних та експериментальних даних щодо гепатопротекторної дії вітаміну D<sub>3</sub> при лікуванні хронічних захворювань печінки, асоційованих з розвитком ЦД типу 2. Стан тканинної експресії цитохромів, відповідальних за утворення активних гідроксильованих похідних холекальциферолу, може відігравати істотну роль у порушенні біодоступності вітаміну D<sub>3</sub> та VDR-опосередкованого клітинного сигналювання за ЦД типу 2 та у механізмі гепатопротекторної дії холекальциферолу. Проте характер змін у експресії даних ізоензимів, а також рецептору вітаміну D<sub>3</sub>, у нормі та за патологій, розвиток яких тісно пов'язаний з недостатньою забезпеченістю організму вітаміном D<sub>3</sub>, є одним з недостатньо з'ясованих питань. З огляду на це, нашим наступним завданням було дослідження змін експресії ключових компонентів вітамін D-авто-/паракринної системи печінки, асоційованих з експериментальним ЦД типу 2 та з'ясування ефективності вітаміну D<sub>3</sub> у їх корекції.

Було показано, що ІР та гіперглікемія за експериментального ЦД типу 2 супроводжуються зниженням вмісту 25ОНD, надійного маркеру забезпеченості організму вітаміном D<sub>3</sub>, у сироватці крові у 2,4 рази.

Механізм дії 1,25(ОН)<sub>2</sub>D реалізується шляхом зв'язування зі специфічним клітинним рецептором гормону – VDR, членом надсімейства ядерних рецепторів стероїдних гормонів з класичною доменною структурою. Зв'язування ліганду індукує конформаційні зміни VDR, які сприяють гетеродимеризації з ретиноїдним X рецептором (RXR) і рекрутуванню до комплексу VDR-RXR ряду протеїнів, включаючи членів надсімейства коактиваторів стероїдних гормонів, а також мультімембранний

коактиваторний комплекс протеїнів, що взаємодіють з D-рецепторами (DRIP, vitamin D receptor (VDR)-interacting proteins). Ці коактиватори викликають ремоделювання хроматину через властиву гістонам модифікаційну активність, яка направлена на ключові компоненти ініціації транскрипції та регулювання промоторних ділянок. Таким чином, VDR функціонує як ліганд-керований транскрипційний фактор, який зв'язується з VDRE (елементами, чутливими до вітаміну D) у промоторних ділянках багатьох генів, в кінцевому рахунку, впливає на швидкість їх транскрипції РНК-полімеразою II [233, 237]. Разом з тим у реалізації ефектів 1,25-дигідроксивітаміну D<sub>3</sub>, пов'язаних з транспортуванням Ca<sup>2+</sup>, можливо, мають місце також негеномні механізми, що продемонстровано і для інших стероїдних гормонів [238]. Однак частина цих ефектів також реалізується через VDR.

Встановлено, що за ЦД типу 2 вміст мРНК *Vdr* значно (в 3 рази) знижувався в цій тканині, що може свідчити про істотне порушення VDR-опосередкованого сигналювання у чутливих до дії вітаміну D<sub>3</sub> клітинах.

В клінічній частині дисертаційної роботи встановлено, що у пацієнтів із ЦД типу 2, що дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> асоційований із більш вираженою ІР, ожирінням і неадекватним глікемічним контролем у порівнянні з оптимальним рівнем або його недостатністю. Індекс НОМА2-ІР (2,12±0,71 проти 2,25±0,95, p=0,963) та чутливість до інсуліну (S % - 57,11±32,07 проти 54,69±32,5, p=0,965) у групі оптимального рівня D<sub>3</sub> та його недостатності (група 2) були практично ідентичними. При D<sub>3</sub> дефіциті НОМА2-ІР був статистично достовірно вище на 46,2% (p=0,004), а чутливість до інсуліну нижче на 27,5% (p=0,027). Функціональна активність β-клітин статистично достовірно не змінилась між усіма групами незалежно від статусу вітаміну D<sub>3</sub>. Після корекції на ІМТ, вік і стать між концентрацією вітаміну D<sub>3</sub> і HbA1c (r = -0,264; p=0,047), НОМА2-ІР, С-пептидом (r = -0,394; p=0,003 ) та S % (r = 0,277; p=0,037) встановлено зворотній кореляційний зв'язок лише в групі пацієнтів із D<sub>3</sub> дефіцитом.

Вітамін D<sub>3</sub> проявляє свою біологічну дію головним чином через VDR, який належить до суперсімейства ядерних рецепторів і регулює експресію генів ліганд-опосередкованим чином. Недавнє дослідження продемонструвало, що β-клітини підшлункової залози мають VDR і метаболіти вітаміну D стимулюють секрецію і вивільнення інсуліну [248]. Крім того, VDR-дефіцитні (-/-) миші мають більш високу поширеність ЦД типу 2 [249], припускаючи, що сигнальний шлях вітаміну D<sub>3</sub> може мати відношення до патогенезу даного захворювання [240]. Park та ін. включили в дослідження групу з 903 практично здорових дорослих (середній вік: 74 роки) без ознак предіабету або ЦД під час відвідин клініки з 1997 по 1999 рік, а потім спостерігали за учасниками до 2009 року. Було встановлено, що в людей з сироватковим рівнем 25(OH)D менше 30 нг/мл спостерігається в 5 разів вище ризик розвитку ЦД2 в порівнянні із учасниками чий рівень був вище 50 нг/мл [240, 250].

Найбільш важливим, на нашу думку, є встановлення в регресійному аналізі, незалежного від глікемічного контролю зв'язку між дефіцитом вітаміну D<sub>3</sub> і прийомом метформіну (OR 5,191; 95% CI 0,966-27,903 ). Підсилює дане твердження, той факт, що ми не виявили статистичної достовірної різниці по процентному співвідношенню між пацієнтами різних груп, які отримують метформін (p=0,264), так само як і середньодобова доза для метформіну була співставна для всіх груп (p=0,317) [240]. Дана знахідка стає ще більш актуальною враховуючи попередньо встановлений факт, що прийом метформіну здатний індукувати дефіцит вітаміну B<sub>12</sub> у пацієнтів із ЦД типу 2 [251, 252]. На відміну від наших результатів, недавнє ретроспективне дослідження в пацієнтів з ЦД типу 2 (n=706) не виявило негативного впливу метформіну на рівень вітаміну D. Рівень 25(OH)D статистично достовірно не відрізнявся навіть після корекції, між пацієнтами на метформіні та тими хто отримував іншу антидіабетичну терапію (p=0,297; 95% ДІ для середньої різниці = -0,7;-2,2 нг/мл). Паралельно в цій когорті було відзначено статистично достовірно нижчий рівень вітаміну B<sub>12</sub> у пацієнтів на терапії

метформіном [253]. З іншої сторони Alkharfy та ін., дослідили вплив додаткового призначення вітаміну D<sub>3</sub> на дієту, інсулін та/або пероральні гіпоглікемічні засоби та порівняли зміни із когортою пацієнтів без ЦД. Вченими було встановлено, що лише в групі метформіну спостерігався достовірний приріст рівня сироваткового вітаміну D, приблизно на 50-60% в порівнянні із вихідним рівнем ( $p < 0,001$ ) [254].

Відзначаються різні можливі пояснення цих суперечливих результатів, включаючи методи, які використовують для визначення активної форми вітаміну D<sub>3</sub>, а також фактори які впливають на забезпеченість вітаміном D<sub>3</sub>, а саме, вік, раса, харчова поведінка та рівень фізичної активності, які, як відомо, також асоційовані з ризиком розвитку ЦД типу 2.

У пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП спостерігається тенденція до підвищення активності трансаміназ паралельно із зниженням рівня вітаміну D. В останні десятиліття все більшої поширеності для діагностики та оцінки ефективності лікування пацієнтів з НАЖХП на стадії стеатогепатозу набувають малоінвазивні методи верифікації засновані на біохімічному дослідженні венозної крові. Дані методи умовно можна розділити на рутинні – показники ліпидограми, та розрахункові коефіцієнти: стеатотест (SteatoTest®), індекси жирового гепатозу (HSI та FLI), шкала вмісту жиру при НАЖХП (NAFLD liver fat score) результати яких розраховуються на підставі спеціальних алгоритмів з декількох біохімічних показників [202]. Зовнішня валідність даних тестів підтверджена в загальній популяції і у осіб з морбідним ожирінням, вони дозволяють з різним ступенем точності прогнозувати результати і смертність, пов'язані з метаболічними, печінковими і серцево-судинними проявами [243].

Нещодавно TuG індекс був запропонований в якості нового простого маркеру ІР. В подальших дослідженнях було продемонстровано, що TuG індекс незалежно асоційований із стеатозом печінки [244], а порогове значення  $TuG \geq 8,5$  є достатньо ефективним діагностичним маркером НАЖХП

з AUC 0,782 та володіє вищою діагностичною цінністю в порівнянні із АЛТ [245].

В нашому дослідженні вперше проаналізовано зміни індексів стеатозу печінки (HSI та FLI) та TuG з вивченням асоціативних взаємозв'язків з іншими метаболічними параметрами в контексті забезпеченості організму вітаміном D. Встановлено, що максимальне значення індексів жирового гепатозу діагностовано у пацієнтів із дефіцитом D, що статистично достовірно відрізнялось від пацієнтів із групи оптимального забезпечення (HSI –  $43,34 \pm 6,59$  проти  $39,67 \pm 4,37$ ;  $p=0,032$  та відповідно для FLI –  $79,21 \pm 19,61$  проти  $64,96 \pm 17,72$ ;  $p=0,007$ ). Для TuG індексу продемонстрована тенденція до його зростання одночасно із погіршенням D статусу ( $p=0,175$ ). В кореляційно-регресійному аналізі індекси стеатозу, незалежно від активності трансаміназ, ІМТ та тривалість ЦД типу 2, були предикторами асоційованими із дефіцитом D<sub>3</sub> в пацієнтів із НАЖХП.

Останнім часом все більшої актуальності набуває проблема вираженого дефіциту вітаміну D, який діагностується при його концентрації менше 10нг/мл. Ми провели субаналіз в групі D дефіциту з метою оцінки основних метаболічних параметрів. Встановлено, що для пацієнтів із рівнем D менше 10нг/мл характерні статистично значущо вищі показники ІМТ ( $p=0,037$ ) та ОТ ( $p=0,004$ ) в порівнянні із результатами суб'єктів з діапазоном вітаміну від 10-20нг/мл [242]. Отримані результати узгоджуються з дослідженням в яке було включено 82 пацієнта із вперше встановленою НАЖХП з підвищеним рівнем амінотрансфераз. Середня концентрація вітаміну D<sub>3</sub> в сироватці крові пацієнтів становила 13,0 нг/мл, а у 35,4% пацієнтів діагностовано виражений дефіцит D, який характеризується підвищеним ризиком абдомінального ожиріння (72,4% проти 47,2%,  $p=0,023$ ) і більш високою поширеністю метаболічного синдрому (69% проти 42,2%,  $p=0,015$ ) в порівнянні з пацієнтами з D<sub>3</sub>>10 нг/мл [242, 255]. Також вченими встановлено статистично достовірно вищий рівень ТГ та глюкози натще в хворих із D<10нг/мл. В нашому дослідженні серед усіх показників ліпідограми лише рівень ЗХС та

ТГ, статистично достовірно відрізнявся в залежності від рівня вітаміну D. Середнє значення для ЗХС та ТГ в пацієнтів із вираженим дефіцитом D<sub>3</sub> склало 6,22±0,88 і 3,17±1,76 ммоль/л, що було статистично значуще вище в порівнянні із пацієнтами із D<sub>3</sub>>10 нг/мл, де дані показники становили – 5,47±1,36 (p=0,011) і 2,32±1,71 ммоль/л (p=0,011) відповідно [242].

Індекси стеатозу печінки (HSI та FLI), а також TuG індекс були статистично достовірними вищими в пацієнтів із вираженим дефіцитом D<sub>3</sub> в порівнянні із підгрупою D<sub>3</sub>>10 нг/мл [242]. З іншої сторони, в когорті пацієнтів (n=789) з встановленим, на основі УЗ критеріїв Хамагучі, стеатозом печінки (28,0%), не виявлено статистично достовірної різниці по рівню вітаміну D в порівнянні із хворими контрольної групи: 25,2±8,7 проти 26,4±10,3 нг/мл відповідно (p=0,071) [242, 256]. Розходження результатів даного дослідження з нашими даними, можна пояснити включенням в когорту Leitão та ін. в основному пацієнтів із недостатністю (20-30 нг/мл) вітаміну D, зміни метаболічних параметрів в яких носять менш виражений характер. Також дослідження Leitão було проведено в Португалії, тому не можна виключити впливу підвищеної гіперінсоляції, сезонності та етнічної приналежності [242].

В ретроспективному дослідженні в педіатричній когорті (n=234) із підтвердженою з допомогою біопсії НАЖХП частка пацієнтів із значним фіброзом (стадія ≥2) була статистично достовірно вищою у пацієнтів з недостатністю D (29%) у порівнянні з дефіцитом D (15%, p=0,040). Інші патогістологічні параметри, а саме важкість стеатозу, балонування, лобулярне/портальне запалення і загальний гістологічний бал за NAS шкалою статистично достовірно між групами не відрізнялись [242, 257]. З іншої сторони, Targher та ін. у пацієнтів з підтвердженою з допомогою біопсії НАЖХП, продемонстрував що дефіцит 25(OH)D<sub>3</sub> статистично значуще асоційований з такими гістологічними ознаками як стеатоз печінки, запально-некротичними змінами паренхіми та фіброзом (P<0,001 для всіх) незалежно від віку, статі, ІМТ, креатиніну, кальцію, ІР та інших кластерів метаболічного синдрому [29, 242]. В іншому дослідженні, рівень вітаміну D у пацієнтів з

НАСГ був достовірно нижчим в порівнянні із групою стеатозу печінки ( $18,1 \pm 8,4$  проти  $25,0 \pm 11,3$  нг/мл). На думку авторів, низька концентрація в плазмі вітаміну D<sub>3</sub> є незалежним предиктором тяжкості НАЖХП [242, 258].

Для вивчення ефективності застосування препаратів вітаміну D<sub>3</sub> нами загалом проліковано 72 пацієнти з НАЖХП та ЦД типу 2 на фоні встановленого D дефіциту, які рівномірно були розподілені на 2 групи. Хворі групи порівняння (n=36) отримували виключно традиційну антидіабетичну терапію, а основної групи (n=36) додатково отримували препарати вітаміну D<sub>3</sub> («Д-кап»), який призначали у дозі 4000 МО/добу терміном на 6 місяців. Антропометричні параметри статистично значущо в динаміці лікування не змінилися у пацієнтів обох обстежуваних груп.

Використання вітаміну D<sub>3</sub> було асоційоване з статистично значущим зниженням глікемії натще через 6 місяців лікування від  $11,75 \pm 3,60$  до  $10,26 \pm 3,31$  (p=0,041). Рівень HbA<sub>1c</sub>, у основній групі пацієнтів в середньому знизився на 0,43 % (p=0,109) через 3 місяці, та залишився практично на такому ж рівні і через 6 місяців – 0,50 (-0,08; 1,07; p=0,092). В обох часових інтервалах зміни були статистично не значущими в порівнянні із вихідним рівнем. В дослідженні DDM2 пацієнти як і в нашому дослідженні отримували 4000 МО вітаміну D<sub>3</sub> (холекальциферол) щодня або плацебо протягом 48 тижнів. Проте на відміну від нашого дослідження пацієнтів не стратифікували по D<sub>3</sub> дефіциту, і в групі лікування вихідна його концентрація в плазмі становила 26,6 нг/мл, середній рівень HbA<sub>1c</sub> – 6,6%, а 78% пацієнтів отримували метформін. На 24 тижні лікування концентрація 25 (ОН) D в активній групі зросла на 20,5 нг/мл, що асоціювалось із статистично значущим зниженням рівня HbA<sub>1c</sub> в порівнянні із плацебо (-0,1% проти 0,3%, відповідно; p=0,034). В інші часові проміжки HbA<sub>1c</sub> та чутливість до інсуліну під впливом лікування не змінилися [259].

Паралельно із покращенням параметрів глікемічного контролю у пацієнтів основної групи, спостерігалась тенденція до зниження індексу НОМА-2IR на 0,31 (-0,13; 0,76; p=0,191) та покращення чутливості до інсуліну



(S %) на 1,65 (-9,88; 6,47;  $p=0,697$ ) в порівнянні із показниками вихідного рівня. В даному пілотному РКД у мультинаціональній когорти пацієнтів з високим ризиком розвитку ЦД типу 2 та дефіцитом  $D_3$  вивчалась ефективність холекальциферолу (2000–6000 МО до цільових 25 (ОН)  $D$ , 75 нмоль/л) та карбонату кальцію (1200 мг) щоденно проти плацебо протягом 6 місяців. В групі активного лікування середня концентрація 25(ОН) $D$  у сироватці крові зросла з 48 до 95 нмоль/л, а цільового значення досягнуто у 91%. Проте в динаміці лікування чутливість до інсуліну, прозапальні маркери та функціональна активність  $\beta$ -клітин як у внутрішньо- так і міжгруповому аналізі статистично значущо не змінилась, навіть після корекції на потенційні фактори ризику, включаючи ОТ та сезонність набору. З іншої сторони в суб-аналізі, у пацієнтів із преддіабетом констатовано позитивний ефект від призначення добавки з вітаміном  $D$  та кальцієм на чутливість до інсуліну (НОМА% S та Matsuda) [260].

Аналіз змін ліпідних параметрів продемонстрував, що статистично значущо під впливом лікування препаратом вітаміну  $D_3$  змінився лише рівень ТГ ( $1,97 \pm 1,03$  проти  $1,60 \pm 0,88$  ммоль/л,  $p=0,013$ ).

Активність трансаміназ як один із основних лабораторних параметрів, що характеризує функціональну активність та запально-некротичні зміни в тканині печінки статистично значущо не змінились. В даному подвійному сліпому, плацебо-контрольованому РКД призначення 50 000 МО вітаміну  $D_3$  (холекальциферол) на тиждень разом із 0,25 мг кальцитріолу (1,25 дигідроксихолекальциферолу) вдень на курс 3 місяців пацієнтам із НАЖХП було асоційоване із статистично значущим зниженням лужної фосфатази та ГГТ в порівнянні із плацебо. Активність АЛТ та АСТ під впливом лікування не змінилась в обох обстежуваних групах [261]. Отримані результати знаходять підтвердження і в даному мета-аналізі із включенням 9 РКД (467 учасників). Встановлено, що споживання вітаміну  $D_3$  в когорти пацієнтів із НАЖХП статистично значущо не впливає на активність АЛТ (-2,88 Од/л; 95% ДІ, від -6,03 до 0,27;  $I^2 = 85\%$ ), АСТ (-0,10 Од/л; 95% ДІ від -1,18 до 0,97;  $I^2 =$

26%) та ГГТ (0,12 ОД/л; 95% ДІ, від -5,94 до 6,18;  $I^2 = 38\%$ ). Проте у пацієнтів, які приймали вітамін D<sub>3</sub> в дозі 3 000 МО на добу спостерігалось достовірне зниження лужної фосфатази (-19,74 ОД/л; 95% ДІ, від -25,36 до -14,12;  $I^2 = 0,0\%$ ) [262].

У внутрішньогруповому аналізі, встановлено, що використання вітаміну D<sub>3</sub> асоційоване із зниженням індексів стеатозу: FLI та TyG індексу. Базове значення для FLI склало 73,21±20,82 та для TyG - 5,13±0,32, а після 6-ти місячного курсу лікування вітаміном D<sub>3</sub> знизилось відповідно до 69,91±21,27 (p=0,023) та 5,00±0,28 (p=0,024). З іншої сторони, в плацебо контрольованому РКД, у пацієнтів з ЦД типу 2 та НАЖХП (n=55) діагностованою з допомогою УЗД, вивчалась клінічна ефективність перорального вітаміну D<sub>3</sub> в дозі 2000 МО на добу протягом 24 тижнів. В кінці періоду лікування в активній групі встановлено 2-х кратне підвищення 25 (ОН) вітаміну D в сироватці крові (48,15±23,7 до 89,80±23,6 нмоль/л, p<0,001), що не супроводжувалось статистично значущим зниженням активності трансаміназ, FLI, та специфічних маркерів фіброгенезу таких як цитокератин 18-M30 (СК18-M30) та N-кінцевий пропептид проколаген III (P3NP) [31].

Підсумовуючи результати отримані в ході дослідження, встановлено тенденційне покращення основних метаболічних параметрів в групі порівняння через 3 місяці з наступним вираженим погіршенням через 6 місяців. Встановлену закономірність частково можна пояснити сезонністю включення пацієнтів в дослідження. Основний етап набору в дослідження тривав в пізній весняний та початок літнього періоду, з максимальною інсоляцією характерною для даних широт, а більшість пацієнтів завершили участь в дослідженні в зимовий період. Оскільки вони не отримували замісної терапії препаратами вітаміну D<sub>3</sub> та на фоні сезонного браку сонячного випромінювання, в них відмічалось прогресування D<sub>3</sub>-дефіциту.

В пацієнтів основної групи на фоні замісної терапії спостерігалось прогредієнтне статистично значуще зростання концентрації вітаміну D<sub>3</sub> в сироватці крові, з досягненням оптимального забезпечення організму

вітаміном у понад 60 % пацієнтів. Все вище зазначене, обумовлює доцільність використання препаратів вітаміну D<sub>3</sub> у пацієнтів із його дефіцитом в дозі 4000 МО/доба на курс не менше 6 місяців з метою покращення параметрів глікемічного контролю та метаболічного профілю у хворих на ЦД типу 2 з НАЖХП.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі експериментально доведено та на підставі комплексного дослідження клінічних і біохімічних показників вирішено актуальне науково-практичне завдання сучасної ендокринології – підвищення ефективності лікування пацієнтів із поєднанням ЦД типу 2 та НАЖХП шляхом включення до комплексної терапії препаратів вітаміну D<sub>3</sub>:

1. Дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> за умов експериментального ЦД типу 2 супроводжується істотною АФК-залежною індукцією експресії гену найбільш поширеної субодиниці NF-κB *p65* з одночасним зниженням рівня експресії інгібітору ядерного фактору NF-κB – *IκB-α* у тканині печінки, що може вказувати на активування NF-κB-опосередкованої транскрипції генів, продукти яких залучені в ключових подіях запальної відповіді та оксидативного ушкодження. Також продемонстровано підвищення у тканині печінки експресії гену прозапального цитокіну *Tnf-α*, асоційованого з транскрипційною системою NF-κB, що може бути свідченням розвитку оксидативного стресу, запальних реакцій та негативно позначатись на толерантності тканин організму до інсуліну.

2. Введення вітаміну D<sub>3</sub> тваринам із експериментальним ЦД типу 2, компенсуючи D-дефіцитний стан щурів, сприяло оптимізації метаболічних процесів, зниженню рівня глікемії, гальмуванню розвитку оксидативного стресу та ІР. Встановлено коригувальну дію вітаміну D<sub>3</sub> на стан вітамін D-авто-/паракринної системи та сигнальний шлях TNF-α/NF-κB тканини печінки. Блокування шляхів активування NF-κB та пригнічення запальних реакцій у печінці підкреслює залежність розвитку оксидативного стресу та запалення від рівня забезпеченості організму вітаміном D та важливість антиоксидантного та протизапального компоненту в механізмі протидіабетичної та гепатопротекторної дії холекальциферолу.

3. Дефіцит вітаміну D у пацієнтів з ЦД типу 2 пов'язаний з більш вираженою ІР, ожирінням і неадекватним глікемічним контролем у порівнянні

з оптимальним рівнем або його недостатністю. Регресійний аналіз продемонстрував, що прийом метформіну (OR 5,91; 95% ДІ 0,966-27,903) асоційований з дефіцитом вітаміну D в пацієнтів із ЦД типу 2 незалежно від рівня HbA1c. Не виявлено значущих зв'язків між D статусом і функціональною активністю  $\beta$ -клітин.

4. У пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП на фоні дефіциту D<sub>3</sub> спостерігається тенденція до підвищення активності трансаміназ та максимальне значення індексів жирового гепатозу в порівнянні із групи оптимального забезпечення чи його недостатності. В субаналізі встановлено, що виражений D дефіцит (<10нг/мл) характеризується статистично достовірно вищими показниками індексів жирового гепатозу, антропометричними параметрами (ІМТ, ОТ) та активністю трансаміназ в порівнянні із показниками пацієнтів із рівнем D<sub>3</sub> в діапазоні від 10-20нг/мл. Між концентрацією вітаміну D і трансаміназами (АСТ, ГГТ), об'ємом талії, індексами стеатозу та рівнем загального холестерину встановлено зворотній кореляційний зв'язок. В регресійному аналізі індекси стеатозу, активність трансаміназ, ІМТ та тривалість ЦД типу 2, незалежно асоційовані із D дефіцитом.

5. Встановлено, що використання препаратів вітаміну D<sub>3</sub> у пацієнтів із його дефіцитом в дозі 4000 МО/доба на курс не менше 6 місяців у хворих на ЦД типу 2 з НАЖХП призводить до 2-х кратного підвищення його рівня в крові та досягненням у понад 60 % пацієнтів оптимального забезпечення вітаміном організму. Зазначені зміни D<sub>3</sub> статусу асоційовані із статистично значущим зниженням рівня глікемії натще, тригліцеридів, TuG індексу та індексу жирового гепатозу (FLI) у внутрішньогруповому аналізі. У міжгруповому аналізі статистично значущі зміни залишились лише для індексу жирового гепатозу.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. З метою підвищення ефективності лікування пацієнтів з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП необхідне проведення скринінгу з метою визначення ступеня забезпеченості організму вітаміном D.

2. На додаток до стандартної гіпоглікемічної терапії, вітамін D3 слід призначати у середній дозі 4000 МО / день протягом курсу щонайменше 6 місяців (контрольований 25 (ОН) D) з метою покращення метаболічних показників, показників функції печінки та індексів стеатозу у хворих з ЦД типу 2 та супутньою НАЖХП.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2017;18;153–165.
2. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermato-endocrinology*. 2013;5;51–108.
3. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermato-Endocrinology*. 2013;5;51–108.
4. Yagüe M de la P, Yurrita LC, Cabañas MJC, Cenzual MAC. Role of vitamin d in athletes and their performance: current concepts and new trends. *Nutrients*. 2020; 12(2); 579. <https://doi.org/10.3390/nu12020579>.
5. Ilie PC, Stefanescu S, Smith L. The role of Vitamin D in the prevention of Coronavirus Disease 2019 infection and mortality. 2020; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-21211/v1>.
6. Nelson JE, Roth CL, Wilson LA, et al. Vitamin D deficiency is associated with increased risk of non-alcoholic steatohepatitis in adults with non-alcoholic fatty liver disease: Possible role for MAPK and NF- $\kappa$ B? *American Journal of Gastroenterology*. 2016;111;852–863.
7. Al-Shoumer KA. Is there a relationship between vitamin D with insulin resistance and diabetes mellitus? *World Journal of Diabetes*. 2015;6;1057.
8. Komisarenko YI, Bobryk MI. Vitamin D deficiency and immune disorders in combined endocrine pathology. *Frontiers in Endocrinology*. 2018; <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00600>.
9. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry and Biology*. 2014;21;319–329.
10. Pozzilli P, Manfrini S, Crinò A, et al. Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1

- diabetes. *Hormone and Metabolic Research*. 2006;37;680–683.
11. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes S V., Chan SLF, Squires PE, Hewison M. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ -hydroxylase in pancreatic islets. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, pp. 2004;121–125.
  12. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, pp. 2003;223–230.
  13. Simpson RU, Thomas GA, Arnold AJ. Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors and activities in muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260;8882–8891.
  14. Kumar S, Davies M, Zakaria Y, Mawer EB, Gordon C, Olukoga AO, Boulton AJM. Improvement in glucose tolerance and beta-cell function in a patient with vitamin D deficiency during treatment with vitamin D. *Postgraduate Medical Journal*. 1994;70;440–443.
  15. Mak RHK. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 corrects insulin and lipid abnormalities in uremia. *Kidney International*. 1998;53;1353–1357.
  16. Nagpal J, Pande JN, Bhartia A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the short-term effect of vitamin D3 supplementation on insulin sensitivity in apparently healthy, middle-aged, centrally obese men. *Diabetic Medicine*. 2009;26;19–27.
  17. Hariri M, Zohdi S. Effect of Vitamin D on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. *International Journal of Preventive Medicine*. 2019;10;14.
  18. Зак К.П., Тронько Н.Д., Попова В.В. БАК. Гормоны жировой ткани (адипоцитокينات) и сахарный диабет: современные представления о роли цитокинов в патогенезе сахарного диабета 2-го типа. *Сахарный диабет Иммунология Цитокины*. 2015;402–406.
  19. Hu Z, Chen J, Sun X, Wang L, Wang A. Efficacy of vitamin D



- supplementation on glycemic control in type 2 diabetes patients. *Medicine*. 2019;98:e14970.
20. Комісаренко ЮІ. Корекція вітаміном D 3 порушень метаболічних процесів у пацієнтів із цукровим діабетом 1-го та 2-го типів. *Biochem J*. 2014;86:111–116.
  21. Eliades M, Spyrou E, Agrawal N, Lazo M, Brancati FL, Potter JJ, Koteish AA, Clark JM, Guallar E, Hernaez R. Meta-analysis: Vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2013;38:246–254.
  22. Lorvand Amiri H, Agah S, Tolouei Azar J, Hosseini S, Shidfar F, Mousavi SN. Effect of daily calcitriol supplementation with and without calcium on disease regression in non-alcoholic fatty liver patients following an energy-restricted diet: Randomized, controlled, double-blind trial. *Clinical Nutrition*. 2017;36:1490–1497.
  23. Barchetta I, Angelico F, Ben MD, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Medicine*. 2011; <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-85>.
  24. Mazanova A, Shymanskyi I, Lisakovska O, Hajiyeva L, Komisarenko Y, Veliky M. Effects of Cholecalciferol on Key Components of Vitamin D-Endo/Para/Autocrine System in Experimental Type 1 Diabetes. *International journal of endocrinology* 2018;2494016.
  25. Боднар П.М., Михальчишин Г.П. КНМ. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет типу 2: патогенез, діагностика та лікування (лекція). *Ендокринологія*. 2012;17:94–101.
  26. Ю.І. К. Вітамін D та його роль у регуляції метаболічних розладів при цукровому діабеті. *Ліки України*. 2013;170:51–54.
  27. Rafiq S, Jeppesen P. Is Hypovitaminosis D Related to Incidence of Type 2 Diabetes and High Fasting Glucose Level in Healthy Subjects: A Systematic

- Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2017;10;59.
28. Cimini FA, Barchetta I, Carotti S, Bertoccini L, Baroni MG, Vespasiani-Gentilucci U, Cavallo MG, Morini S. Relationship between adipose tissue dysfunction, Vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2017;23;3407–3417.
  29. Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2007;17;517–524.
  30. Wang S, Cai B, Han X, Gao Y, Zhang X, Wang R, Zhang Y, Chen Q. Vitamin D supplementation for nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus: A protocol for a systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2020;99;e20148.
  31. Barchetta I, Del Ben M, Angelico F, et al. No effects of oral vitamin D supplementation on non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Medicine*. 2016; <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0638-y>.
  32. Seida JC, Mitri J, Colmers IN, Majumdar SR, Davidson MB, Edwards AL, Hanley DA, Pittas AG, Tjosvold L, Johnson JA. Effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99;3551–3560.
  33. Sharifi N, Amani R, Hajiani E, Cheraghian B. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine*. 2014; 47;70–80.
  34. Galior K, Grebe S, Singh R. Development of vitamin d toxicity from overcorrection of vitamin D deficiency: A review of case reports. *Nutrients*. 2018;<https://doi.org/10.3390/nu10080953>.
  35. Waterbury S. Implications of Vitamin D toxicity & deficiency. *Nurse*

- Practitioner. 2018;43;22–30.
36. Alshahrani F, Aljohani N. Vitamin D: Deficiency, sufficiency and toxicity. *Nutrients*. 2013;5;3605–3616.
  37. Taylor PN, Davies JS. A review of the growing risk of vitamin D toxicity from inappropriate practice. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2018; 84;1121–1127.
  38. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.582s>.
  39. Вміст вітаміну D – важливий показник стану здоров'я жінок у період менопаузи. *РАЦІОНАЛЬНА ФАРМАКОТЕРАПІЯ* 2018 46;35–38.
  40. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*. 2018;96;365–408.
  41. Ferri E, Casati M, Cesari M, Vitale G, Arosio B. Vitamin D in physiological and pathological aging: Lesson from centenarians. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2019;20;273–282.
  42. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80;1689S–96S.
  43. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116;2062–2072.
  44. Bikle D. Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanisms of Action. 2000.
  45. Pilz S, März W, Cashman KD, et al. Rationale and plan for vitamin D food fortification: A review and guidance paper. *Frontiers in Endocrinology*. 2018; <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00373>.
  46. Bouillon R, Norman AW, Lips P. Vitamin D deficiency [8]. *New England Journal of Medicine*. 2007;357;1980–1982.
  47. Holick MF. Medical progress: Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2007;357;266–281.
  48. Lips P, Cashman KD, Lamberg-Allardt C, Bischoff-Ferrari HA, Obermayer-

- Pietsch B, Bianchi ML, Stepan J, El-Hajj Fuleihan G, Bouillon R. Current vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent vitamin D deficiency: a position statement of the European Calcified Tissue Society. *European journal of endocrinology*. 2019;180;P23–P54.
49. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523;123–133.
  50. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2010;39;381–400.
  51. Morris HA, Anderson PH. Autocrine and paracrine actions of vitamin d. *The Clinical biochemist Reviews*. 2010;31;129–38.
  52. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88;491S-499S.
  53. Forrest KYZ, Stuhldreher WL. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutrition Research*. 2011;31;48–54.
  54. Christakos S, Ajibade D V., Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: Metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2010;39;243–253.
  55. Fiscaletti M, Stewart P, Munns CF. The importance of vitamin D in maternal and child health: A global perspective. *Public Health Reviews*. 2017;<https://doi.org/10.1186/s40985-017-0066-3>.
  56. Koch CA. New light on an old vitamin: The role of the sunshine vitamin D in chronic disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2017;18;149–151.
  57. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients*. 2013;5;2502–2521.
  58. Hossein-Nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: A global perspective. In: *Mayo Clinic Proceedings*. *Mayo Clin Proc*. 2013;720–755.
  59. González-Gross M, Valtueña J, Breidenassel C, et al. Vitamin D status among adolescents in Europe: The Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition

- in Adolescence study. *British Journal of Nutrition*. 2012;107;755–764.
60. 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 Medicine*. 2015;45;365–378.
  61. Angeline ME, Gee AO, Shindle M, Warren RF, Rodeo SA. The effects of vitamin d deficiency in athletes. *American Journal of Sports Medicine*. 2013; 41;461–464.
  62. 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. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 2012; 37;798–802.
  63. Close GL, Russell J, Copley JN, Owens DJ, Wilson G, Gregson W, Fraser WD, Morton JP. Assessment of vitamin D concentration in non-supplemented professional athletes and healthy adults during the winter months in the UK: Implications for skeletal muscle function. *Journal of Sports Sciences*. 2013;31;344–353.
  64. Farrokhyar F, Sivakumar G, Savage K, Koziarz A, Jamshidi S, Ayeni OR, Peterson D, Bhandari M. Effects of Vitamin D Supplementation on Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations and Physical Performance in Athletes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Sports Medicine*. 2017;47;2323–2339.
  65. Mehran N, Schulz BM, Neri BR, Robertson WJ, Limpisvasti O. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Professional Hockey Players. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2016;<https://doi.org/10.1177/2325967116677512>.
  66. Dubnov-Raz G, Livne N, Raz R, Rogel D, Cohen AH, Constantini NW. Vitamin D concentrations and physical performance in competitive adolescent swimmers. *Pediatric Exercise Science*. 2014;26;64–70.
  67. Maroon JC, Mathyssek CM, Bost JW, Amos A, Winkelman R, Yates AP, Duca MA, Norwig JA. Vitamin D profile in national football league players.

- American Journal of Sports Medicine. 2015;43;1241–1245.
68. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet*. 1998;351;805–806.
  69. AC R, CL T, AL Y, HB DV. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. 2-11; <https://doi.org/10.17226/13050>.
  70. 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96;1911–1930.
  71. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC, Allen C, Dougherty C, Gunter EW, Bowman BA. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76;187–192.
  72. Kumar J, Muntner P, Kaskel FJ, Hailpern SM, Melamed ML. Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001-2004. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0051>
  73. Fischer PR, Thacher TD, Pettifor JM. Pediatric vitamin D and calcium nutrition in developing countries. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2008;9;181–192.
  74. Zhu Z, Zhan J, Shao J, Chen W, Chen L, Li W, Ji C, Zhao Z. High prevalence of vitamin D deficiency among children aged 1 month to 16 years in Hangzhou, China. *BMC Public Health*. 2012; <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-126>.
  75. Daly RM, Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, Dunstan DW, Sikaris KA, Zimmet PZ, Ebeling PR, Shaw JE. Prevalence of vitamin D deficiency and its determinants in Australian adults aged 25 years and older: A national, population-based study. *Clinical Endocrinology*. 2012;77;26–35.
  76. Looker AC, Johnson CL, Lacher DA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, Sempos

- CT. Vitamin D status: United States, 2001-2006. NCHS data brief 1–8
77. Holick MF. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and Vitamin D for health. In: Anticancer Research. International Institute of Anticancer Research. 2016;1345–1356.
  78. Heaney RP, Armas LAG, French C. All-source basal vitamin D inputs are greater than previously thought and cutaneous inputs are smaller. *Journal of Nutrition*. 2013;143;571–575.
  79. Crowe FL, Steur M, Allen NE, Appleby PN, Travis RC, Key TJ. Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans: Results from the EPIC-Oxford study. *Public Health Nutrition*. 2011;14;340–346.
  80. 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. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2011;43;335–343.
  81. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-A review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews*. 2013;12;976–989.
  82. Vitale G, Cesari M, Mari D. Aging of the endocrine system and its potential impact on sarcopenia. *European Journal of Internal Medicine*. 2016;35;10–15.
  83. Sohl E, De Jongh RT, Heijboer AC, et al. Vitamin D status is associated with physical performance: The results of three independent cohorts. *Osteoporosis International*. 2013;24;187–196.
  84. Visser M, Deeg DJH, Lips P. Low Vitamin D and High Parathyroid Hormone Levels as Determinants of Loss of Muscle Strength and Muscle Mass (Sarcopenia): The Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003;88;5766–5772.
  85. Bhat M, Kalam R, Syh Qadri S, Madabushi S, Ismail A. Vitamin D

- deficiency-induced muscle wasting occurs through the ubiquitin proteasome pathway and is partially corrected by calcium in male rats. *Endocrinology*. 2013;154;4018–4029.
86. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2013;6;25–39.
  87. Pusceddu I, Farrell CJL, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and Vitamin D in cellular aging and age-related diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2015; 53;1661–1678.
  88. Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, Martikainen P, Miettinen S, Pennanen P, Purmonen S, Syväälä H, Vienonen A, Tuohimaa P. Antiproliferative Action of Vitamin D. *Vitamins and Hormones*. 2002; 64;357–406.
  89. Lips P, Cashman KD, Lamberg-Allardt C, Bischoff-Ferrari HA, Obermayer-Pietsch B, Bianchi ML, Stepan J, Fuleihan GEH, Bouillon R. Current Vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent Vitamin D deficiency: A position statement of the European Calcified Tissue Society. *European Journal of Endocrinology*. 2019; 180;23–54.
  90. Koundourakis NE, Androulakis NE, Malliaraki N, Tsatsanis C, Venihaki M, Margioris AN. Discrepancy between exercise performance, body composition, and sex steroid response after a six-week detraining period in professional soccer players. *PLoS ONE*. 2014; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087803>.
  91. Koundourakis NE, Avgoustinaki PD, Malliaraki N, Margioris AN. Muscular effects of vitamin D in young athletes and non-athletes and in the elderly. *HORMONES*. 2017;15;471–488.
  92. Todd JJ, Pourshahidi LK, McSorley EM, Madigan SM, Magee PJ. Vitamin D: Recent Advances and Implications for Athletes. *Sports Medicine*. 2015;45;213–229.
  93. Koundourakis NE, Avgoustinaki PD, Malliaraki N, Margioris AN. Muscular effects of Vitamin D in young athletes and non-athletes and in the elderly.



- Hormones. 2016;15;471–488.
94. Топ-20 причин смерті у світі 2020 живуть - смертники.
  95. Chawla R, Madhu S, Makkar B, Ghosh S, Saboo B, Kalra S. RSSDI-ESI clinical practice recommendations for the management of type 2 diabetes mellitus . *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2020;24;1.
  96. Tun NN, Arunagirinathan G, Munshi SK, Pappachan JM. Diabetes mellitus and stroke: A clinical update. *World Journal of Diabetes*. 2017;8;235.
  97. Legarth C, Grimm D, Krüger M, Wehland M, Infanger M. Potential beneficial effects of vitamin d in coronary artery disease. *Nutrients*. 2020; <https://doi.org/10.3390/nu12010099>.
  98. Norman PE, Powell JT. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2014;114;379–393.
  99. Le TYL, Ogawa M, Kizana E, Gunton JE, Chong JJH. Vitamin D Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction Through Modulation of Resident Cardiac Progenitor Cells. *Heart Lung and Circulation*. 2018; 27;967–975.
  100. Owen MK, Noblet JN, Sassoon DJ, Conteh AM, Goodwill AG, Tune JD. Perivascular adipose tissue and coronary vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014; 34;1643–1649.
  101. Verdoia M, Schaffer A, Sartori C, Barbieri L, Casetti E, Marino P, Galasso G, De Luca G. Vitamin D deficiency is independently associated with the extent of coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 2014;44;634–642.
  102. Abboud M. Vitamin d supplementation and blood pressure in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2020; <https://doi.org/10.3390/nu12041163>.
  103. Forman JP, Williams JS, Fisher NDL. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension*. 2010;55;1283–1288.
  104. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D

- improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabetic Medicine*. 2008;25;320–325.
105. Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009;94;4023–4030.
  106. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83;754–759.
  107. Barchetta I, De Bernardinis M, Capoccia D, Baroni MG, Fontana M, Fraioli A, Morini S, Leonetti F, Cavallo MG. Hypovitaminosis D is Independently Associated with Metabolic Syndrome in Obese Patients. *PLoS ONE*. 2007;<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068689>.
  108. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJH, Dekker JM, Bouter LM, Seidell JC, Lips P. Adiposity in Relation to Vitamin D Status and Parathyroid Hormone Levels: A Population-Based Study in Older Men and Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90;4119–4123.
  109. Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clinical science*. 1972;43;413–431.
  110. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72;690–693.
  111. Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14.
  112. Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K, Hinders S. Calcium Intake and Body Weight 1 . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85;4635–4638.
  113. Grey AB, Evans MC, Stapleton JP, Reid IR. Body weight and bone mineral

- density in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *Annals of Internal Medicine*. 1994;121;745–749.
114. Bolland MJ, Grey AB, Gamble GD, Reid IR. Association between primary hyperparathyroidism and increased body weight: A meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90;1525–1530.
  115. Hurt RT, Kulisek C, Buchanan LA, McClave SA. The obesity epidemic: Challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterology and Hepatology*. 2010;6;780–792.
  116. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33;673–689.
  117. Blüher M. Metabolically Healthy Obesity. *Endocrine reviews*. 2020;<https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa004>.
  118. Obesity and overweight. 3 Jul 2020; <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
  119. Основні причини ожиріння | Myhelix.
  120. Meier T, Gräfe K, Senn F, Sur P, Stangl GI, Dawczynski C, März W, Kleber ME, Lorkowski S. Cardiovascular mortality attributable to dietary risk factors in 51 countries in the WHO European Region from 1990 to 2016: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. *European Journal of Epidemiology*. 2019;34;37–55.
  121. Kharroubi AT. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*. 2015;6;850.
  122. Pasyechko NV, Naumova LV, Kulchinska VM, Gulko NY, Dzhula MA, Krytskyu TI. Influence of Vitamin D on the Indexes of Type 2 Diabetes Mellitus Compensation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOG*. 2020;0;20–23.
  123. Цукровий діабет і серцево-судинне захворювання | PfizerPro Ukraine.
  124. Gupta AK, Brashear MM, Johnson WD. Prediabetes and prehypertension in healthy adults are associated with low vitamin D levels. *Diabetes Care*. 2011; 34;658–660.

125. Shankar A, Sabanayagam C, Kalidindi S. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34;1114–1119.
126. Forouhi NG, Menon RK, Sharp SJ, et al. Effects of vitamin D2 or D3 supplementation on glycaemic control and cardiometabolic risk among people at risk of type 2 diabetes: Results of a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016;18;392–400.
127. Deleskog A, Hilding A, Brismar K, Hamsten A, Efendic S, Östenson CG. Low serum 25-hydroxyvitamin D level predicts progression to type 2 diabetes in individuals with prediabetes but not with normal glucose tolerance. *Diabetologia*. 2012;55;1668–1678.
128. Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S, Targher G. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2006;29;722–724.
129. Mears D. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Membrane Biology*. 2004;200;57–66.
130. Jorde R, Sneve M, Emaus N, Figenschau Y, Grimnes G. Cross-sectional and longitudinal relation between serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index: The Tromsø study. *European Journal of Nutrition*. 2010;49;401–407.
131. Jacqmain M, Doucet E, Després JP, Bouchard C, Tremblay A. Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;77;1448–1452.
132. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care*. 2007;30;980–986.
133. Kimball SM, Mirhosseini N, Holick MF. Evaluation of vitamin D3 intakes up to 15,000 international units/day and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations up to 300 nmol/L on calcium metabolism in a community

- setting. *Dermato-Endocrinology*. 2017;<https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1300213>.
134. Mirhosseini N, Vatanparast H, Mazidi M, Kimball SM. Vitamin D supplementation, glycemic control, and insulin resistance in prediabetics: A meta-analysis. *Journal of the Endocrine Society*. 2018;2;687–709.
  135. Luong KVQ, Hoang Nguyen LT, Pham Nguyen DN. The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2005;21;338–346.
  136. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005;48;1247–1257.
  137. Lips P, Eekhoff M, van Schoor N, Oosterwerff M, de Jongh R, Krul-Poel Y, Simsek S. Vitamin D and type 2 diabetes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;173;280–285.
  138. Danescu LG, Levy S, Levy J. Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine*. 2019;35;11–17.
  139. Ashraf A, Alvarez JA. Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *International Journal of Endocrinology*. 2010;<https://doi.org/10.1155/2010/351385>.
  140. Von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient-a randomised, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*. 2010;103;549–555.
  141. Procopio M, Magro G, Cesario F, Piovesan A, Pia A, Molineri N, Borretta G. The oral glucose tolerance test reveals a high frequency of both impaired glucose tolerance and undiagnosed type 2 diabetes mellitus in primary hyperparathyroidism. *Diabetic Medicine*. 2010;19;958–961.
  142. Reis, Jared P. Vitamin D, parathyroid hormone levels and the prevalence of metabolic syndrome in community-dwelling older adults, Von Mühlen D, Kritz-Silverstein D, Wingard DL, Barrett-Connor E. Vitamin D, parathyroid hormone levels, and the prevalence of metabolic syndrome in community-

- dwelling older adults. *Diabetes Care*. 2007;30;1549–1555.
143. Grant AM. Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised Evaluation of Calcium or vitamin D, RECORD): A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005;365;1621–1628/
  144. Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012; <https://doi.org/10.1155/2012/634195>.
  145. Malecki MT, Klupa T, Wolkow P, Bochenski J, Wanic K, Sieradzki J. Association study of the vitamin D: 1Alpha-hydroxylase (CYP1alpha) gene and type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes and Metabolism*. 2003;29;119–124.
  146. Кобиляк Н.М., Динник О.Б. КДВ. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ДІАГНОСТИКИ ТА СКРИНІНГУ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У ХВОРИХ ІЗ НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2015;69–99.
  147. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*. 2015; 62;S47–S64.
  148. Шаронова Л.А., Вербовой А.Ф., Вербовая Н.И. ПАВ. Взаимосвязь неалкогольной жировой болезни печени и сахарного диабета 2-го типа. «РМЖ». 2017;1635–1640.
  149. Kobyliak N, Abenavoli L, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Voccutto L, Kononenko L, Kyriienko D, Komisarenko I, Dynnyk O. Beneficial effects of probiotic combination with omega fatty acids in NAFLD: A randomized clinical study. *Minerva Medica*. 2018; <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.18.05845-7>.
  150. Nar A, Gedik O. The effect of metformin on leptin in obese patients with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Diabetologica*. 2009;46;113–118.
  151. Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, et al. Effect of empagliflozin on liver fat

- in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care*. 2018;41;1801–1808.
152. Rhee EJ. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes: An epidemiological perspective. *Endocrinology and Metabolism*. 2019;34;226–233;
153. Valenti L, Bugianesi E, Pajvani U, Targher G. Nonalcoholic fatty liver disease: cause or consequence of type 2 diabetes? *Liver International*. 2016; 36;1563–1579.
154. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2016;65;1096–1108.
155. Кравчун Н.А., Земляницина О.В. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет 2-го типа: клиника, диагностика, терапия. *Ліки України*. 2012;1;18–21.
156. Урбанович АМ. Гормони жирової тканини та їх клінічне значення. *ENDOKRYNOLOGIA*. 2013;18;69–72.
157. Боднар П, Михальчишин Г, Кобиляк Н. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет типу 2: патогенез, діагностика та лікування (лекція). *Ендокринологія*. 2012;17;94–101.
158. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology*. 1998;114;842–845.
159. Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model.” *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24;2974–2983.
160. Luedde T, Schwabe RF. NF-κB in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2011;8;108–118.
161. Ruissen MM, Mak AL, Beuers U, Tushuizen ME, Holleboom AG. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Multidisciplinary Approach Towards A Cardiometabolic Liver Disease. *European Journal of Endocrinology*.

2020;<https://doi.org/10.1530/eje-20-0065>.

162. Martin JT. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World Journal of Orthopaedics*. 2013;4;186–197.
163. Maruyama K, Takada Y, Ray N, Kishimoto Y, Penninger JM, Yasuda H, Matsuo K. Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulate Proinflammatory Cytokine Production in Mice. *The Journal of Immunology*. 2006;177;3799–3805.
164. Ohigashi I, Nitta T, Lkhagvasuren E, Yasuda H, Takahama Y. Effects of RANKL on the thymic medulla. *European Journal of Immunology*. 2011;41;1822–1827.
165. Zhang P, Liu J, Xu Q, Harber G, Feng X, Michalek SM, Katz J. TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through differential induction of NFATc1 and NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286;24159–24169.
166. Duan P, Tu P, Si L, Hu W, Liu M, Liu J, Xue Y. Gene Polymorphisms in the RANKL/RANK/OPG Pathway Are Associated with Type 2 Diabetes Mellitus in Southern Han Chinese Women. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2016;20;285–290.
167. Niu Y, Zhang W, Yang Z, et al. Plasma osteoprotegerin levels are inversely associated with nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: A case-control study in China. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2016;65;475–481.
168. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005;42;44–52.
169. Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, et al. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: Relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology*. 2012;56;2180–2187.
170. Zhou QG, Hou FF, Guo ZJ, Liang M, Wang GB, Zhang X. 1,25-



- Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2008;24;459–464.
171. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Tov A Ben, Brazowski E, Reif S. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut*. 2011;60;1728–1737.
  172. Joka D, Wahl K, Moeller S, Schlue J, Vaske B, Bahr MJ, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2012;55;455–464.
  173. Wang X, Li W, Zhang Y, Yang Y, Qin G. Association between vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: results from a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015; 8.
  174. Nakano T, Cheng YF, Lai CY, et al. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Journal of Hepatology*. 2011;55;415–425.
  175. Seydel Ş, Beilfuss A, Kahraman A, Aksoy K, Gerken G, Akkiz H, Canbay A. Vitamin D ameliorates stress ligand expression elicited by free fatty acids in the hepatic stellate cell line LX-2. *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2011; 22;400–407.
  176. Torres DM, Williams CD, Harrison SA. Features, Diagnosis, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012;10;837–858.
  177. Bril F, Cusi K. Management of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: A call to action. *Diabetes Care*. 2017;40;419–430.
  178. Li WD, Fu KF, Li GM, Lian YS, Ren AM, Chen YJ, Xia JR. Comparison of effects of obesity and non-alcoholic fatty liver disease on incidence of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21;9607–9613.

179. Mann JP, Valenti L, Scorletti E, Byrne CD, Nobili V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Seminars in Liver Disease*. 2018;38;1–13.
180. Pacifico L, Osborn JF, Bonci E, Pierimarchi P, Chiesa C. Association between Vitamin D Levels and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Potential Confounding Variables. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2018;19;310–332.
181. Pfothenhauer KM, Shubrook JH. Vitamin D deficiency, its role in health and disease, and current supplementation recommendations. *Journal of the American Osteopathic Association*. 2017;117;301–305.
182. Basit S. Vitamin D deficiency, its role in health and disease, and current supplementation recommendations. *British Journal of Biomedical Science*. 2013;70;161–172.
183. Sacerdote A, Dave P, Lokshin V, Bahtiyar G. . Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, and Vitamin D. *Current Diabetes Reports*. 2019;19;101.
184. Pilz S, Kienreich K, Rutters F, De Jongh R, Van Ballegooijen AJ, Gröbler M, Tomaschitz A, Dekker JM. Role of vitamin D in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*. 2013;13;261–270.
185. Yakaryılmaz FD, Öztürk ZA. Treatment of type 2 diabetes mellitus in the elderly. *World Journal of Diabetes*. 2017;8;278.
186. Shiota M, Inagami M, Fujimoto Y, Moriyama M, Kimura K, Sugano T. Cold acclimation induces zonal heterogeneity in gluconeogenic responses to glucagon in rat liver lobule. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 1995;268;E1184-91.
187. Das J, Ghosh J, Roy A, Sil PC. Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2-NFκB pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;260;35–47.
188. Takahashi M, Makino S, Kikkawa T, Osumi N. Preparation of rat serum suitable for mammalian whole embryo culture. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;e51969.

189. Mazanova AO. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF IMMUNOENZYME TEST-SYSTEM FOR DETERMINATION OF 25-HYDROXYVITAMIN D IN BLOOD SERUM. *Biotechnologia Acta*. 2016; 9;28–36.
190. REITMAN S, FRANKEL S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of clinical pathology*. 1957;28;56–63.
191. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18;499–502.
192. Кобиляк Н. Порівняльна оцінка інструментальних методів діагностики неалкогольного стеатогепатозу у хворих на цукровий діабет типу 2 (клініко-експериментальне дослідження). Терноп. держ. мед. ун-т ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України. 2013.
193. Михальчишин ГП, Боднар ПМ, Кобиляк НМ. Вплив пробіотикотерапії на клініко--біохімічні та інструментальні показники неалкогольної жирової хвороби печінки у хворих на цукровий діабет типу 2. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2014;60;49–56.
194. Abdel-Wareth L, Haq A, Turner A, et al. Total vitamin D assay comparison of the roche diagnostics “vitamin D total” electrochemiluminescence protein binding assay with the chromsystems HPLC method in a population with both D2 and D3 forms of vitamin D. *Nutrients*. 2013;5;971–980.
195. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28;412–419.
196. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004;27;1487–1495.
197. Brun JF, Raynaud E, Mercier J. Homeostasis model assessment and related simplified evaluations of insulin sensitivity from fasting insulin and glucose.

- Diabetes Care. 2000;23;1037–1038.
198. Little RR, Rohlfing C, Sacks DB. The national glycohemoglobin standardization program: Over 20 years of improving hemoglobin A1c measurement. *Clinical Chemistry*. 2019;65;839–848.
  199. Salazar J, Bermúdez V, Calvo M, et al. Optimal cutoff for the evaluation of insulin resistance through triglyceride-glucose index: A cross-sectional study in a Venezuelan population. *F1000Research*. 2018;6;1337.
  200. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102;2708–2715.
  201. Kobyliak N, Abenavoli L. The role of liver biopsy to assess non-alcoholic fatty liver disease. *Reviews on Recent Clinical Trials* 9;2014.
  202. Blond E, Disse E, Cuerq C, Drai J, Valette PJ, Laville M, Thivolet C, Simon C, Caussy C. EASL–EASD–EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease in severely obese people: do they lead to over-referral? *Diabetologia*. 2017;60;1218–1222.
  203. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. The fatty liver index: A simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology*. 2006; 6;33.
  204. Lee JH, Kim D, Kim HJ, et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 2010;42;503–508.
  205. Wang N, Cheng J, Ning Z, et al. Type 2 Diabetes and Adiposity Induce Different Lipid Profile Disorders: A Mendelian Randomization Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2018;103;2016–2025.
  206. Satin LS, Butler PC, Ha J, Sherman AS. Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*. 2015;42;61–77.

207. Вк Б, Аю Б, Юв Д, Аа Б. НОВАЯ МОДЕЛЬ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА И ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС. Трансляционная медицина. 2016;<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2016-3-4-44-55>.
208. Issa CM. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC. 2017;193–205.
209. Beeson M, Sajan MP, Dizon M, et al. Activation of protein kinase C- $\zeta$  by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: Amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes*. 2003;52;1926–1934.
210. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2007;10;142–148.
211. Bathina S, Srinivas N, Das UN. Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;486;406–413.
212. Patti AM, Giglio RV, Papanas N, Rizzo M, Rizvi AA. Future perspectives of the pharmacological management of diabetic dyslipidemia. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2019;12;129–143.
213. Jung CH, Lee B, Choi DH, Jung SH, Kim BY, Kim CH, Kang SK, Mok JO. Association of grade of non-alcoholic fatty liver disease and glycated albumin to glycated hemoglobin ratio in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017;125;53–61.
214. Pala L, Barbaro V, Dicembrini I, Rotella CM. The therapy of insulin resistance in other diseases besides type 2 diabetes. *Eating and Weight Disorders*. 2014;19;275–283.
215. Kurauti MA, Ferreira SM, Soares GM, Vettorazzi JF, Carneiro EM, Boschero AC, Costa-Júnior JM. Hyperinsulinemia is associated with increasing insulin secretion but not with decreasing insulin clearance in an

- age-related metabolic dysfunction mice model. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 234;9802–9809.
216. Grammatiki M, Karras S, Kotsa K . The role of vitamin D in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus: a narrative review. *Hormones*. 2019;18;37–48.
217. Calle C, Maestro B, García-Arencibia M. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Molecular Biology*. 2008;9;65.
218. Garbossa SG, Folli F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2017;18;243–258.
219. Fujii J, Homma T, Kobayashi S, Seo HG. Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Biological Chemistry*. 2018;9;1–15.
220. Wimalawansa SJ . Vitamin D deficiency: Effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging. *Biology*. 2019; 8;30.
221. Iqbal S, Khan S, Naseem I. Antioxidant Role of Vitamin D in Mice With Alloxan-Induced Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*. 2018;42;412–418.
222. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2016;8;227–241.
223. Kanigur Sultuybek G, Soydas T, Yenmis G. NF-κB as the mediator of metformin's effect on ageing and ageing-related diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2019;46;413–422.
224. Mitchell JP, Carmody RJ. NF-κB and the Transcriptional Control of Inflammation. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.2018;41–84.
225. Singh PK, van den Berg PR, Long MD, et al. Integration of VDR genome

- wide binding and GWAS genetic variation data reveals co-occurrence of VDR and NF- $\kappa$ B binding that is linked to immune phenotypes. *BMC Genomics*. 2017;18;132.
226. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*. 2017; 26;253–266.
227. Neta R, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Relationship of TNF to interleukins. *Immunology series*. 1992; 56;499–566.
228. Fadaei R, Bagheri N, Heidarian E, Nouri A, Hesari Z, Moradi N, Ahmadi A, Ahmadi R. Serum levels of IL-32 in patients with type 2 diabetes mellitus and its relationship with TNF- $\alpha$  and IL-6. *Cytokine*. 2020;125;154832
229. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119;105–110.
230. Yang X, Zhang X, Heckmann BL, Lu X, Liu J. Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced lipolysis in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286;40477–40485.
231. Alipourfard I, Datukishvili N, Mikeladze D . TNF- $\alpha$  downregulation modifies insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in metabolic signaling of diabetic insulin-resistant hepatocytes. *Mediators of Inflammation*. 2019.
232. Sergeev IN. Vitamin D status and vitamin D-dependent apoptosis in obesity. *Nutrients*. 2020;12;1392.
233. Hanel A, Malmberg HR, Carlberg C. Genome-wide effects of chromatin on vitamin d signaling. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2020;64;R45–R56.
234. Zhu J, Deluca HF. Vitamin D 25-hydroxylase - Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523;30–36.
235. Tuckey RC, Li W, Ma D, Cheng CYS, Wang KM, Kim TK, Jeayeng S, Slominski AT. CYP27A1 acts on the pre-vitamin D<sub>3</sub> photoproduct, lumisterol, producing biologically active hydroxy-metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;181;1–10.

236. Bikle DD, Patzek S, Wang Y. Physiologic and pathophysiologic roles of extra renal CYP27b1: Case report and review. *Bone Reports*. 2018;8;255–267.
237. Nurminen V, Neme A, Seuter S, Carlberg C. The impact of the vitamin D-modulated epigenome on VDR target gene regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2018;1861;697–705.
238. Hii CS, Ferrante A. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients* 8:135
239. (2018) Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetesd2018. *Diabetes Care*. 2016;41;S13–S27.
240. Алудван МБ, Кобиляк НМ, Комісаренко ЮІ. Метаболічні предиктори та дефіцит вітаміну D у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го тип. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2019;15;459–468.
241. Unger G, Benozzi SF, Perruzza F, Pennacchiotti GL. Triglycerides and glucose index: A useful indicator of insulin resistance. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. 2014;61;533–540.
242. Алудван МБ, Кобиляк НМ, Комісаренко ЮІ. ВПЛИВ СТАТУСУ D3 НА ОСНОВНІ КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНІ ПОКАЗНИКИ ПАЦІЄНТІВ ІЗ НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2019;83–93.
243. Gómez-Ambrosi J, Silva C, Galofré JC, et al. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *International Journal of Obesity*. 2012;36;286–294.
244. Petta S, Di Marco V, Di Stefano R, Cabibi D, Cammà C, Marchesini G, Craxà A. TyG index, HOMA score and viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1. *Journal of Viral Hepatitis*. 2011;18.
245. Zhang S, Du T, Zhang J, Lu H, Lin X, Xie J, Yang Y, Yu X. The triglyceride and glucose index (TyG) is an effective biomarker to identify nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16;15.
246. Aludwan M, Kobyliak N, Abenavoli L, Kononenko L, Shuliarenko L, Kyriienko D, Komisarenko I. Hepatic steatosis indices as predictors of



- vitamin D 3 deficiency in patients with NAFLD associated with type 2 diabetes. *Clinical Diabetology*. 2020;9;313–320.
247. Shah D, Gupta P. Vitamin D deficiency: Is the pandemic for real? *Indian Journal of Community Medicine*. 2015;40;215–217.
248. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: Its importance for beta cell and immune function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;347;106–120.
249. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, Van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*. 2008;29;726–776.
250. Park SK, Garland CF, Gorham ED, BuDoff L, Barrett-Connor E. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of type 2 diabetes and pre-diabetes: 12-year cohort study. *PLoS ONE*. 2018;13;e0193070.
251. Bell DSH. Metformin-induced vitamin B12 deficiency presenting as a peripheral neuropathy. *Southern Medical Journal*. 2010;103;265–267.
252. Mazokopakis EE, Starakis IK. Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2012;97;359–367.
253. Kos E, Liszek MJ, Emanuele MA, Durazo-Arvizu R, Camacho P. Effect of metformin therapy on vitamin D and vitamin B 12 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Practice*. 2012;18;179–184.
254. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Sabico SB, Al-Othman A, Moharram O, Alokail MS, Al-Saleh Y, Kumar S, Chrousos GP. Vitamin D supplementation in patients with diabetes mellitus type 2 on different therapeutic regimens: A one-year prospective study. *Cardiovascular Diabetology*. 2013;12;113.
255. Lee SM, Jun DW, Cho YK, Jang KS. Vitamin D deficiency in non-alcoholic fatty liver disease: The chicken or the egg? *Clinical Nutrition*. 2017;36;191–

- 19.
256. Leitão J, Carvalhana S, Silva AP, Velasco F, Medeiros I, Alves AC, Bourbon M, Oliveiros B, Carvalho A, Cortez-Pinto H. No evidence for lower levels of serum vitamin d in the presence of hepatic steatosis. A study on the portuguese general population. *International Journal of Medical Sciences*. 2018;15;1778–1786.
257. Yodoshi T, Orkin S, Arce-Clachar AC, Bramlage K, Liu C, Fei L, El-Khider F, Dasarathy S, Xanthakos SA, Mouzaki M. Vitamin D deficiency: prevalence and association with liver disease severity in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2019;<https://doi.org/10.1038/s41430-019-0493-y>.
258. Dasarathy J, Periyalwar P, Allampati S, Bhinder V, Hawkins C, Brandt P, Khiyami A, Mccullough AJ, Dasarathy S. Hypovitaminosis D is associated with increased whole body fat mass and greater severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*. 2014;34.
259. Angellotti E, D'Alessio D, Dawson-Hughes B, Nelson J, Cohen RM, Gastaldelli A, Pittas AG. Vitamin D supplementation in patients with type 2 diabetes: The vitamin D for established type 2 diabetes (DDM2) study. *Journal of the Endocrine Society*. 2018;2;310–321.
260. Gagnon C, Daly RM, Carpentier A, Lu ZX, Shore-Lorenti C, Sikaris K, Jean S, Ebeling PR. Effects of combined calcium and vitamin D supplementation on insulin secretion, insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function in multi-ethnic vitamin D-deficient adults at risk for type 2 diabetes: A pilot randomized, placebo-controlled trial. 2019;PLoS ONE 9:e109607.
261. Dabbaghmanesh MH, Danafar F, Eshraghian A, Omrani GR. Vitamin D supplementation for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A randomized double blind placebo controlled trial. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 2018;12;513–517.
262. Mansour-Ghanaei F, Pourmasoumi M, Hadi A, Ramezani-Jolfaie N, Joukar

F. The Efficacy of Vitamin D Supplementation against Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. *Journal of Dietary Supplements*. 2020; 17;467–485.