



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Milena M. Cojić**

**EFEKTI SUPLEMENTACIJE VITAMINOM D  
NA GLIKOREGULACIJU I PARAMETRE  
OKSIDATIVNOG STRESA KOD PACIJENATA  
SA DIJABETESOM MELITUSOM TIPA 2  
NA TERAPIJI METFORMINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Milena M. Cojić**

**THE EFFECTS OF VITAMIN D SUPPLEMENTATION  
ON GLYCAEMIC CONTROL  
AND OXIDATIVE STRESS MARKERS  
IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS  
TREATED WITH METFORMIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	<b>Prof. dr Radivoj Kocić</b> , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
Naslov:	<b>EFEKTI SUPLEMENTACIJE VITAMINOM D NA GLIKOREGULACIJU I PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD PACIJENATA SA DIJABETESOM MELITUSOM TIPA 2 NA TERAPIJI METFORMINOM</b>
Rezime:	<p>Pored odavno prepoznate uloge u metabolizmu kostiju naučna javnost sve veću pažnju usmerava ka vanskeletnim efektima vitamina D. Istraživanja su pokazala da vitamin D deficijencija može imati bitnu ulogu u glikemijskoj kontroli kod pacijenta sa dijabetesom melitusom tip 2 (DMT2) jer utiče na adekvatno lučenje insulina, pojavu insulinske rezistencije (IR) i sistemske inflamacije. Skoriji dokazi ukazuju na to da vitamin D može zaštititi ćeliju od oštećenja koja su posledica oksidativnog stresa ispoljavajući na taj način i antioksidativni efekat. Međutim i pored velikih očekivanja interventne studije nisu uspele da tačno odrede mesto i ulogu vitamina D u kontroli ove hronične bolesti.</p> <p>Ovo istraživanje je sprovedeno sa ciljem da ispita efekte šestomesečne suplementacije vitaminom D na parametre glikemijske kontrole, oksidativnog stresa i kardiovaskularnog rizika kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.</p> <p>Istraživanje je sprovedeno kao randomizovana, kontrolisana, prospektivna studija tokom koje je praćeno 130 pacijenata sa DMT2 lečenih u Domu zdravlja Podgorica, u periodu od 6 meseci (jun-decembar). Regrutovani pacijenti su nasumično podenjeni u 2 grupe (odnos 1:1) pri čemu je prva grupa dobijala vitamin D i metformin, dok je druga grupa nastavila da uzima samo metformin. Doziranje je izvršeno prema smernicama Američkog endokrinološkog društva u odnosu na početne vrednosti vitamina D u serumu. Svi ispitanici su u 3. i 6. mesecu podvrgnuti kliničkom pregledu i detaljnim laboratorijskim analizama. Uticaj na stepen glikemijske kontrole praćen je određivanjem vrednosti glikemije našte, glikoziliranog hemoglobina (HbA1c), insulinemije našte kao i određivanjem surogat markera IR (HOMA-IR i TyG indeksa). Uticaj na parametre oksidativnog stresa praćen je određivanjem enzima mijeloperoksidaze (MPO), ksantin oksidaze (XO) i katalaze, zatim određivanjem prisustva nitrata i nitrita (NOx), totalnog oksidativnog (TOC) i totalnog reduktivnog kapaciteta plazme (TRC). Takođe su praćeni i produkti oksidativnog oštećenja lipida određivanjem koncentracije malondialdehida (MDA) i odnosa TG i supstanci koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TG/TBARS). Oksidativno oštećenje proteina praćeno je određivanjem koncentracije produkata uznapredovale oksidacije proteina (AOPP). Uticaj na parametre kardiovaskularnog rizika praćen je određivanjem vrednosti sistolnog (SKP) i dijastolnog krvnog pritiska (DKP), indeksa telesne mase (BMI), obima struka (OS), TG, ukupnog, HDL i LDL holesterola, kao i aterogenih indeksa Castelli I i Castelli II.</p> <p>Rezultati našeg istraživanja su pokazali povoljan efekat vitamina D na vrednosti glikemije našte nakon 3 meseca, ali ne i nakon 6 meseci. Nakon 6 meseci suplementacije u grupi koja je primala vitamin D vrednosti HbA1c su</p>

bile značajno niže u odnosu na početne, ali statistički značajna razlika između grupa nije zabeležena. Vitamin D je pokazao povoljan efekat i kada je u pitanju IR merena TYG indeksom nakon 3 i nakon 6 meseci suplementacije dok na vrednosti HOMA-IR indeksa nije bilo značajnog uticaja. U toku perioda praćenja nije bilo statistički značajne razlike između grupa u vrednostima produkata oksidativne modifikacije lipida i proteina (MDA i AOPP), mada su pacijenti koji su primali vitamin D imali tendenciju sniženja vrednosti MDA za razliku od pacijenata koji su primali samo metformin. Nakon 3 meseca zabeležen je značaj efekat na vrednosti TG/TBARS indeksa u korist pacijenata koji su dobijali vitamin D. Kada je u pitanju efekat na dominantne enzime geneze slobodnih radikala vitamin D je povoljno uticao na vrednosti MPO nakon 3 i nakon 6 meseci suplementacije, dok na vrednosti XO nije ispoljio značajan efekat. Vrednosti parametara antioksidativne zaštite, TOC i NOx se nisu značajno menjale pod uticajem vitamina D u toku perioda praćenja. Većina pacijenata je imala hipertenziju i uzimala je redovno antihipertenzive. Vitamin D nije doveo do značajnog sniženja SKP i DKP iako je u Metformin + Vitamin D grupi nakon 3. meseca došlo do statistički značajnog pada vrednosti SKP. Efekat na lipidni status na kraju 3. i 6. meseca je bio povoljan samo kada su u pitanju vrednosti TG, dok na vrednosti ostalih parametara nije bilo povoljnog uticaja. Značajn efekat na aterogene indekse zabeležen je samo nakon 3. meseca i samo kod Castelli I indeksa. Oralna suplementacija vitaminom D nije imala povoljan efekat na vrednosti BMI i CRP, ali je nakon 3 meseca ispoljila povoljan efekat na vrednosti OS.

Kratkoročna suplementacija vitaminom D u trajanju od 3 meseca dovodi do značajnog sniženja vrednosti glikemije našte, TG/TBARS indeksa i aterogenog indeksa Castelli I kod pacijenata sa DMT2 na terapiji metforminom. Dugoročna suplementacija vitaminom D u trajanju od 6 meseci dovodi do značajnog sniženja vrednosti MPO, TG i TYG indeksa, dok povoljan efekat na vrednosti OS predstavlja pre uzgredan nalaz nego odraz povoljnog uticaja vitamina D.

Naučna oblast:  
Naučna  
disciplina:

Medicina  
Interna medicina – endokrinologija

Ključne reči:

vitamin D, glikemijska kontrola, oksidativni stres, malondialdehid, AOPP, mijeloperoksidaza, ksantin oksidaza, NADPH-oksidaza, antioksidantni enzimi, kardiovaskularni rizik, dijabetes melitus tip 2

UDK:

616.379-008.64:[577.164.1+615.252.349.7

CERIF  
klasifikacija:

**B 480**

Tip licence  
Kreativne  
zajednice:

**CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	<b>Prof. dr. Radivoj Kocić</b> , full professor, Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	<b>THE EFFECTS OF VITAMIN D SUPPLEMENTATION ON GLYCAEMIC CONTROL AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS TREATED WITH METFORMIN</b>
Abstract:	<p>In addition to the previously recognized role in bone metabolism, the scientific community is paying increasing attention to the non-skeletal effects of vitamin D. Research has shown that vitamin D deficiency can play an important role in glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) because it affects adequate insulin secretion, the occurrence of insulin resistance (IR) and systemic inflammation. Recent evidence suggests that vitamin D may protect cells from oxidative damage, thereby exhibiting an antioxidant effect. However, despite high expectations, intervention studies have failed to discover the exact place and role of vitamin D in the control of this chronic disease.</p> <p>This study was aimed to investigate the effects of six-month vitamin D supplementation on glycemic control, oxidative stress, and cardiovascular risk parameters in T2DM patients on metformin therapy.</p> <p>This 6-month follow-up study was carried out as a randomized, controlled trial of 130 patients with DMT2 recruited from Primary Health Care Center Podgorica (June-December 2018). All patients were randomly assigned into 2 groups (ratio 1: 1) where the first group received vitamin D and metformin, while the second group continued to take only metformin. Dosing was performed according to the Endocrine Society guidelines based on the participant's initial levels of vitamin D. All subjects underwent clinical examination and detailed laboratory analyzes at 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> month of the follow-up period. The potential benefit on glycemic control was monitored through determining the values of fasting glycaemia, glycosylated haemoglobin (HbA1c), fasting insulin level as well as through determining surrogate markers of IR (HOMA-IR and TYG index). The effect on oxidative stress parameters was monitored by determining activities of enzymes myeloperoxidase (MPO), xanthine oxidase (XO) and catalase, followed by determination of the nitrate and nitrite levels (NO<sub>x</sub>), total oxidative (TOC) and total reductive plasma capacity (TRC). The products of oxidative lipid damage were monitored by determining the concentration of malondialdehyde (MDA) and the TG - thiobarbituric acid reactive substances ratio (TG/TBARS). Oxidative protein damage was monitored through determination of the advanced oxidation protein products (AOPP). The effect on cardiovascular risk parameters was monitored by determining the values of systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), body mass index (BMI), waist circumference (WC), TG, total, HDL and LDL cholesterol, as well as atherogenic risk indexes Castelli I and Castelli II.</p> <p>The results from our study showed a favorable effect of vitamin D on fasting glycaemia over the 3-month follow-up period. After 6 months of supplementation, HbA1c levels were significantly lower in the vitamin D</p>

receiving group, but there was no statistically significant difference between the groups. Vitamin D also showed a favorable effect on IR measured by TYG index after 3 and after 6 months of supplementation, but there was no significant effect on the values of HOMA-IR index. During the follow-up period, there was no statistically significant difference between the groups regarding levels of lipid and protein oxidative damage products (MDA and AOPP), although patients receiving vitamin D tended to have decreased levels of MDA during the study. After 3 months, a significant effect on TG/TBARS index was observed in favor of patients receiving vitamin D. A favorable effect was observed on MPO levels after 3 and after 6 months of supplementation, while there was no significant effect on XO levels. The antioxidant plasma capacity, TOC and NOx levels did not change significantly under the influence of vitamin D supplementation. Most patients had hypertension and took BP lowering drugs regularly. Vitamin D did not lead to a significant decrease in SBP and DBP, although in the Metformin + Vitamin D group there was a statistically significant decrease in SBP values after 3 months. The favorable effect on lipid status was seen only for TG levels after 3 and after 6 months period. A significant anti-atherogenic effect was observed only regarding Castelli I risk index and only after 3 months of follow period. Oral vitamin D supplementation did not have a favorable effect on BMI and CRP values, but after 3 months it showed a favorable effect on WC values.

Short-term vitamin D supplementation leads to a significant reduction in fasting glucose, TG/TBARS index and atherogenic risk index Castelli I in patients with DMT2 on metformin therapy. Long-term vitamin D supplementation leads to a significant decrease in MPO, TG and TYG indices, while the favorable effect on WC values is more an incidental finding than a reflection of the favorable effect of vitamin D.

Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Internal medicine – endocrinology
Key Words:	vitamin D, glycaemic control, oxidative stress, malondialdehyde, AOPP, myeloperoxidase, xanthine oxidase, NADPH-oxidase, antioxidant enzymes, cardiovascular risk, diabetes mellitus type 2
UDC:	616.379-008.64:[577.164.1+615.252.349.7
CERIF Classification:	<b>B 480</b>
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## **ZAHVALNOST**

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, **prof. dr Radivoju Kociću** na nesebičnoj podršci i korisnim savetima tokom izrade doktorske disertacije. Posebno hvala za svu iskazanu ljudskost i bodrenje tokom pandemije COVID-19.*

*Naročitu zahvalnost dugujem **prof. dr Gordani Kocić** koja je omogućila da se jedan deo analiza odradi u Institutu za biohemiju, Medicinskog fakulteta u Nišu što je dalo posebnu naučnu vrednost ovom istraživanju. Veliko hvala što mi je svojim znanjem i iskustvom pomogla da prepoznam značajnost oksidativnog stresa u nastanku mnogih hroničnih bolesti sa kojim se lekari svakodnevno bore. Velika mi je čast što je bila deo ovog tima.*

*Mojoj mentorki **prof. dr Ljiljani Cvejanov-Kezunović** koja me „zarazila“ naukom hvala što je uvek bila prvenstveno veliki čovek, velika inspiracija, moj „vetar u leđa“ za sve naučne i životne podvige.*

*Hvala **dr Aleksandri Klisić** na neizmerno korisnim savetima i stručnim sugestijama, bodrenju, prijateljstvu i besprekornoj tehničkoj pomoći tokom istraživanja.*

*Hvala mojoj matičnoj ustanovi Domu zdravlja Podgorica na čelu sa **direktorom doc. dr Nebojšom Kavarićem** na velikoj podršci da se bavim naukom.*

*Najtoplije se zahvaljujem mojim roditeljima, **Miliji i Miri** koji su moji uzori, moja podrška, najveći deo svakog mog uspeha! Hvala vam na svemu što činite za mene, nadam se da ćete biti ponosni.*

*Mom **Nikoli** i mojoj **Leni**, mojoj tvrđavi koja me čuva i bez koje sve ovo ne bi imalo smisla hvala na ogromnom strpljenju, ljubavi i podršci.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>12</b>
1.1. Izvori i metabolizam vitamina D.....	12
1.2. Mehanizam delovanja vitamina D .....	15
1.3. Procena statusa vitamina D u ljudskom organizmu .....	16
1.4. Nedostatak vitamina D (Vitamin D deficijencija) .....	17
1.5. Prevencija i tretman vitamin D deficijencije.....	19
1.6. Vitamin D deficijencija i DMT2 .....	21
1.6.1. Vitamin D deficijencija i insulinska sekrecija .....	21
1.6.2. Vitamin D deficijencija i insulinska rezistencija .....	22
1.6.3. Vitamin D deficijencija i inflamacija.....	24
1.7. Efekat suplementacije vitaminom D na glikoregulaciju kod DMT2 .....	24
1.8. Oksidativni stres.....	25
1.9. Markeri oksidativnog stresa .....	27
1.9.1. Oksidativno oštećenje lipida .....	28
1.9.2. Oksidativno oštećenje proteina .....	29
1.9.3. Oksidativno oštećenje DNK .....	30
1.10. Antioksidativna zaštita .....	30
1.10.1. Enzimski antioksidansi.....	31
1.10.2. Neenzimski antioksidansi .....	31
1.11. Oksidativni stres i DMT2.....	32
1.11.1. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi DMT2 .....	32
1.11.2. Uloga oksidativnog stresa u nastanku dijabetesnih komplikacija.....	35
1.11.3. Autooksidacija glukoze, proces neenzimske glikacije tj. formiranja krajnjih produkata glikoksidacije (AGEs).....	35
1.11.4. Put sorbitola (poliola).....	36
1.11.5. Aktivacija PKC i MAP kinaze .....	36
1.12. Antioksidativno dejstvo vitamina D.....	37
<b>2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>38</b>
2.1. Radna hipoteza .....	38
2.2. Cilj istraživanja .....	38
<b>3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>39</b>
3.1. Dizajn studije i karakteristike ispitanika .....	39
3.2. Intervencija.....	40



3.3. Metode.....	42
3.3.1. Antropometrijska merenja .....	42
3.3.2. Laboratorijske analize.....	43
3.4. Statistička analiza.....	45
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>48</b>
4.1. Demografski podaci i kliničke karakteristike ispitanika .....	48
4.2. Parametri glikoregulacije .....	49
4.3. Parametri oksidativnog stresa.....	50
4.4. Nivo vitamina D kod ispitanika .....	51
4.5. Rezultati praćenja vrednosti vitamina D u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci.....	51
4.6. Rezultati praćenja vrednosti parametara glikoregulacije u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci.....	52
4.7. Rezultati praćenja vrednosti parametara oksidativnog stresa u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci.....	55
4.8. Rezultati praćenja vrednosti parametara kardiovaskularnog rizika u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci.....	60
4.9. Rezultati analize efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za parametre glikoregulacije tokom perioda praćenja .....	66
4.10. Rezultati analize efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za parametre oksidativnog stresa tokom perioda praćenja .....	67
4.11. Rezultati analize efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za parametre kardiovaskularnog rizika tokom perioda praćenja .....	68
4.12. Rezultati višestruke linearne regresione analize za period praćenja .....	69
4.12.1. Vitamin D .....	69
4.12.2. Parametri glikoregulacije.....	69
4.12.3. Parametri oksidativnog stresa .....	70
4.12.4. Parametri kardiovaskularnog rizika.....	71
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>74</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>84</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>87</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>103</b>

## LISTA SKRAĆENICA

•O <sub>2</sub> -	– superoksid anjon
•OH	– hidroksil radikal
•RO <sub>2</sub>	– peroksil radikal
•HRO <sub>2</sub> -	– hidroperoksil radikal
•NO	– azot monoksid
•NO <sub>2</sub>	– azot dioksid
AGEs	– advanced glycation end products
ALT	– alanin aminotransferaza
ALP	– alkalna fosfataza
AOPP	– produkti uznapredovale oksidacije proteina (advanced oxidation protein products)
AST	– aspartat aminotransferaza
Ca	– kalcijum
Ca <sup>++</sup>	– kalcijum jonizovani
CRP	– C– reaktivni protein
CYP	– citohrom P
DAG	– diacilglicerol
DBP	– vitamin D-vezujući protein
DKP	– dijastolni krvni pritisak
DMT2	– dijabetes melitus tip 2
DNK	– dezoksiribonukleinska kiselina
D <sub>2</sub>	– ergokalciferol
D <sub>3</sub>	– holekalciferol
eNOS	– endotelna azot oksid sintaza
ES	– Američko Endokrinološko društvo (Endocrine Society)
GAE	– ekvivalenti galne kiseline
GGT	– gama-glutamil transpeptidaza
GPx	– glutation peroksidaza
GSH	– glutation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– vodonik peroksid
HbA <sub>1c</sub>	– glikozilirani hemoglobin
HDL	– lipoproteini visoke gustine
HNO <sub>2</sub>	– nitrozni oksid
HOCl	– hipohlorasta kiselina
HOMA-IR	– homeostasis model assessment of insulin resistance (surogat marker insulinske rezistencije)

IJ	– internacionalna jedinica
IOM	– Američki Medicinski Institut (Institute of Medicine)
IR	– insulinska rezistencija
ITM	– indeks telesne mase (engl. body mass index-BMI)
iNOS	– inducibilna azot oksid sintaza
LDL	– lipoproteini niske gustine
MAP	– mitogenom aktiviran protein
MDA	– malondialdehid
MPO	– mijeloperoksidaza
NADPH	– nikotinamid-adenindinukleotid-fosfat
NF-kB	– nuklearni transkripcioni faktor kapa B
nNOS	– neuronalna azot oksid sintaza
NOS	– azot monoksid sintaza
NOx	– zajednički naziv za produkte azot monoksida (nitrite i nitrate)
ONOO-	– peroksinitrit
OS	– obim struka
P	– fosfor
PKC	– protein kinaza C
PTH	– paratiroidni hormon
RONOO	– alkil peroksinitrit
RVK	– reaktivne vrste kiseonika
RVN	– reaktivne vrste azota
SKP	– sistolni krvni pritisak
SMK	– slobodne masne kiseline
SOD	– superoksid dismutaza
TBA	– tiobarbiturna kiselina
TBARS	– tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance
TG	– trigliceridi
TM	– telesna masa
TOC	– totalni oksidativni kapacitet
TRC	– totalni reduktivni kapacitet
TV	– telesna visina
UV	– ultravioletno zračenje
VDR	– vitamin D specifični receptor
XO	– ksantin oksidaza

# 1. UVOD

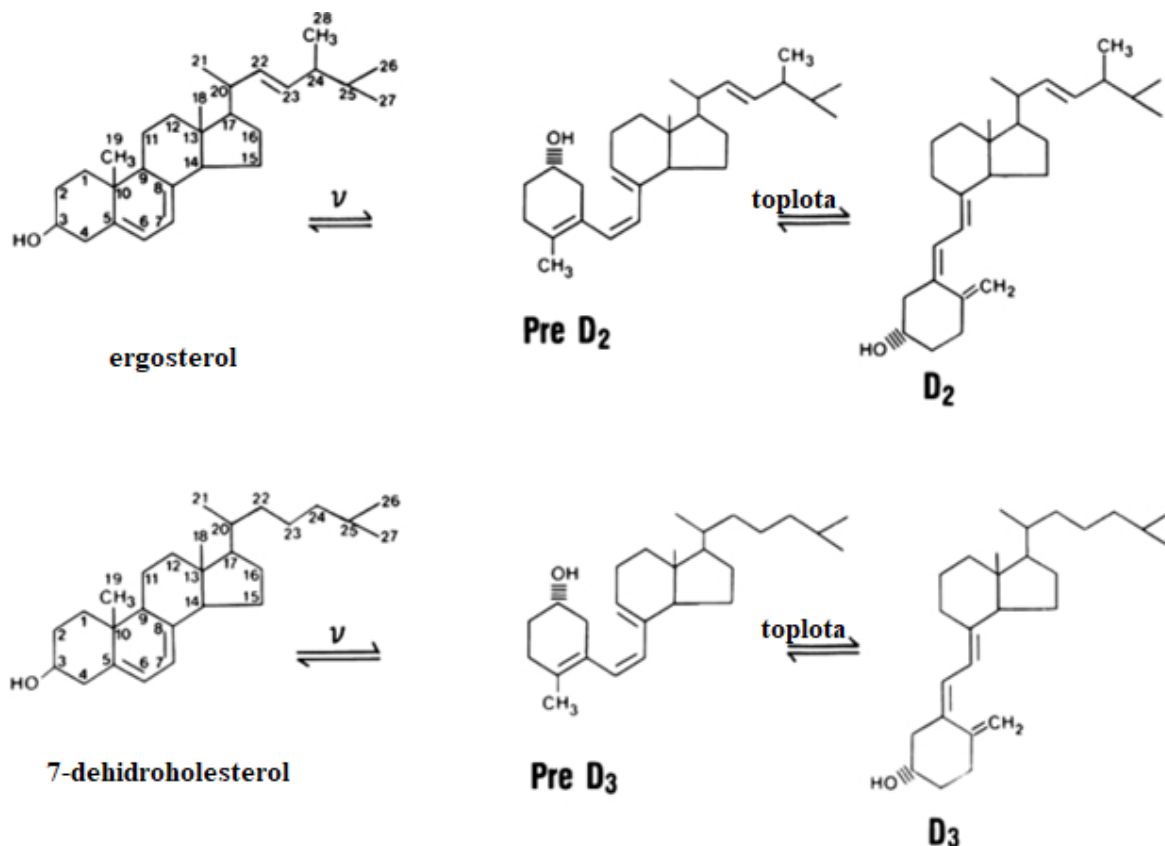
## 1.1. Izvori i metabolizam vitamina D

Vitamin D je početkom 20. veka okarakterisan kao vitamin iako on zapravo nije esencijalni dijetetski suplement. Danas je poznato da je to prohormon, derivat holesterola koji se, za razliku od drugih vitamina sintetiše u organizmu nakon izlaganja kože sunčevim zracima (1,2). Sam naziv vitamin D obuhvata nekoliko formi ovog jedinjenja koja se razlikuju kako po svojoj strukturi tako i po biološkoj aktivnosti. U literaturi se uglavnom pod nazivom vitamin D podrazumevaju njegova dva najbitnija, biološki neaktivna oblika, a to su: vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) i D<sub>3</sub> (holekalciferol) (2-5) (Slika 1). Vitamin D<sub>2</sub> je biljnog porekla i nastaje ultravioletnim (UV) zračenjem sterola u pečurkama koje su izložene sunčevoj svetlosti. U organizam se unosi isključivo putem ishrane ili suplemenata. Vitamin D<sub>3</sub> se takođe u organizam može uneti putem hrane i suplementa, ali je za čoveka najbitniji izvor ipak njegovo endogeno stvaranje prilikom izlaganja sunčevim zracima (6,7). Procenjuje se da na ovaj način ljudski organizam podmiri 80 % zaliha vitamina D, a da se svega 20 % unese putem hrane prilikom konzumiranja namirnica životinjskog porekla obogaćenih vitaminom D ili nekih vrsta morske ribe kao što su losos i haringa (7,8).

U gotovo svim slojevima kože nalazi se derivat holesterola, 7-dehidroholesterol, jedinjenje koje u toku sunčanja apsorbuje UVB zrake (talasne dužine od 290-320 nm) i pretvara se u previtamin D<sub>3</sub> koji se zatim pod uticajem telesne temperature izomerizuje u termički stabilniji oblik vitamin D<sub>3</sub> (7,9).

Nakon sinteze u koži vitamin D<sub>3</sub> prelazi u ekstracelularni prostor odakle cirkulacijom, vezan za vitamin D-vezujući protein (DBP) biva transportovan u druge organe. Ukoliko se u organizam unese putem ishrane vitamin D (D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>) biva apsorbovan u tankom crevu sa ostalim mastima. Prisustvo masti u lumenu creva dovodi do oslobađanja žučnih kiselina koje iniciraju emulzifikaciju i potpomažu proces difuzije u enterocite, nakon čega se vitamin D inkorporira u hilomikrone i biva transportovan do jetre (1,10). Od trenutka kada vitamin D<sub>3</sub> koji je sintetisan u koži ili D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> koji su uneti u organizam putem hrane dospeju do jetre njihov metabolički put se u suštini ne razlikuje. Da bi postao biološki aktivan vitamin D mora proći kroz dve metaboličke reakcije hidroksilacije. Prva reakcija se odigrava u jetri, u prisustvu jednog ili više enzima vitamin D 25-hidroksilaza koji pripadaju familiji citohrom P

450 (CYP) enzima. CYP2R1 je izoforma koja je ključna u hidroksilaciji vitamina D jer njegova mutacija dovodi do pojave vitamin D zavisnog rahitisa.

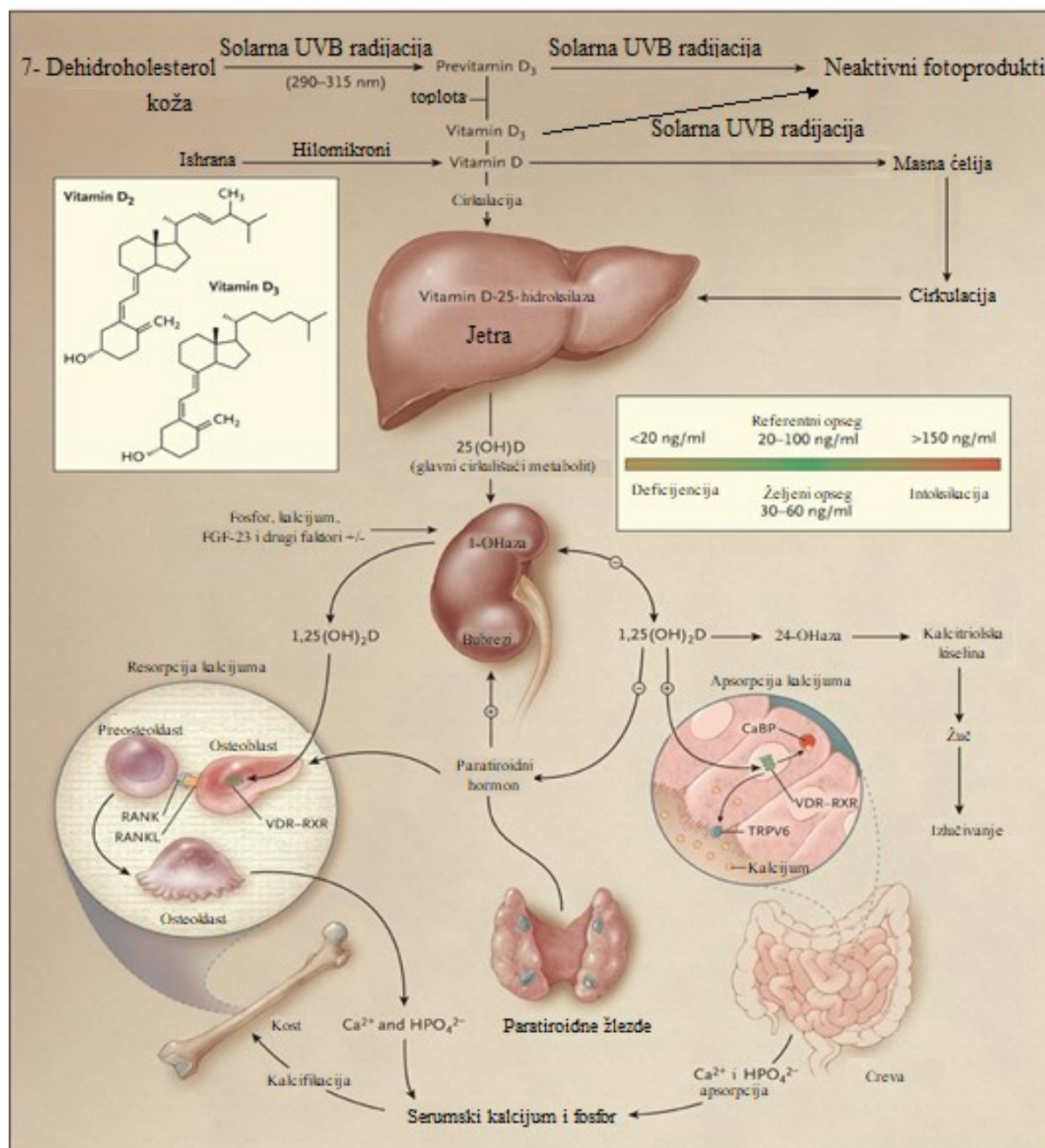


**Slika 1.** Produkcija vitamina D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>

Preuzeto iz: Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94(1):26-34 (5).

Nakon prve hidroksilacije vitamin D na 25. ugljenikovom atomu dobija OH grupu pri čemu nastaje 25-hidroksikalciferol tj. kalcidiol [25(OH)D<sub>3</sub>] (1,11,12). Ovaj metabolit vitamina D ima značajno duži poluživot u odnosu na ostale njegove metabolite (oko 3 nedelje) što ga čini pogodnim indikatorom vitamin D statusa. Nakon formiranja, 25(OH)D<sub>3</sub> vezan za DBP se transportuje do bubrega gde se odigrava druga reakcija hidroksilacije a kao rezultat dobija se 1,25-dihidroksi vitamin D tj. kalcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] koji ujedno predstavlja i aktivni oblik vitamina D. Reakcija se odigrava u kapilarima koji okružuju proksimalne tubule bubrega i u prisustvu enzima 25 hidroksivitamin D-1 alfa-hidroksilaze. Aktivni oblik vitamina D nije povoljan za utvrđivanje vitamin D statusa jer je njegova koncentracija u krvi 1000 puta niža u odnosu na 25(OH)D<sub>3</sub>, a poluživot iznosi svega 3-4 sata. Sinteza 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> je proces koji je pod kontrolom nekoliko faktora. Nedostatak kalcijuma (Ca) i fosfora (P) u serumu kao i povećan nivo paratiroidnog hormona (PTH) stimulišu

hidroksilaciju 25(OH)D<sub>3</sub> pri čemu nastaje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Nasuprot tome, pad nivoa PTH stimuliše oslobađanje fibroblastnog faktora rasta 23 koji inhibira renalnu hidroksilaciju 25(OH)D<sub>3</sub> i nastanak 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Sam 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> takođe može delovati kao supresor ukoliko ga ima dovoljno jer aktivira enzim 25-(OH)D-24-hidroksilazu koji dovodi do stvaranja kalcitroinske kiseline, neaktivnog metabolita koji se iz organizma izlučuje putem žuči (Slika 2) (13-16).



**Slika 2.** Sinteza i metabolizam vitamina D, regulacija metabolizma kostiju

Preuzeto iz: Holick MF. Vitamin D Deficiency. N Engl J Med 2007; 357:266-8 (7).

## 1.2. Mehanizam delovanja vitamina D

Nakon završne reakcije hidroksilacije, aktivni oblik vitamina D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vezuje se za DBP i transportuje do ciljnih tkiva gde vezivanjem za vitamin D specifični receptor (VDR) ostvaruje svoje biološke funkcije. VDR pripada superfamiliji nuklearnih receptora kojoj pripadaju i receptori za glukokortikoide, mineralokortikoide, seksualne i tiroidne hormone. Vezivanjem kalcitriola za VDR dolazi do heterodimerizacije sa nuklearnim retinoid X receptorom što pokreće dalje vezivanje za vitamin D vezujući element i vodi ka aktivaciji ili represiji transkripcionog procesa. Uticajem na transkripciju gena vitamin D ostvaruje svoje genomske efekte. Procenjuje se da VDR reguliše ekspresiju oko 500 gena u humanom genomu. Brzi tj. negenomski efekti se ostvaruju preko membranskih receptora i ogledaju se u aktivaciji različitih signalnih molekula i povećanoj propustljivosti ćelijske membrane za Ca i hlor (17,18).

Zahvaljujući navedenim efektima vitamin D ostvaruje svoje biološke funkcije u ciljnim tkivima kroz 3 grupe procesa a to su: regulacija imunog sistema, regulacija hormonske sekrecije kao i ćelijske proliferacije i diferencijacije (5).

Tanko crevo, paratiroidna žlezda, bubrezi i kosti su primarni organi koji reaguju na endokrino dejstvo kalcitriola i zahvaljujući čemu vitamin D ostvaruje jednu od najbitnijih uloga. Zahvaljujući vitaminu D koncentracije Ca i P se održavaju u fiziološkom opsegu koji je potreban za nesmetano odvijanje koštanog metabolizma. Vezivanjem za VDR u tankom crevu, kalcitriol povećava apsorpciju Ca od prosečnih 10-15 % na 30-40 %, a apsorpciju P sa prosečnih 60 na 80 % (1,7). Snižen nivo Ca u serumu stimuliše paratiroidne žlezde da pojačaju sintezu i sekreciju PTH, koji dalje u bubrezima stimuliše hidroksilaciju kalcidiola u aktivni oblik, kalcitriol. Takođe, u bubrezima kalcitriol i PTH stimulišu reapsorpciju Ca u distalnim tubulima, a inhibiraju reapsorpciju P. U kostima, kalcitriol i PTH inhibiraju proces mineralizacije a promovišu diferencijaciju preosteoklasta u osteoklast nakon čega dolazi do oslobađanja Ca iz koštanih depoa u cirkulaciju (18,19).

Održavanje adekvatnog nivoa Ca i P u serumu i ekstracelularnom prostoru je veoma bitno za proces mineralizacije kostiju. Hronični nedostatak vitamina D u periodu rasta kod dece narušava sazrevanje hondrocita i inhibira normalnu mineralizaciju ploča za rast. To izaziva koštane deformacije i zastoj u rastu, a stanje je poznato kao rahitis. Kod odraslih može se razviti omekšanje kostiju ili osteomalacija (20,21).

### 1.3. Procena statusa vitamina D u ljudskom organizmu

25(OH)D<sub>3</sub> je jedini metabolit vitamina D koji se koristi za procenu statusa i koji najbolje odražava ukupnu količinu vitamina D u organizmu dobijenu kako unosom hrane tako i putem sinteze u koži. Iako 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> predstavlja aktivni oblik, njegova koncentracija u krvi se ne može koristiti kao adekvatan parametar za procenu statusa, pre svega zato što se u slučaju nedostatka vitamina D kompenzatorno povećava (20).

Zbog izrazite lipofilne strukture i visokog afiniteta vezivanja za DBP razvoj testova za procenu 25(OH)D<sub>3</sub> u serumu predstavljao je pravi izazov (22). Na tržištu postoji veliki broj dostupnih komercijalnih testova, ali i pored standardizacije metoda i dalje postoje velika variranja u rezultatima između laboratorija pa čak i kad se primenjuju isti testovi (20,23). To je jedan od razloga zašto je teško odrediti referentni opseg za 25(OH)D<sub>3</sub> i zašto još uvek ne postoji konsenzus koje su to optimalne vrednosti vitamina D.

Granične vrednosti za deficijenciju (nedostatak) i insuficijenciju (nedovoljnost) nisu zasnovane na distribuciji rezultata u zdravoj populaciji, već na vrednostima PTH koje su inverzno povezane sa cirkulišućim 25(OH)D<sub>3</sub> dok god nivo 25(OH)D<sub>3</sub> iznosi 30-40 ng/ml (75 to 100 nmol/L). Pri tim vrednostima 25(OH)D<sub>3</sub>, koncentracija PTH u krvi je najniža, a apsorpcija Ca maksimalna zbog čega mnogi eksperti smatraju da su to optimalne vrednosti vitamina D u krvi (7,24,25). Kada nivo 25(OH)D<sub>3</sub> padne ispod 20 ng/ml (50 nmol/L), vrednosti PTH su povećane (sekundarni hiperparatiroidizam), intestinalna apsorpcija Ca je smanjena, a balans metabolizma kostiju poremećen. Prisutni su i simptomi koji upućuju na nedostatak vitamina D, a to su: slabost mišića, bol u kostima i sklonost ka frakturama. Vrednosti 25(OH)D<sub>3</sub> između 21 ng/ml (52 nmol/L) i 29 ng/ml (72 nmol/L) se definišu kao nedovoljne jer iako nema klasičnih znakova nedostatka vitamina D, PTH vrednosti su i dalje povećane (7,26,27). U Tabeli 1. su prikazane preporuke za optimalne vrednosti vitamina D od strane Američkog Endokrinološkog društva (Endocrine Society, ES) i Američkog Medicinskog Instituta (Institute of Medicine, IOM) (28-30). Postoji neslaganje u pogledu definisanja statusa vitamina D u krvi i najverovatnije je posledica namene preporuka različitim grupama u populaciji. Naime, IOM preporuke su bazirane na skeletnim efektima i navode da je nivo 25(OH)D<sub>3</sub> od 20 ng/ml (50 nmol/l) dovoljan da obezbedi adekvatan balans metabolizma kostiju za 97.5 % opšte populacije. ES preporuke su namenjene posebnim grupama pacijenata, kao što su oni u riziku od nedostatka vitamina D i pacijenti sa hroničnim bolestima. Takođe, navode da minimalan nivo 25(OH)D<sub>3</sub> u organizmu potreban da održi adekvatan metabolizam



kostiju zavisi od mnogih faktora i da postoje osobe kod kojih je prisutan sekundarni hiperparatiroidizam i pri vrednostima 25(OH)D3 većim od 30 ng/ml (75 nmol/l). ES u okviru svojih propuruka razmatra i nivoe 25(OH)D3 koji bi mogli biti od koristi za imuni sistem i opšte zdravlje, dok IOM smatra da čvrsti dokazi za to ne postoje. I jedne i druge preporuke se slažu da se toksični nivoi 25(OH)D3 retko dostižu i uglavnom su vezani za vrednosti koji prelaze 150 ng/ml u serumu (375 nmol/l) (31-33).

**Tabela 1.** Prikaz preporuka za definisanje statusa vitamina D u krvi

Preporuke	Nedostatak	Nedovoljno	Optimalno	Mogući toksični efekti
Endocrine Society	20 ng/ml (50 nmol/l)	21-29 ng/ml (52,5-72,5 nmol/l)	>30 ng/ml (>75 nmol/l)	>150 ng/ml (375 nmol/l)
Institute of Medicine	12 ng/ml (30 nmol/l)	12-19 ng/ml (30-47,5 nmol/l)	20-50 ng/ml (50-125 nmol/l)	*>50 ng/ml (125 nmol/l)

\*IOM napominje da nivoi 25(OH)D >50 ng/ml (125 nmol/l) mogu imati posledice po zdravlje (29).

#### 1.4. Nedostatak vitamina D (Vitamin D deficijencija)

Prolongirani nedostatak tj. deficijencija vitamina D u organizmu može dovesti do ozbiljnih posledica po zdravlje. Procenjuje se da oko milijardu ljudi u svetu ima deficijenciju ili insuficijenciju vitamina D (7). U Evropi oko 40 % populacije ima nivo 25(OH)D niži od 20 ng/ml (50 nmol/l) (8). Pored toga što je problem deficijencije i/ili insuficijencije vitaminom D prostorno rasprostranjen, takođe je zastupljen u gotovo svim starosnim grupama (6).

Prvi i najčešći razlog deficijencije je nedovoljno i/ili nepravilno izlaganje sunčevim zracima (27).

Postoje brojni faktori koji mogu uticati na sintezu vitamina D:

##### *Uzrast*

Sa starenjem dolazi do atrofije kože, koncentracija 7-dehidroholesterolola se smanjuje, kao i renalna produkcija 1,25(OH)2D3 usled smanjene aktivnosti enzima 25 hidroksivitamin D-1 alfa-hidroksilaze (34,35).

*Boja kože*

Ljudi sa tamnije pigmentisanom kožom imaju veću količinu melanina koji apsorbuje UVB fotone i na taj način smanjuje količinu UVB zraka koji dopiru do 7-dehidroholesterolu. Kako melanin predstavlja prirodnu barijeru tamnijoj koži potrebno je tri do pet puta duže izlaganje sunčevim zracima da bi se sintetisala ista količina vitamina D kao kod osoba svetlije puti (3,36).

*Kreme za sunčanje sa zaštitnim faktorom*

Kreme za sunčanje apsorbuju UVB, a delimično i UVA zrake pre nego dopru do kože. Upotreba krema i sa niskim zaštitnim faktorom (SPF 15) smanjuje sintezu holekalciferola za više od 98% (10).

*Odeća*

Odeća napravljena od većine prirodnih ili veštačkih materijala gotovo u potpunosti apsorbuje UVB zračenje. Istraživanja su pokazala da u zemljama gde postoji veliki broj sunčanih dana, a stanovništvo zbog tradicionalnih razloga pokriva delove tela, postoji visoka prevalencija vitamin D deficijencije ili insuficijencije (37).

*Doba dana, godišnje doba i geografska širina*

Ugao pod kojim UVB zraci padaju na zemljinu površinu zavisi od položaja Sunca. Oštrina ugla definiše debljinu sloja ozonskog omotača kroz koji UVB zraci moraju da prođu da bi dospeli do zemljine površine. Što je debljina sloja veća to više UVB zraka odgovornih za vitamin D produkciju biva apsorbovano na svom putu do zemljine površine (4). U toku zimskih meseci na geografskoj širini iznad 37° broj UVB fotona koji dospevaju do zemljine površine se smanjuje za 80 do 100 % jer je ugao pod kojim padaju najiskošeniji i većina fotona biva apsorbovana pri prolasku kroz ozonski omotač. Zbog toga je u zimskim mesecima sinteza vitamina D svedena na minimum. Izuzetak je pojas bliži Ekvatoru (ispod 37° geografske širine) gde se može očekivati da je sinteza vitamina D ujednačena tokom cele godine (10).

Ugao pod kojim sunčevi zraci padaju na zemljinu površinu menja se i u toku dana u smislu da je najpovoljniji u periodu između 10 i 15 h kada je moguća adekvatna sinteza vitamina D (10,37).

Drugi bitan uzrok vitamin D deficijencije je neadekvatan unos namirnica bogatih vitaminom D. Prirodni izvori namirnica bogatih vitaminom D su veoma ograničeni (masne ribe, jaja, neke vrste gljiva). Da bi se nadomestio ovaj nedostatak u mnogim državama određene namirnice kao što su mleko, sir, margarin, sok, cerealije obogaćuju se vitamin D suplementima (D2 ili D3) (27,38,39). U Srbiji postupak obogaćivanja namirnica vitaminom D nije zakonom obavezan, a pojedinačni vitamin D suplementi su retki na tržištu, zbog čega postoji visoka stopa vitamin D deficijencije (40).

Pojedina medicinska stanja kao što su malapsorpcija, hronična bubrežna insuficijencija, upotreba antikonvulzivne terapije i gojaznost takođe mogu dovesti do vitamin D deficijencije (4, 27).

Istraživanja su ukazala na inverznu povezanost gojaznosti i vitamin D statusa, ali mehanizmi koji su za to odgovorni nisu u potpunosti razjašnjeni. U literaturi su opisana četiri moguća mehanizma. Jedan od njih je smanjeno izlaganje sunčevim zracima usled negovanja životnog stila koji podrazumeva smanjenu pokretljivost i nizak stepen fizičke aktivnosti. Drugi mehanizam podrazumeva poremećaj obe hidroksilacije usled snižene ekspresije enzima kod gojaznih osoba. Treći i moguće najverovatniji mehanizam koji uzrokuje nizak vitamin D status kod gojaznih osoba je njegovo preterano skladištenje u masnom tkivu. Lipofilna priroda vitamina D dovodi do toga da se nakon prve hidroksilacije u jetri veća količina 25(OH)D3 metabolita skladišti u masnom tkivu i slabije se oslobađa što smanjuje njegovu bioraspodivnost u organizmu. Četvrti predloženi mehanizam se odnosi volumetrijsku diluciju. Naime, Drincic i sar. su pomoću matematičkog modela pokazali da kada se prilagodi veličini tela razlika u koncentraciji vitamina D između normalno uhranjenih i gojaznih ispitanika se gubi. Ove činjenice treba uzeti u obzir prilikom tretmana deficijencije vitaminom D jer ista doza ne može biti primenjena kod svih, već se kod gojaznih osoba mora prilagoditi njihovoj telesnoj masi (TM) (41,42).

## **1.5. Prevencija i tretman vitamin D deficijencije**

Promocija zdravih stilova života, održavanje zdrave TT, dovoljno i adekvatno izlaganje sunčevim zracima, konzumiranje hrane bogate vitaminom D mogu biti korisne strategije kojima se može popraviti vitamin D status u populaciji. Na individualnom nivou najefikasniji način tretmana vitamin D deficijencije je upotreba suplemenata.

Suplementi koji su prisutni na tržištu sadrže vitamin D2 ili D3 kao aktivnu supstancu. Iako oba metabolita prolaze kroz identičan proces hidroksilacije, smatra se da nisu podjednako efikasni u postizanju ciljnih koncentracija 25(OH)D3 u serumu. Meta-analiza sprovedena sa ciljem da uporedi efikasnost suplementacije D2 i D3 vitaminom pokazala je da je D3 efikasniji u podizanju serumskog nivoa 25(OH)D3. Oba metabolita imaju povoljan terapijski indeks i mogu se primenjivati u različitim doznim režimima bez straha od toksičnih efekata (43).

U Tabeli 2. prikazane su preporučene dnevne doze vitamina D, izražene u internacionalnim jedinicama (IJ), koje je potrebno unositi u organizam u cilju prevencije vitamin D deficijencije.

**Tabela 2.** Preporučeni dnevni unos vitamina D za prevenciju deficijencije

Uzrast (godine)	Doze po preporuci ES*	Doze po preporuci IOM
0-1	400 IJ/dnevno	400 IJ/dnevno
1-18	600 IJ/dnevno	600 IJ/dnevno
19-50	600 IJ/dnevno	600 IJ/dnevno
50-70	600 IJ/dnevno	600 IJ/dnevno
>70	800 IJ/dnevno	800 IJ/dnevno

\* Gojazni, kao i pacijenti koji koriste antikonvulzivnu, glukokortikoidnu ili drugu terapiju koja utiče na metabolizam vitamina D zahtevaju dva do tri puta veće doze kako bi zadovoljili dnevne potrebe za vitaminom D (28). IJ-internacionalna jedinica

Tretman vitamin D deficijencije suplementacijom podrazumeva:

1. Nadoknadu deficita i postizanje optimalnog nivoa vitamina D
2. Održavanje postignutog optimalnog nivoa.

Smernice ES preporučuju za odrasle upotrebu vitamina D2 ili D3 u dozi od 50 000 IJ nedeljno u trajanju od 8 nedelja kako bi korigovali vitamin D deficijenciju i dnevne doze održavanja od 1500 do 2000 IJ kako bi zadržali nivo 25(OH)D3 iznad 30 ng/ml (75 nmol/l). Gojazni pacijenti kao i oni sa malapsorpcionim sindromima ili terapijom koja utiče na metabolizam vitamina D zahtevaju dva do tri puta veće doze u cilju prevencije i lečenja vitamin D deficijencije (6000-10 000 IJ/dnevno za tretman deficijencije, 3000-6000 IJ/dnevno doze održavanja). Podnošljiva gornja granica dozvoljenog dnevnog unosa ne bi trebalo da bude veća od 10 000 IJ (28).

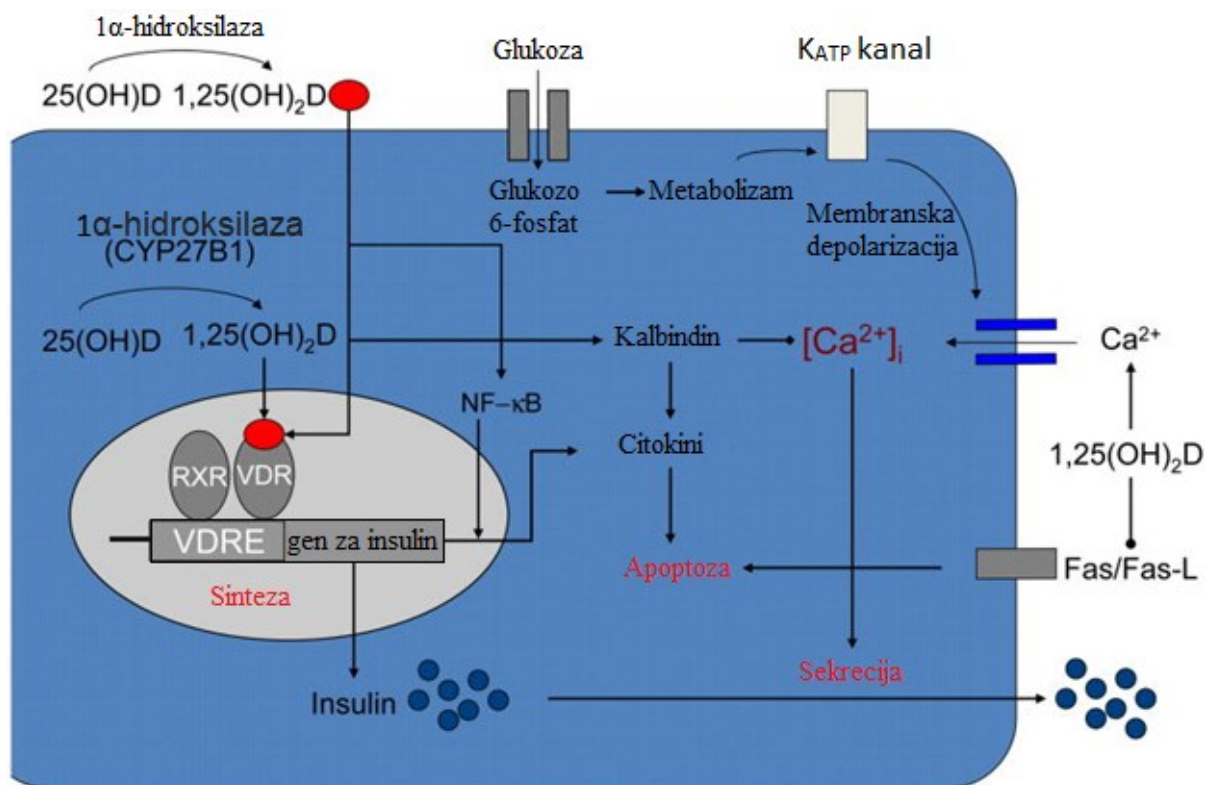
Smatra se da deficit vitamina D pored dobro znanih skeletnih efekata može imati i posledice po celokupno zdravlje pacijenta. Razlog za to je otkriće VDR kao i enzima koji učestvuju u završnoj hidroksilaciji u gotovo svim tkivima u organizmu što je nedostatak vitamina D povezalo sa nastankom mnogih bolesti kao što su depresija, kardiovaskularne, maligne, plućne, autoimune bolesti, dijabetes melitus tip 2 (DMT2) kao i sa povećanom stopom mortaliteta (7,44).

## **1.6. Vitamin D deficijencija i DMT2**

Vitamin D deficijencija i DMT2 su poprimili razmere pandemije. Procenjuje se da će ukupan broj obolelih od DMT2 2030. godine iznositi 366 miliona (45). Možda ne slučajno, vitamin D deficijencija i DMT2 dele iste faktore rizika u pogledu etničke pripadnosti, starosti, načina života. Rezultati nekoliko opservacionih studija su pokazali da bi nedostatak vitamina D mogao igrati bitnu ulogu u patogenezi DMT2. Podaci jedne od najvećih studija preseka Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) u kojoj je učestvovalo 6228 ispitanika, govore da postoji inverzna povezanost serumskog nivoa 25(OH)D sa vrednostima glikemije i prevalencijom DMT2 u različitim kohortama (46). Eksperimentalne studije nisu u potpunosti uspele da dokažu da suplementacija vitaminom D može smanjiti rizik od nastajanja DMT2, ali su ukazale na moguće mehanizme koji su ključni u patogenezi DMT2, a na koje vitamin D može imati uticaj.

### **1.6.1. Vitamin D deficijencija i insulinska sekrecija**

Beta ( $\beta$ ) ćelije pankreasa karakteriše prisustvo i ekspresija VDR kao i prisustvo enzima 25 hidroksivitamin D-1 alfa-hidroksilaze. In vitro i in vivo studije su pokazale da vitamin D igra bitnu ulogu u očuvanju funkcije ovih ćelija. Dokazano je da nekoliko godina nakon početka bolesti kod pacijenata obolelih od DMT2 postoji još uvek dovoljan broj  $\beta$  ćelija ali je njihov odgovor na stimulaciju glukozom oštećen. Vitamin D bi mogao imati pozitivan uticaj izazivajući povećanje ne samo sinteze, već i sekrecije insulina. Smatra se da je vitamin D jedini faktor koji utiče na insulinsku sekreciju stimulisanu glukozom dok na bazalno lučenje insulina nema uticaja (47-49). Predloženi mehanizmi pomoću kojih vitamin D ostvaruje svoje dejstvo na insulinsku sekreciju dele se na direktne, indirektne i ostale (Slika 3).



**Slika 3.** Vitamin D i insulinska sekrecija.

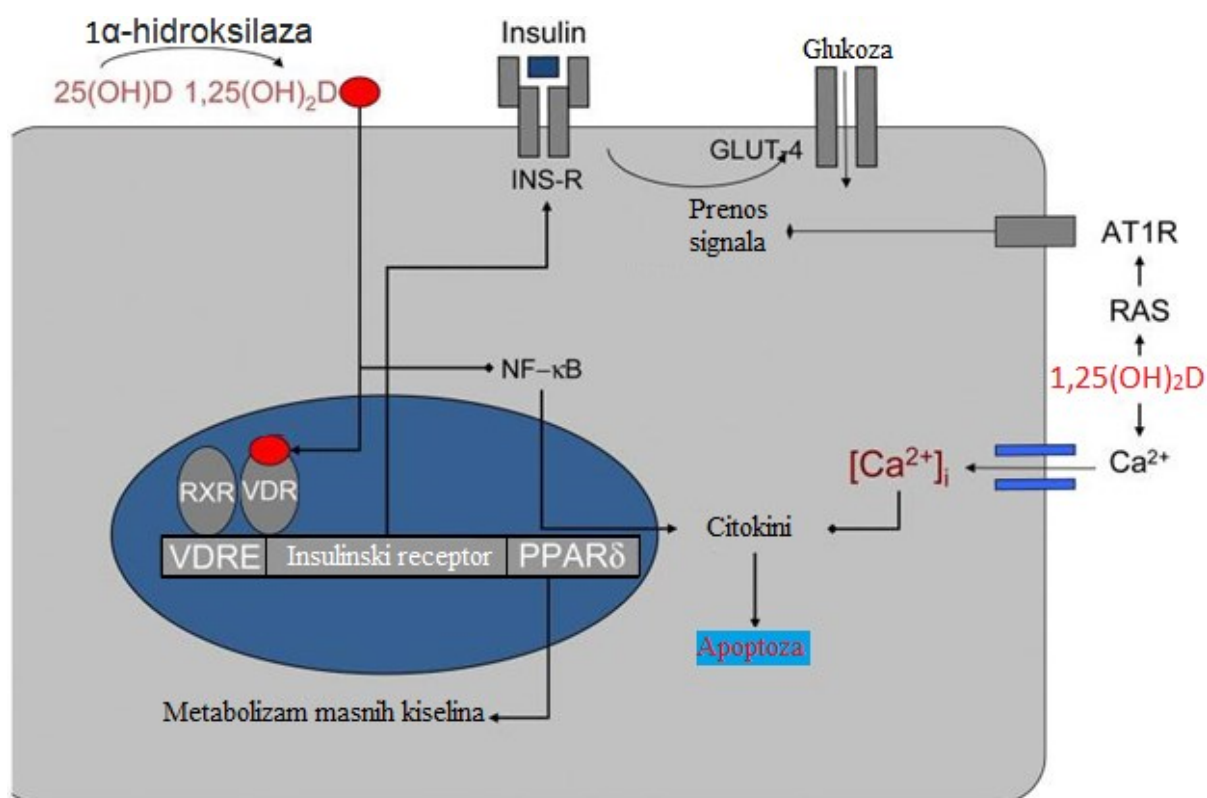
Preuzeto iz Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43(1):205-32 (50).

Direktni uticaj se ogleda u aktivaciji transkripcije gena za insulin. Pored direktong, vitamin D ostvaruje i posredni uticaj regulisanjem koncentracije intracelularnog i ekstracelularnog Ca čime se postiže adekvatan influks Ca kroz ćelijsku membranu. Pod dejstvom vitamina D sintetiše se kalbindin, Ca-vezujući protein koji se nalazi u citosolu β ćelija pankreasa i reguliše ove procese. Ostali mehanizmi podrazumevaju uticaj vitamina D na preživljavanje β ćelija. Inaktivacijom nuklearnog transkripcionog faktora kapa B (NF-κB) vitamin D direktno inhibira sintezu proinflamatornih citokina, a nishodnom regulacijom FAS liganda trnsmembranskog proteina vitamin D sprečava apoptozu β ćelija pankreasa (50,51).

### 1.6.2. Vitamin D deficijencija i insulinska rezistencija

Deficit vitmina D može dovesti do poremećaja tolerancije na glukozu. U perifernim ciljnim tkivima (skeletalni mišići, masno tkivo, jetra) 1,25(OH)2D3 stimuliše ekspresiju insulinskih receptora što direktno dovodi do poboljšane osetljivosti na insulin. Vezivanjem za VDR u ćelijama ovih tkiva 1,25(OH)2D3 stimuliše transkripciju gena za insulinske receptore povećavajući na taj način njihov broj a pritom ne smanjujući njihov afinitet. U direktne

mehanizme povećanja osetljivosti ćelija na insulin spada i aktivacija transkripcionog faktora (peroksizomnim proliferatorom aktiviranog receptora delta) koji reguliše metabolizam masnih kiselina u skeletnim mišićima i masnom tkivu. Indirektni mehanizmi se ostvaruju putem uticaja na koncentraciju  $Ca^{2+}$  van i u samim ćelijama i putem uticaja na renin-angiotenzin-aldosteron sistem (RAAS). Naime, za nesmetano odvijanje insulinom-posredovanih intracelularnih procesa potrebna je adekvatna koncentracija intracelularnog  $Ca^{2+}$  kao i adekvatan transmembranski influks. Čak i najmanje promene koncentracije intracelularnog  $Ca^{2+}$  mogu doprineti insulinskoj rezistenciji (IR). Angiotenzin II inhibira dejstvo insulina u skeletnim mišićima promovišući na taj način IR. Povoljan indirektni uticaj vitamina D se ogleda u supresiji sinteze renina (Slika 4) (47,50,52).



**Slika 4.** Vitamin D i IR.

Preuzeto iz: Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43(1): 205-32 (50).

### 1.6.3. Vitamin D deficijencija i inflamacija

Nekoliko opservacionih studija je pokazalo da je nedostatak vitamina D u krvi povezan sa povećanom koncentracijom markera sistemske inflamacije (52). Kod DMT2 sistemska inflamacija putem proinflamatornih citokina igra bitnu ulogu primarno u nastanku IR, mada može dovesti i do oštećenja  $\beta$  ćelija pankreasa. Vitamin D preko već pomenutih mehanizama blokira sintezu proinflamatornih citokina i njima posredovanu apoptozu  $\beta$  ćelija. Gotovo sve imune ćelije (antigen prezentujuće ćelije, makrofagi, dendritične ćelije) ispoljavaju VDR receptor. Njegovom aktivacijom vitamin D vrši inhibiciju diferencijacije dendritičnih ćelija i proliferacije T limfocita, zatim inhibiciju stvaranja penastih ćelija i preuzimanja holesterola od strane makrofaga ostvarujući na taj način bitnu ulogu u urođenom i stečenom imunitetu (51-53).

## 1.7. Efekat suplementacije vitaminom D na glikoregulaciju kod DMT2

Imajući u vidu pomenute efekte na IR i sekreciju, suplementacija vitaminom D bi mogla dovesti do poboljšanja glikoregulacije. Međutim, i pored velikih očekivanja brojna istraživanja koja su kao krajnji ishod pratila uticaj vitamina D na parametre metaboličke kontrole nisu još uvek tačno utvrdila ulogu vitamina D u zbrinjavanju ove bolesti i njenih komplikacija. Rezultati su sumirani u meta-analizama.

George i sar. su 2012. godine sproveli meta-analizu koja je analizirala rezultate 15 randomizovanih kontrolisanih istraživanja sprovedenih među pacijentima sa intolerancijom na glukozu i sa DMT2. Zabeleženo je statistički značajno poboljšanje vrednosti glikemije našte i insulinske sezivnosti u odnosu na grupu koja je primala placebo (54). Dve godine kasnije Seida i sar. su sproveli meta-analizu koja je uključila 35 randomizovanih kontrolisanih istraživanja i 43 407 pacijenata sa predijabetesom, DMT2 i bez potvrđene dijagnoze dijabetesa. Razlike u vrednostima glikemije našte, insulinske senzitivnosti i glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) nisu bile statistički značajne (55). U 2017. godini objavljene su tri meta-analize sa sličnim rezultatima (56-58). U prvoj, suplementacija vitaminom D je značajno snizila vrednosti HbA1c, dok isti efekat nije zapažen kada su u pitanju vrednosti glikemije našte. Kada su analizom obuhvaćeni samo pacijenti čiji je početni nivo  $25(\text{OH})\text{D}_3 < 20$  ng/ml vrednosti glikemije našte i HbA1c su bile značajno snižene nakon suplementacije vitaminom D (56). Druga meta-analiza koju su sproveli Mirhosseini i sar. je nakon analiziranja podataka dobijenih iz 24 klinička istraživanja pokazala statistički značajno sniženje glikemije našte, HbA1c i IR u odnosu na placebo (57). U trećoj meta-analizi Krul-



Poel i sar. nisu uočili statistički značajne razlike u vrednostima glikemije našte i HbA1 u odnosu na placebo grupu (58). U 2019. godini objavljena je i poslednja meta-analiza. Obuhvatila je 747 pacijenata koji su dobijali vitamin D i 627 placebo kontrola. Rezultati su pokazali da vitamin D povoljno deluje na vrednosti insulina, HbA1c i IR, dok nije primećen značajan efekat na vrednosti glikemije našte (59). Autori ove meta-analize preporučuju upotrebu vitamina D uz standardne terapijske režime kod pacijenata koji se leče od DMT2.

Sve navedene rezultate potrebno je interpretirati sa oprezom. Većina istraživanja je obuhvatila mali uzorak i vrlo heterogene grupe ispitanika u pogledu etničke pripadnosti, pola, starosti, životnih navika, indeksa telesne mase (ITM odnosno engl. body mass index-BMI) i poremećenog metabolizma glukoze. Takođe, u većini istraživanja korišćene su po mišljenju stručnjaka suboptimalne doze vitamina D sa nedovoljno dugim periodom suplementacije što pored različitih načina administracije nije dovelo do postizanja optimalnog statusa vitamina D u krvi. Ova izražena heterogenost u protokolima sprovedenih istraživanja može biti jedan od bitnih faktora zašto još uvek ne postoje jasne preporuke za upotrebu vitamina D u lečenju pacijenata sa DMT2.

## 1.8. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja stanje koje je prouzrokovano povećanim stvaranjem slobodnih radikala (prooksidanasa) i nemogućnošću ćelijskih antioksidativnih mehanizama da ih neutrališu. Slobodni radikali nastaju u organizmu u toku normalnih metaboličkih procesa i neophodni su za odvijanje mnogih bioloških procesa. Pored fiziološke, u nekontrolisanim uslovima mogu imati i patološku ulogu u organizmu. Njihovo povećano stvaranje i/ili neadekvatno uklanjanje dovodi do mnogih štetnih efekata (60).

Slobodni radikali su atomi, atomske grupe ili molekuli koji u poslednjoj orbitali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Težnja da spare nesparene elektrone predstavlja uzrok njihove nestabilnosti i izuzetne reaktivnosti (61). U reakciji sa supstratom, slobodni radikal dobija elektron, dok supstrat gubi elektron i postaje sekundarni slobodni radikal. Na taj način slobodni radikali mogu dovesti do oštećenja esencijalnih makromolekula (lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina) stvarajući lančane reakcije u kojima dolazi do produkcije novih slobodnih radikala i oštećenja novih makromolekula (62).

Uopšteno govoreći, ovi visoko reaktivni (elektrofilni) molekuli se dele na reaktivne vrste kiseonika (RVK) i reaktivne vrste azota (RVN) u zavisnosti od aktivnog centra. U okviru obe grupe postoje slobodni radikali i neradikalni metaboliti. U slobodne radikale RVK spadaju superoksid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ), peroksil ( $\bullet\text{RO}_2$ ), hidroperoksil ( $\bullet\text{HRO}_2^-$ ), a u neradikalne metabolite vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hipohlorasta kiselina ( $\text{HOCl}$ ). Od RVN u slobodne radikale se ubrajaju azot monoksid ( $\bullet\text{NO}$ ) i azot dioksid ( $\bullet\text{NO}_2^-$ ), a u neradikale peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), nitrozni oksid ( $\text{HNO}_2$ ) i alkil peroksinitrit ( $\text{RONOO}$ ) (60).

Superoksidni anjon,  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  predstavljaju RVK u užem smislu reči i u literaturi su zajedno sa  $\bullet\text{NO}$  najčešće obrađivani (60,61). Reakcije u kojima ovi radikali nastaju dele se na enzimske i neenzimske. Najznačajniji izvor produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$  je proces oksidativne fosforilacije tj. ćelijskog disanja u mitohondrijama. U toku ovog procesa  $\bullet\text{O}_2^-$  nastaje redukcijom jednim elektronom molekuskog kiseonika neenzimskim putem. Osim u toku ćelijskog disanja,  $\bullet\text{O}_2^-$  se stvara pod dejstvom enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, ksantin oksidaze i peroksidaze (63). NADPH oksidaza se nalazi u polimorfonuklearnim leukocitima, monocitima i fagocitima gde u toku fagocitoze oslobađa velike količine  $\bullet\text{O}_2^-$  koje imaju baktericidno dejstvo. U fiziološkim uslovima  $\bullet\text{O}_2^-$  ne izaziva toksične efekte, jer organizam ima razvijenu antioksidativnu zaštitu, tj. enzime koji neutrališu slobodne radikale. Tako se, zahvaljujući enzimu superoksid dismutazi (SOD),  $\bullet\text{O}_2^-$  transformiše u manje aktivan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (64).

$\text{H}_2\text{O}_2$  nije pravi radikal, ali lako difunduje kroz plazma membrane i može dovesti do oštećenja ćelije i pri malim koncentracijama. Sa  $\bullet\text{O}_2^-$ , u prisustvu dvovalentnog gvožđa, u Fentonovoj reakciji formira  $\bullet\text{OH}$  koji je izuzetno reaktivan. Glavni antioksidativni enzim koji neutrališe  $\text{H}_2\text{O}_2$  je katalaza koja ga razlaže do vode i kiseonika (65,66). Pod dejstvom enzima mijeloperoksidaze (MPO) koji je prisutan u azurofilnim granulocitima mnogih podvrsta leukocita, dejstvo  $\text{H}_2\text{O}_2$  se proširuje. MPO u prisustvu hloridnog jona katalizuje konverziju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{HOCl}$  koja je jak oksidans i svojim baktericidnim dejstvom pomaže u borbi protiv patogena (64,65).

Visoko reaktivni  $\bullet\text{OH}$  spada u najmoćnije radikale. Reaguje gotovo sa svakim biološkim molekulom koji se nađe u njegovoj blizini. Zbog izrazite reaktivnosti, poluživot mu je kratak gotovo je nemoguće dokazati njegovo prisustvo osim preko specifičnih produkata reakcije (67).

NO je mali, veoma reaktivan molekul koji nastaje na različitim lokacijama u organizmu. Najveći izvor endogenog NO je enzimski reakcija konverzije aminokiseline L-arginin u L-citrulin. Enzim koji katalizuje ovu reakciju pripada porodici NO sintaza. Postoje tri izoforme ovog enzima, endotelna (eNOS) prisutna u ćelijama endotela i odgovorna za stalnu produkciju NO u vaskulaturi, neuronalna (nNOS) prisutna u nervnom tkivu, endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama i inducibilna (iNOS) prisutna u makrofagima i aktivira je prisustvo proinflamatornih citokina (66,68,69). NO je ključni faktor u mnogim biološkim reakcijama. Jedna od veoma bitnih uloga jeste regulacija vaskulotornog tonusa i protoka krvi. U glatkim mišićnim ćelijama NO aktivira solubilnu guanilat ciklazu i protein kinazu dovodeći do vazodilatacije. Takođe je bitan za adheziju leukocita, agregaciju trombocita, kontrolu potrošnje kiseonika u mitohondrijama (70).

Osim endogenih izvora (inflamacija, ishemija, infekcija, mentalni stres, prekomerna fizička aktivnost i dr.), RVK i RVN mogu nastati i usled dejstva egzogenih faktora kao što su zračenje, duvanski dim, teški metali, alkohol, dimljeno meso, neke vrste lekova (63).

## **1.9. Markeri oksidativnog stresa**

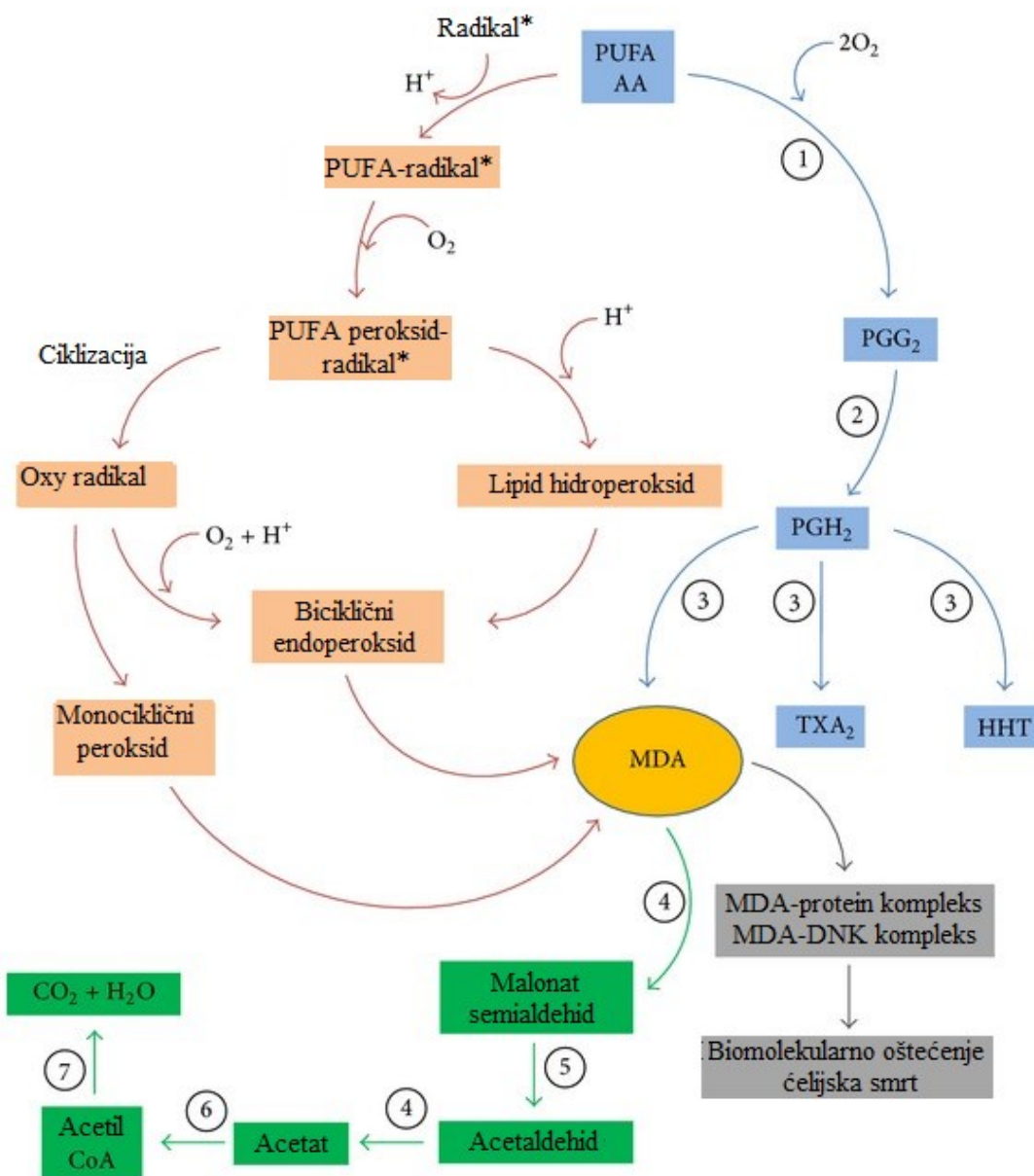
Povišena produkcija RVK i RVN u oksidativnom stresu dovodi do oštećenja lipida, proteina, lipoproteina, dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Oštećenje ovih biomolekula dovodi do dezintegracije ćelijske membrane, promene ćelijske morfologije i funkcije i na kraju do smrti ćelije. U nekim situacijama proces indukovane smrti ćelija može biti koristan kao na pr. kod pripreme porođajnog kanala za predstojeći porođaj. Međutim, obilje podataka u literaturi ukazuje da su posledice delovanja oksidativnog stresa sastavni deo mehanizama nastanka mnogih hroničnih oboljenja. U tom smislu bi bilo korisno izmeriti stepen prisutnosti oksidativnog stresa. Direktno merenje količine stvorenih RVK i RVN često nije moguće zbog njihove izrazite reaktivnosti i kratkog poluživota. Zato se stepen prisutnosti oksidativnog stresa najčešće određuje merenjem produkata nastalih oksidativnim oštećenjem ćelijskih struktura (lipida, proteina, DNK), merenjem enzima antioksidativne zaštite kao i enzima koji učestvuju u produkciji RVK i RVN (61,67,71).

### 1.9.1. Oksidativno oštećenje lipida

Proces oksidativnog oštećenja lipida naziva se lipidna peroksidacija. Nastaje usled delovanja slobodnih radikala na molekule fosfolipida, holesterola, holesterolskih estara, triglicerida (TG), masnih kiselina koji predstavljaju glavne lipide prisutne *in vivo*. Oksidativna modifikacija može nastati enzimskim i neenzimskim mehanizmom. Lipooksigenaza, ciklooksigenaza i citohrom c su najbitniji enzimi koji učestvuju u oksidaciji masnih kiselina *in vivo*. Neenzimski put podrazumeva delovanje slobodnih radikala i neradikala na nezasićene lipide. Svaki od ovih mehanizama daje specifične produkte oksidacije i zahtevaće tačno određene antioksidante u cilju neutralizacije (72).

Polinezasićene masne kiseline predstavljaju najčešći supstrat delovanja slobodnih radikala. Proces lipidne peroksidacije protiče kroz tri faze. Prva je faza inicijacije koja započinje delovanjem kiseoničnog slobodnog radikala (najčešće  $\bullet\text{OH}$ ) pri čemu dolazi do apstrahovanja atoma vodonika i generisanja lipidnog radikala ( $\text{L}\bullet$ ). U fazi propagacije lipidni radikal ( $\text{L}\bullet$ ) brzo reaguje sa molekularnim kiseonikom i formira lipidni peroksil radikal ( $\text{LOO}\bullet$ ). Peroksil radikal dalje nastavlja lančanu reakciju apsorbujući vodonik iz drugog molekula lipida i stvarajući na taj način novi lipidni radikal ( $\text{L}\bullet$ ) i lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ). U fazi terminacije antioksidansi poput vitamina E doniraju atom vodonika lipidnom peroksil radikal  $\text{LOO}\bullet$  pri čemu dolazi do stvaranja sekundarnih neradikalnih molekula. Jednom započeti proces lipidne peroksidacije se nastavlja sve do stvaranja završnih produkata koji nastaju u fazi terminacije (66,73).

U toku lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina nastaje širok spektar produkata od kojih je malondialdehid (MDA) najmutageniji, a 4-hidroksialkenali najtoksičniji. Za razliku od slobodnih radikala koji dovode do oštećenja biomolekula u okruženju od nekoliko nanometara aldehidi nastali u toku lipidne peroksidacije lako difunduju kroz membranu ćelije dovodeći do oštećenja proteina u citoplazmi, jedru, koji su udaljeni od mesta njihovog nastanka (74). Merenje koncentracije MDA kao produkta lipidne peroksidacije koristi se često za procenu intenziteta oštećenja posredovanog slobodnim radikalima. Smatra se da MDA predstavlja bitan uzročni faktor u nastanku procesa ateroskleroze, starenja, maligniteta, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i Alchajmerove bolesti (73,74). Slika 5. prikazuje metabolizam i proces nastanka MDA u procesu lipidne peroksidacije.



**Slika 5.** Prikaz metabolizma i stvaranja MDA.

Preuzeto iz: Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 360438 (74).

### 1.9.2. Oksidativno oštećenje proteina

Proteini takođe mogu biti meta delovanja slobodnih radikala s obzirom na veliku prisutnost u plazmi i ćelijama većine tkiva. Njihova oksidativna modifikacija se može odigrati direktnim delovanjem RKV ili indirektno delovanjem nusprodukata oksidativnog oštećenja drugih molekula. Prilikom njihove oksidacije dolazi do fragmentacije peptidnog

lanca i promena električnog naboja, međusobnog povezivanja proteina i oksidacije specifičnih aminokiselina. Ostaci cisteina i metionina u proteinima su posebno osetljivi na oksidaciju što dovodi do konformacionih promena proteina i njihove degradacije. Na taj način proteini gube funkciju enzima, receptora i transportnih proteina (64,75). Delovanjem RVK na proteine dolazi do stvaranja širokog spektra proizvoda, od onih modifikovanih manje aktivnih do potpuno denaturisanih neaktivnih (76). Produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) takođe predstavljaju bitan marker oksidativnog stresa i inflamacije. Imaju bitnu ulogu u nastanku dijabetesnih komplikacija (77).

### **1.9.3. Oksidativno oštećenje DNK**

U reakciji RKV i DNK dolazi do modifikacije DNK na nekoliko načina koji uključuju degradaciju baza, odvajanje ili kidanje lanca, interakciju baza unutar jedne ili dve spirale, translokacije, delecije, mutacije. Najpoznatiji produkt oksidativnog oštećenja DNK i ujedno biomarker oksidativnog stresa je 8-hidroksideoksiguanozin. Povećanje koncentracije ovog produkta povezuje se sa kancerogenezom, starenjem, neurodegenerativnim, kardiovaskularnim i autoimunim bolestima (64).

## **1.10. Antioksidativna zaštita**

Kao odgovor na toksično dejstvo reaktivnih vrsta u ljudskom organizmu je u toku evolucije razvijen sistem antioksidativne zaštite. Sistem čine mnoge komponente koje se nalaze raspoređene u intra i ekstracelularnom prostoru. Izostanak neke od komponenti može dovesti do rušenja celokupnog sistema antioksidativne zaštite. Antioksidansima se smatraju supstance koje imaju sposobnost odlaganja ili sprečavanja oksidacije supstrata (71,76). Osnovni mehanizmi njihovog delovanja podrazumevaju:

1. sprečavanje nastanka reaktivnih vrsta tj. preventivno delovanje,
2. neutralisanje dejstva nastalih reaktivnih vrsta,
3. popravke i otklanjanje štetnih posledica delovanja reaktivnih vrsta

Prema mestu nastanka delimo ih na endogene (sintetisane unutar organizma) i egzogene koje u organizam unosimo u vidu hrane ili suplemenata. Endogeni antioksidativni sistem čini mreža enzimskih i neenzimskih antioksidanasa koji se nalaze u citoplazmi i različitim organelama (78-80). Glavni enzimi antioksidativne zaštite u organizmu su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza (GPx) (67).

### 1.10.1. Enzimski antioksidansi

#### *Superoksid dizmutaza*

Ovaj enzim svojim katalitičkim delovanjem štiti organizam od štetnog delovanja superoksidnog anjona vršeći njegovu dizmutazu do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i molekularnog kiseonika. Pripada familji metaloenzima, a zavisno od kofaktora metalnih jona (bakar, cink i mangan) razlikujemo tri izoforme koje su različito raspoređene u organizmu. Mangan SOD se nalazi u mitohondrijama, bakar-cink SOD u citosolu, a treća izoforma koja sadrži takođe bakar-cink nalazi se u ekstracelularnom prostoru (67).

#### *Katalaza*

Ovaj polipeptid je prisutan kod svih organizama koji koriste kiseonik. U prisustvu kofaktora (gvožđa ili mangana) katalizuje redukciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do vode i molekularnog kiseonika, završavajući na taj način proces detoksikacije započet od strane SOD. Spada u veoma efikasne enzime jer u jednoj sekundi može da neutrališe nekoliko miliona molekula H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Naročito je efikasan kada je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prisutan u većim koncentracijama, dok u slučaju da su koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> niže važniju ulogu ima GPx (81).

#### *Glutation peroksidaza*

Glutation peroksidaza je intracelularni enzim koji sadrži selen umesto sumpora u cisteinu što povećava njegovu efikasnost. Odgovoran je za redukciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i lipidnih peroksida do vode i odgovarajućeg alkohola (67). Reakcije se odigravaju uglavnom u citosolu i mitohondrijama. Koristi glutation (GSH) kao donor elektrona. Glutation reduktaza je enzim zadužen za obnavljanje redukovano GSH koji je bitan intracelularni antioksidans. Za redukciju jednog mola oksidovanog GSH potrebno je učešće jednog mola NADPH (82).

### 1.10.2. Neenzimski antioksidansi

Neenzimski antioksidansi predstavljaju drugu liniju odbrane od reaktivnih vrsta i imaju sposobnost brze inaktivacije stvorenih slobodnih radikala i oksidanasa. Tu spadaju niskomolekularna jedinjenja kao što su minerali, vitamini, karotenoidi, kofaktori, GSH i polifenoli.

Askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) i  $\beta$ -karoten spadaju u najvažnije neenzimske antioksidanse koji se ne mogu sintetisati u organizmu i unos zavisi od ishrane (84). Vitamin C je veoma potentan i efektivan hidrofilni antioksidans. Donira

elektron (oksiduje se) i na taj način štiti druge molekule od oksidacije. Takođe, vrši regeneraciju oksidovanog vitamina E. Podizanjem nivoa intracelularnog GSH štiti proteinsku grupu tiola od oksidacije. Liposolubilni vitamin E smešten je u unutrašnjem, hidrofobnom delu ćelijske membrane i predstavlja njenu glavnu odbranu od oksidativnog oštećenja. Reaguje sa lipidnim radikalima nastalim tokom lipidne peroksidacije dovodeći do terminacije lančanih reakcija. Iako je efikasan antioksidans, u interakciji sa oksidansima se redukuje pri čemu nastaje vitamin E radikal, a za njegovu redukciju zadužen je vitamin C (76,83). Karotenoidi ( $\beta$ -karoten) su liposolubilni antioksidansi čija antioksidativna svojstva potiču od prisustva konjugovanih dvostrukih veza što im omogućava vezivanje slobodnih radikala. Zahvaljujući svojoj liposolubilnoj prirodi i lokalizaciji štite ćeliju od posledica lipidne peroksidacije.  $\beta$ -karoten inhibira oksidacijom indukovanu aktivaciju transkripcionog faktora (NF-kB) i proinflamatornih citokina (interleukin 6, tumor nekrotični faktor  $\alpha$ ). Takođe, ima i antikancerogeno delovanje indukujući apoptozu ćelija (64,67).

Glutation pripada grupi tiola i predstavlja glavni intracelularni antioksidans. U velikom broju prisutan je u citosolu, mitohondrijama i nukleusu. Može se naći u dve forme, u redukovanoj formi (GSH) i oksidovanoj formi u vidu glutacion disulfida. Odnos redukovane i oksidovane forme predstavlja pouzdan pokazatelj oksidativnog stresa u organizmu. Svoje antioksidativno dejstvo GSH ispoljava na više načina. U prisustvu GPx, GSH donira elektron vršeći detoksikaciju  $H_2O_2$  i lipidnih peroksida. Pored GPx, GSH služi i kao kofaktor transferazama. Takođe, zadužen je za obnavljanje vitamina C i E aktivne forme (64).

## **1.11. Oksidativni stres i DMT2**

Obilje podataka u literaturi govori u prilog tome da oksidativni stres igra bitnu ulogu u nastanku DMT2 i njegovoj daljoj progresiji i razvoju komplikacija. Oksidativni stres je kod DMT2 posledica kako povećanog stvaranja slobodnih radikala tako i snižene antioksidativne zaštite (66,76).

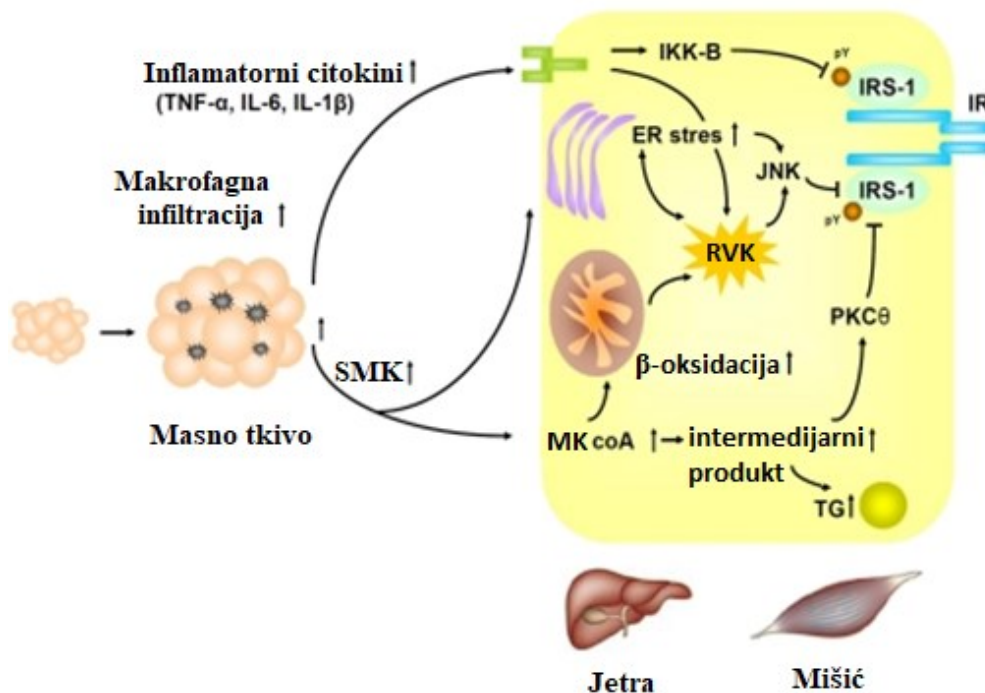
### **1.11.1. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi DMT2**

DMT2 je progresivni metabolički poremećaj koji započinje razvojem IR a završava se propadanjem pankreatičnih  $\beta$  ćelija. U većini slučajeva IR definisana kao oslabljen odgovor ćelija u masnom tkivu, jetri i skeletnim mišićima na dejstvo insulina, pojavljuje se mnogo godina pre razvoja hiperglikemije. Smanjena osetljivost na insulin u skeletnim mišićima



dovodi do smanjenog preuzimanja glukoze. Takođe, povećano otpuštanje glukoze iz jetre je posledica nedostatka insulinom suprimirane glukoneogeneze i glikogenolize. U masnom tkivu IR vodi ka povećanoj lipolizi i povećanom oslobađanju slobodnih masnih kiselina (SMK) u cirkulaciju. Hronično povećanje koncentracije SMK izaziva smrt  $\beta$  ćelija pankreasa. U cilju prevazilaženja periferne IR dolazi do povećanja mase  $\beta$  ćelija kao i do povećanog lučenja insulina što dovodi do hiperinsulinemije. Oksidativni stres je jedan od faktora koji ima značajnu ulogu u nastanku IR, disfunkcije  $\beta$  ćelija i DMT2. Tačni mehanizmi nisu u potpunosti još uvek rasvetljeni mada postoji nekoliko teorija koje bi mogle objasniti navedenu tvrdnju (76,85).

Vezivanje insulina za insulinski receptor dovodi do autofosforilacije  $\beta$  subjedinice receptora i aktivacije insulin receptorskih supstrata. To pokreće niz kaskadnih reakcija koje posledično dovode do transporta glukoze u ćelije i mitogenog delovanja insulina. Faktori koji dovode do poremećaja transmisije signala prilikom delovanja insulina i nastanka IR su brojni. Prekomeran unos hrane bogate ugljenim hidratima i zasićenim masnim kiselinama je samo jedan od njih (86). Intermedijerni produkti SMK aktiviraju jednu od kinaza u ciljnim ćelijama koja dovodi do fosforilacije receptorskih proteinskih supstrata. Na taj način dolazi do slabljenja insulinskog signalnog puta. Alternativna hipoteza koja povezuje nastanak IR sa prekomernim unosom hrane bogate ugljenim hidratima i zasićenim masnim kiselinama zasniva se povećanoj produkciji RKV u mitohondrijama. Iako RVK i RVN prisutne u određenoj meri doprinose pravilnom funkcionisanju insulina, njihovo nekontrolisano stvaranja dovodi do poremećaja u njegovom delovanju i promovišu nastanak IR. Ulaskom hranljive materije u metaboličke puteve povećava se brzina protoka elektrona i stvara se višak reduktivnih ekvivalenata. To dovodi do „curenja“ elektrona i povećanog stvaranja superoksidnog anjona i  $H_2O_2$  u mitohondrijama (85). Nastale RVK dovode do smanjene aktivacije insulinskih receptora, posebno  $\beta$ -subjedinice koja poseduje tirozin kinaznuktivnost. Na taj način dolazi do smanjenja autofosforilacije insulinskih receptora i poremećaja u transdukciji signala dok je kapacitet vezivanja insulina za receptor očuvan (Slika 6). Oksidativni stres dovodi i do modifikacije genetske ekspresije transmembranskih proteina koji omogućavaju olakšanu difuziju glukoze u tkiva što takođe doprinosi razvoju IR tokom nastanka DMT2 (87).



**Slika 6.** Prikaz molekularnog mehanizma koji povezuje prekomerni nutritivni unos sa IR.

Preuzeto iz: Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res* 2010; 2(3): 316-31 (85).

β-ćelije pankreasa su takođe osjetljive na delovanje reaktivnih vrsta nastalih tokom oksidativnog stresa, tim pre što ispoljavaju nizak nivo antioksidativnih enzima katalaze, GPx i SOD. Hronično visoki nivoi glukoze i lipida (glukolipotoksičnost) predstavljaju okidač koji uzrokuje pojavu oksidativnog stresa i doprinosi poremećaju funkcije β-ćelija. Glukotoksičnost i lipotoksičnost predstavljaju faktore koji su okrivljeni da najviše doprinose patogenezi DMT2. Pored mitohondrija koje su glavni izvor oksidativnog stresa kod DMT2, enzimski kompleks NADPH oksidaza takođe je izvor nastanka RVK. Prekomeran unos glukoze i zasićenih masnih kiselina aktivira NADPH oksidazu, pri čemu nastaje povećanje koncentracije RVK i poremećaj funkcije β-ćelija. Hronično dejstvo glukoze, zasićenih masti kao i RVK dovodi i do povećane ekspresije iNOS. To za posledicu ima povećanu sintezu NO koja dovodi do smanjenja insulinske sekrecije u β-ćelijama pankreasa i apoptoze (89). Sve ove promene dovode do nastanka hiperglikemije koja je glavna odlika DMT2 i koja dalje stvara povoljne uslove za nastanak i održavanje prooksidativne sredine.

### **1.11.2. Uloga oksidativnog stresa u nastanku dijabetesnih komplikacija**

Kod prolongirane hiperglikemije tkiva koja preuzimaju glukozu nezavisno od prisustva insulina (retina, očno sočivo, nervi, endotel) trpe znatna oštećenja. Izloženost hiperglikemiji je najzaslužnija za nastanak oštećenja kardiovaskularnog sistema, bubrega, oka i nerava. Postoji više mehanizama kojima se može objasniti štetno dejstvo hiperglikemije i nastanak dijabetesnih komplikacija. Oni koji su povezani sa oksidativnim stresom su: proces neenzimske glikacije tj. formiranja krajnjih produkata glikooksidacije (advanced glycation end products AGEs), put poliola, poremećaj redoks potencijala ćelije, aktivacija protein kinaze C (PKC), aktivacija mitogenom-aktiviranih protein (MAP) kinaza (88).

### **1.11.3. Autooksidacija glukoze, proces neenzimske glikacije**

#### **tj. formiranja krajnjih produkata glikooksidacije (AGEs)**

U uslovima trajno povišenog nivoa glukoze dolazi do povećanog stvaranja AGE, heterogene grupe jedinjenja koja nastaje neenzimskom glikacijom proteina, lipida i nukleinskih kiselina (78). Termin autooksidaciona glikacija se odnosi na neenzimsku glikaciju proteina. Proces se sastoji od nekoliko kaskadnih reakcija. U prvoj fazi koja je reverzibilna reaguje terminalna amino grupa proteina sa aldehidnom grupom glukoze, formirajući „rani“ produkt reakcije Šifovu bazu koja se transformiše u stabilniji Amadori produkt. U kasnijoj ireverzibilnoj fazi dolazi do stvaranja prvog stabilnog produkta fruktozilizina čija je koncentracija direktno proporcionalna koncentraciji glukoze i koja korelira sa glikohemoglobinom (HbA1c). Tokom niza lančanih reakcija između proteina i Maillardovih proizvoda uz obavezno prisustvo slobodnih radikala dolazi do stvaranja AGEs (90).

Povećano formiranje i nakupljanje AGEs u tkivima je svojstveno pacijentima sa DMT2 čak i u uslovima dobre glikoregulacije. Svoj štetni potencijal AGEs ispoljavaju direktnim oštećenjem strukture i funkcije proteina ili putem cross-linking efekta. Naime, AGEs se vezuju za receptore krajnjih produkata glikooksidacije pri čemu se aktivira enzim NADPH oksidaza i dolazi do produkcije RVK. Povećano stvaranje RVK dovodi do povećanog stvaranja AGEs koji opisanim mehanizmima dovodi do daljih oštećenja ali i do aktivacije NF- $\kappa$ B što intenzivira inflamatorni odgovor (91).

Procesi glikacije su u velikoj meri prisutni u apoproteinu B i fosfolipidnoj komponenti lipoproteina niske gustine (LDL) gde dovode do funkcionalnih promena LDL klirensa i povećava njegovu osetljivost na delovanje oksidativnog stresa. Glikozilisane LDL čestice ne

bivaju prepoznate od strane receptora što smanjuje njihovo uklanjanje a dovodi do preuzimanja od strane „scavenger“ receptora koji se nalaze na površini makrofaga. Ova promena rezultuje formiranjem penastih ćelija i inicijacijom ateroskleroze (90).

#### **1.11.4. Put sorbitola (poliola)**

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da je put sorbitola (poliola) u normoglikemijskim uslovima u veoma malom procentu zastupljen u metabolizmu glukoze. Međutim, veoma intenzivno se odvija u uslovima hiperglikemije, menjajući redoks potencijal ćelije i dovodeći do nastanka dijabetesnih komplikacija. Ovaj put metabolisanja podrazumeva redukciju glukoze u sorbitol pod dejstvom enzima aldozo reduktaze koja kao kofaktor koristi NADPH. Pad koncentracije NADPH dovodi do pada aktivnosti NADPH zavisnih enzima kao što je glutation reduktaza i NOS. Usled smanjene proizvodnje NO dolazi do vazokonstrukcije, a zbog neobnavljanja GSH dolazi do smanjenja antioksidativne zaštite i stanja permanentnog oksidativnog stresa (88, 92).

#### **1.11.5. Aktivacija PKC i MAP kinaze**

Familija PKC enzima koja broji 11 izoformi igra bitnu ulogu u prenošenju signala iz spoljašnjosti u unutrašnjost ćelije u različitim tkivima vršeći up ili down regulaciju fosforilacije enzima, receptora, transkripcionih faktora i drugih kinaza. Aktivacija PKC je posredovana delovanjem sekundarnog glasnika diacilglicerola (DAG). Visoka koncentracija glukoze ubrzava katabolizam fosfatidilholina, i stimuliše de novo sintezu DAG-a iz fosfatidne kiseline. Oksidativni stres izazvan hiperglikemijom takođe dovodi do porasta DAG-a. Aktivacija PKC dovodi do down regulacije broja insulinskih receptora i smanjene aktivnosti protein kinaze B što rezultuje IR, hiperinsulinemijom i hiperglikemijom. Ovaj proces se pod dejstvom hiperglikemije odvija u mnogim tkivima kao što su retina, srce, bubreg i predstavlja osnovu molekularnog dejstva hiperglikemije kojom se objašnjava nastanak komplikacija (88,92).

Oksidativna modulacija PKC predstavlja ključni događaj za razvoj vaskularnih komplikacija kod DMT2. Odgovorna je za poremećaj regulacije permeabiliteta, kontrakcije, ćelijskog rasta, angiogeneze, aktivacije citokina i sinteze athenzivnih molekula u ćelijama endotela (88).

Aktivacija MAP kinaze predstavlja drugi signalni put kojim hiperglikemija utiče na razvoj dijabetesnih komplikacija. Aktivacija ovog enzima dovodi do fosforilacije transkripcionih faktora što utiče na promenu ekspresije gena uključenih u modifikaciju fenotipa ćelije, proliferaciju i sintezu ekstracelularnog matriksa (90).

## 1.12. Antioksidativno dejstvo vitamina D

Među velikim brojem „predloženih“ efekata koji nisu vezani za metabolizam kostiju, antioksidativno dejstvo vitamina D spada u najskorije, ali i najmanje istraživane efekte do sada. Smatra se da su antioksidativna svojstva vitamina D potentnija u odnosu na ona koja poseduje vitamin E. Studije sprovedene *in vitro* su to i potvrdile pokazavši da vitamin D inhibira lipidnu peroksidaciju i stvaranje MDA u većoj meri u odnosu na analog vitamina E. Eksperimenti sprovedeni na životinjskim modelima su pokazali da je administracija kalcitriola dovela do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, katalaze i GPx (61,93,94).

Do sada se mali broj istraživanja bavio antioksidativnim dejstvom vitamina D kod pacijenata sa DMT2. Za procenu oksidativnog stresa u tim istraživanjima korišćeni su različiti biomarkeri, ali je većina bila usmerena na određivanje totalnog oksidativnog kapaciteta i totalnog antioksidativnog kapaciteta. Manji broj istraživanja je bio usmeren na određivanje produkata oksidativnog oštećenja kao što su MDA, AGEs i AOPP. Rezultati ovih istraživanja nisu mogli dati jasne zaključke jer su se neki parametri oksidativnog stresa menjali pod uticajem vitamina D, dok su drugi ostali nepromenjeni. Razlog može biti izražena heterogenost protokola kako u pogledu doze, dužine i načina primene vitamina D tako i u pogledu parametara oksidativnog stresa koji su razmatrani (94,95).

## **2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Radna hipoteza**

Polazeći od činjenice da vitamin D utiče na IR i sekreciju insulina, kao i da može imati antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo postavljene su hipoteze istraživanja:

H1: Suplementacija vitaminom D će dovesti do poboljšanja metaboličke kontrole kod pacijenata.

H2: Suplementacija vitaminom D će smanjiti inflamatorni put posredovan MPO, XO i slobodnim radikalima.

H3: Suplementacija vitaminom D će doprineti smanjenju kardiovaskularnog rizika modulacijom pro i antiaterogenih lipoproteinskih frakcija.

### **2.2. Cilj istraživanja**

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

1. Da se utvrdi efekat šestomesečne suplementacije vitaminom D na vrednosti parametara glikoregulacije i IR kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
2. Da se utvrdi efekat šestomesečne suplementacije vitaminom D na dominantne enzime geneze slobodnih radikala kao i na parametre antioksidativne zaštite i oksidativne modifikacije proteina i lipida kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
3. Da se utvrdi efekat šestomesečne suplementacije vitaminom D na vrednosti parametara kardiovaskularnog rizika kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.

### **3. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Dizajn studije i karakteristike ispitanika**

Istraživanje je sprovedeno kao randomizovana, kontrolisana, otvorena studija u skladu sa standardima Helsinške deklaracije i smernicama Dobre kliničke prakse. Protokol istraživanja odobren je od strane Etičkog komiteta Doma zdravlja Podgorica kao i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu. Svi ispitanici koji su učestvovali u ovom istraživanju dali su pismeni informisani pristanak.

Studija je sprovedena u trajanju od 6 meseci (jun-decembar) u Domu zdravlja Podgorica, u Crnoj Gori čiji geografski položaj karakteriše mediteranska klima i mediteranski način ishrane što je moglo uticati na početne vrednosti vitamina D kod naših ispitanika. Obuhvatila je pacijente oba pola, starosti preko 30 godina kod kojih je dijagnoza DMT2 postavljena u skladu sa kriterijumima Američke dijabetesne asocijacije (96) i koji su tretirani higijensko-dijetetskim režimom i metforminom kao jedinim medikamentom. Kriterijumi za isključenje ispitanika iz ove studije su bili sledeći:

- prethodna upotreba vitamin D suplementacije,
- upotreba drugih oralnih antidijabetika (izuzev metformina) sa ili bez upotrebe insulinske terapije,
- trudnoća i dojenje,
- upotreba lekova koji utiču na metabolizam vitamina D (kortikosteroidi i antikonvulzivni lekovi),
- prisustvo hronične bubrežne insuficijencije,
- prisustvo ciroze jetre,
- postavljena dijagnoza alkoholizma,
- prisustvo demencije
- prisustvo maligne bolesti,
- prisustvo digestivnih (malapsorpcionih) bolesti,
- prisustvo urolitijaze,
- ITM  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>,
- prisustvo akutnih inflamatornih stanja,
- prisustvo hroničnih autoimunskih, degenerativnih ili inflamatornih stanja.

Veličina uzorka je određena na osnovu promene ključne varijable HbA1c u prethodnom istraživanju koje su sproveli Nasri i sar. (97) uzimajući u obzir da verovatnoća greške prvog tipa iznosi  $\alpha = 0,05$  i statistička snaga  $1-\beta = 0,8$ . Od ukupno 560 ispitanika čiji su elektronski kartoni detaljno pregledani samo 150 je ispunilo sve kriterijume uključenja. Dopuštajući da stopa odustajanja iznosi do 30 %, 130 ispitanika je uključeno u istraživanje (Grafikon 1).

### 3.2. Intervencija

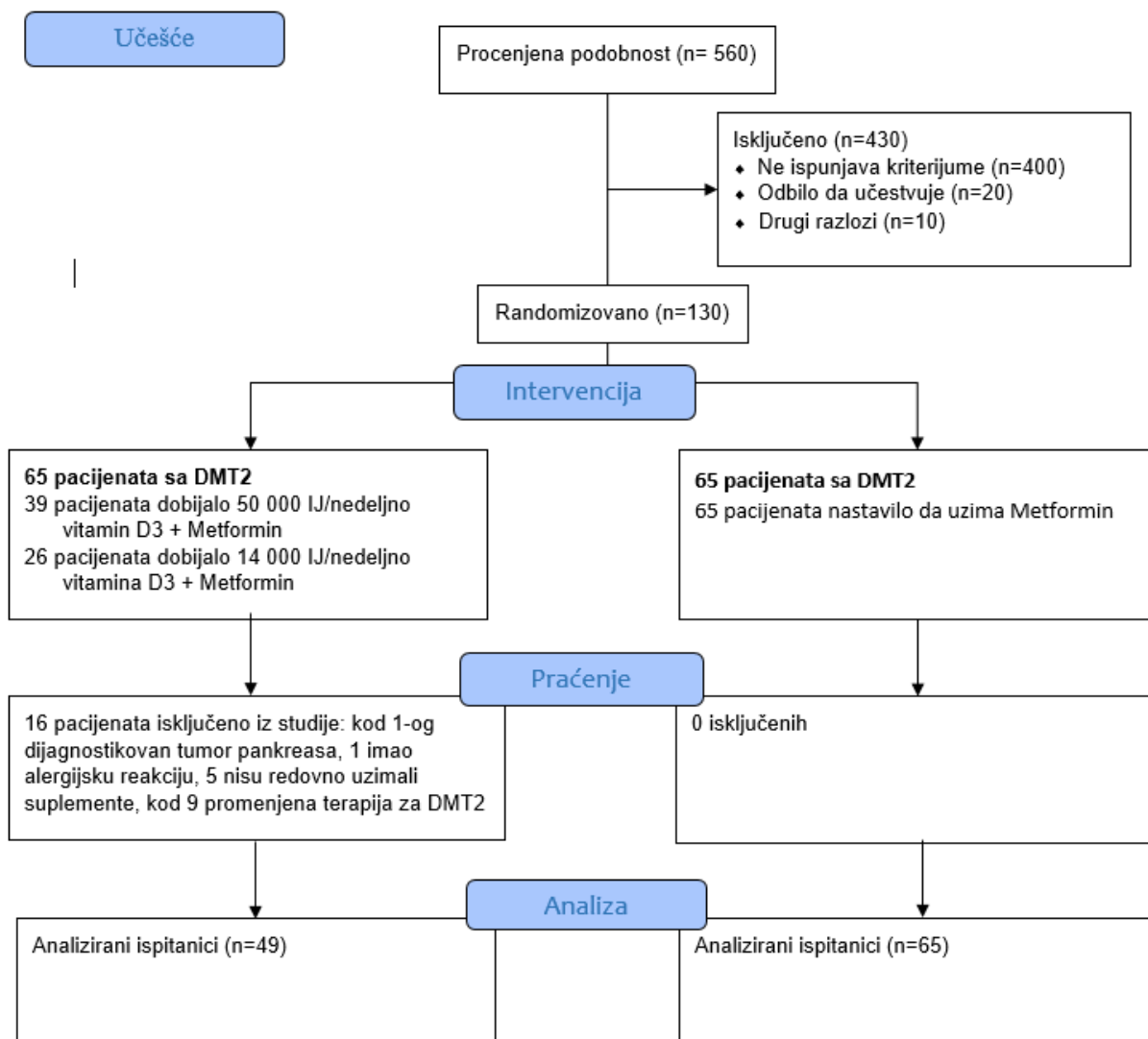
Sto trideset ispitanika koji su ispunili uslove za ulazak u studiju je metodom randomizacije raspoređeno u dve grupe (odnos 1:1). Prva grupa ispitanika je pored metformina dobijala i vitamin D3 u vidu Vigantol kapi, dok je druga grupa nastavila da uzima metformin do kraja istraživanja. U Vitamin D + Metformin grupi doziranje je izvršeno prema ES smernicama a na osnovu vrednosti 25(OH)D3 u serumu koje su pre početka istraživanja izmerene kod svih ispitanika. Na osnovu tih početnih vrednosti ispitanici u Vitamin D + Metformin grupi su podeljeni na one čiji su nivoi 25(OH)D3 iznosili  $> 50$  nmol/l i one koji su bili vitamin D deficijentni, tj. čiji su 25(OH)D3 nivoi bili  $\leq 50$  nmol/l. Vitamin D deficijentni pacijenti su prva tri meseca dobijali vitamin D3 u dozi od 50 000 IJ/nedeljno podeljeno u jednake dnevne doze (15 kapi Vigantola na dan) kako bi nadoknadili deficit, dok su nakon toga sledećih tri meseca dobijali 14 000 IJ/nedeljno u cilju održavanja postignutih nivoa 25(OH)D3. Ispitanici Vitamin D + Metformin grupe čiji su nivoi 25(OH)D3 od početka bili veći od 50 nmol/L su do kraja istraživanja dobijali 14 000 IJ vitamina D3 nedeljno podeljeno u jednake dnevne doze (4 kapi Vigantola na dan). Detaljan protokol istraživanja prikazan je u Grafikonu 1.

Oko 90 % ispitanika je imalo u kartonu dijagnozu hipertenzije i hiperlipidemije, zbog čega su im propisivani antihipertenzivi i statini. Uvidom u elektronske kartone utvrđeno je da su ispitanici navedenu terapiju redovno podizali. Nijedan od ispitanika nije koristio fibrate.

Svi ispitanici su dobili preporuke u vezi ishrane i izlaganja sunčevoj svetlosti, a medicinsko osoblje je pažljivo kontrolisalo poštovanje ovih preporuka. Pacijenti čija se terapija za DMT2, hipertenziju i hiperlipidemiju menjala tokom istraživanja bili su isključeni. Pravilno i redovno uzimanje Vitamin D suplementa je takođe pažljivo nadzirano tako što su svi ispitanici na kraju meseca bili u obavezi da vrate prazne bočice Vigantol kapi.



Od ukupno 65 ispitanika u Vitamin D + Metformin grupi iz istraživanja je isključeno 16 ispitanika: kod 1 ispitanika dijagnostikovano je tumor pankreasa, 1 ispitanica je prijavila alergijsku reakciju nakon uzimanja Vigantol kapi, kod 9 ispitanika je došlo do promene terapije za dijabetes dok kod 5 ispitanika iz navedene grupe suplementacija vitaminom D nije bila redovna. U Metformin grupi svih 65 ispitanika je uspešno završilo istraživanje (Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Dijagram toka i dizajna studije

### 3.3. Metode

Svi pacijenti su na početku studije kao i u 3. i 6. mesecu istraživanja podvrgnuti kliničkom pregledu i detaljnoj kontroli laboratorijskih parametara. Klinički pregled je podrazumevao antropometrijska merenja i merenje krvnog pritiska (KP).

#### 3.3.1. Antropometrijska merenja

Sva antropometrijska merenja vršena su u jutarnjim časovima i podrazumevala su određivanje telesne visine (TV), TM i obima struka (OS). Da bi se obezbedila uspešnost i tačnost antropometrijskih veličina obezbeđeni su adekvatni uslovi i poštovana su propisana pravila.

Za merenje TM korišćena je decimalna vaga, prethodno baždarena i etalonirana sa mogućom greškom od  $\pm 100$ g. Vaga je uvek bila postavljena na tvrdoj podlozi. Ispitanici su mereni tek nakon skidanja određenih delova odeće (jakna, sako i dr.) i obuće. Prethodno su bili zamoljeni da samo jednom stanu na sredinu ploče vage kako bi težina tela bila ravnomerno raspoređena. Vrednost TM očitavana je u kilogramima.

Telesna visina je određivana visinometrom koji je postavljen da visi vertikalno uz zid. Pre merenja svi ispitanici su zamoljeni da skinu obuću i stanu okrenuti leđima prema lenjiru za merenje. Potiljak, leđa, stražnjica, listovi i pete ispitanika dodirivale su vertikalnu, a stopala su bila spojena na petama sa prstima blago rastavljenim. Prilikom merenja svim ispitanicima su takođe date instrukcije da drže glavu u položaju pri kom gledaju pravo, napred u jednu tačku na suprotnom zidu. Deo visinometra za glavu, odnosno njegov pokretni deo postavljan je ravno da pritiska kosu ukoliko je ima. Zabeležena visina je odgovarala zabeleženoj skali (najbliži milimetar/najbliži centimetar).

Na osnovu podataka o TM i TV određivan je ITM (odnosno BMI) po formuli  $ITM = TM/TV^2$  (kg/m<sup>2</sup>).

Merenje OS vršeno je fleksibilnom trakom postavljenoj u horizontalnoj ravni, paralelno sa podlogom na sredini rastojanja između najniže tačke rebarnog luka i prednje gornje bedrene bodlje karlične kosti pri čemu je ispitanik u stojećem stavu u fazi normalnog ekspirijuma. Vrednosti su izražavane u cm.

Za merenje vrednosti sistolnog (SKP) i dijastolnog krvnog pritiska (DKP) korišćeni su automatski aparati za merenje KP na nadlaktici (model Microlife's BP A150-30 AFIB) koji su prethodno bili podvrgnuti testu preciznosti.

Pre svakog merenja ispitanici su sedeli mirno, leđima naslonjenim na naslon stolice a leva ruka, na kojoj je vršeno merenje je bila postavljena tako da je lakatna jama u kojoj je smeštena glavna arterija ruke (arteria brachialis) u nivou srca sa dlanom okrenutim na gore. Nadlaktica je bila oslobođena od odeće kako bi se izbeglo vršenje pritiska na arteriju, a manžetna aparata je bila standardne veličine 12 cm x 15 cm i postavljena tako da obuhvata dve trećine dužine nadlaktice. Nakon jednog minuta vršeno je ponovno merenje, a kao konačna vrednost SKP i DKP uzimana je srednja vrednost dva uzastopna merenja.

### 3.3.2. Laboratorijske analize

Uzorci krvi uzimani su venepunkcijom iz kubitalne vene, našte, između 7 i 9 h ujutru, a nakon 12 sati noćnog gladovanja. Nakon završenog procesa koagulacije svi uzorci su centrifugirani pri brzini od 2000-3000 obrtaja/minuti kako bi se izdvojio serum. Standardni biohemijski parametri rađeni su u okviru Centra za laboratorijsku dijagnostiku Doma zdravlja Podgorica na dan uzimanja krvi. Uzorci seruma za analizu parametara oksidativnog stresa koje su rađene na Institutu za biohemiju, Medicinskog fakulteta u Nišu, podeljeni su u alikvote i čuvani na -80 °C.

Serumski nivoi glikemije, ureje, kreatinina, ukupnog holesterola, lipoproteina niske i visoke gustine (LDL i HDL), TG, aspartat (AST), alanin (ALT) aminotransferaze i gama-glutamil transpeptidaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), albumina mereni su korišćenjem standardnih enzimskih procedura (Roche Cobas 6000 c 501, Mannheim, Germany).

Nivo serumskog C - reaktivnog proteina (CRP) određivan je metodom imunoturbidimetrije dok je ukupni Ca određivan fotometrijskom metodom (Roche Cobas 6000 c 501, Mannheim, Germany).

Serumske vrednosti jonizovanog Ca ( $Ca^{++}$ ) određivane su pomoću jon-selektivne metode na elektrolitnom analizatoru [Roche Diagnostics AVL 9180 Electrolyte Analyzer (AVL 9180, Roche, Japan)].

Za određivanje HbA1c korišćena je puna krv uz upotrebu antikoagulnasa K2EDTA imunoturbidimetrijskom analizom (Roche Cobas 6000 c 501, Mannheim, Germany).

Određivanje vrednosti insulina i vitamina D [25(OH)D<sub>3</sub>] u serumu vršeno je imunoesej metodom elektrohemiluminiscencije, upotrebom komercijalnih testova Roche na automatskom analizatoru Cobas 6000/e601 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Kao surogat marker za procenu IR računat je HOMA-IR (engl. homeostasis model assessment of insulin resistance) - po formuli:  $\text{glukoza (mmol/L)} \times \text{insulin } (\mu\text{IU/L}) / 22,5$  i TYG indeks kao prirodni logaritam proizvoda plazma glikemije i TG po formuli:  $\text{Ln [TG (mg/dL)} \times \text{glikemija (mg/dL)/2]}$ .

Castelli risk index I je računat kao odnos ukupnog holesterola i HDL holesterola odražavajući aterogeni rizik plazme koji je karakterističan za metabolički sindrom i kako je skoro objavljeno potencijalni surogat marker povezan sa vitamin D insuficijencijom i metaboličkim sindromom (98).

Castelli risk index II je računat kao odnos LDL holesterola i HDL holesterola odražavajući takođe aterogeni rizik plazme (99)

#### *Parametri oksidativnog stresa*

Stepen lipidne peroksidacije procenjivan je određivanjem količine MDA u plazmi spektrofotometrijskom metodom. Ova metoda se bazira na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje obojeni kompleks MDA-TBA (100). Koncentracija MDA se izražava u  $\mu\text{M/L}$ .

Izračunavanje odnosa vrednosti TG i TBA reagujućih supstanci (TBARS) korišćeno je za monitorig odnosa potencijalno oksidabilnih supstrata polinezasićenih masnih kiselina cirkulišućih TG i njihovih oksidovanih parnjaka-lipidnih peroksida.

Stepen oksidativne modifikacije proteina procenjivan je na osnovu vrednosti AOPP merenih u plazmi spektrofotometrijski i izraženih kao hloramin T ekvivalenti. Pre analize uzorci plazme su razblaženi u odnosu 1:10 (101).

Aktivnost MPO u serumu određivana je komercijalnim ELISA testom uz upotrebu bunara sa 96 mikrolejtova koji su prethodno obloženi biotinitiranim antitelima. Test sendviča zasnovan je na reakciji sa drugim antitelom (detektor) prilikom dodavanja rastvorenog supstrata koji reaguje sa enzim-antitelo kompleksom stvarajući obojeni kompleks. Koncentracija enzima MPO izražena je u  $\text{ng/L}$ .

Aktivnost XO u serumu određivana je spektrofotometrijski, na osnovu oslobađanja mokraćne kiseline iz ksantina kao supstrata (102) uz malu modifikaciju uslova ispitivanja seruma (103). Aktivnost enzima izražena je u U/L.

Koncentracija nitrita i nitrata (zajednički naziv NO<sub>x</sub>) u serumu korišćena je kao indikator produkcije NO, a određivana je na sledeći način: redukcija nitrata u nitrite postignuta je pomoću bakrom presvučenog kadmijuma. Merenje koncentracije nitrita vršeno je kolorimetrijskom detekcijom produkata azo boje Griess-ove reakcije (104).

Aktivnost antioksidativnog enzima katalaze određivana je pomoću spektrofotometrijske metode, pri čemu supstrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formira stabilan žuto obojeni kompleks sa molibdenskim solima. Smanjenje apsorpcije odražava se na aktivnost enzima koja je izražena u kat/L (105).

Totalni oksidativni kapacitet (TOC) određivan je metodom koja se bazira na reakciji oksidacije fero jona u feri jon. Naime, glavne komponente TOC-a su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i drugi peroksidi koji oksiduju fero jone, a nastali feri jon u kiseloj sredini gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom. Intenzitet bojenja se određuje spektrofotometrijski i direktno je proporcionalan ukupnom broju oksidacionih molekula (peroksida) u uzorku. Rezultati su izraženi u vidu mikromola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekvivalenata po litru (μmol/L) (106).

Totalni reduktivni kapacitet (TRC) plazme određivan je Folin- Ciocalteu metodom uz malu modifikaciju. Sam metod je baziran na oksidaciji prisutnih fenola Folin-ovim reagensom, pri čemu se reagens redukuje. Kao standard korišćena je galna kiselina a rezultati su prikazani kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) (107).

### **3.4. Statistička analiza**

Unos, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka obavljeno je korišćenjem MS Office Excel programa.

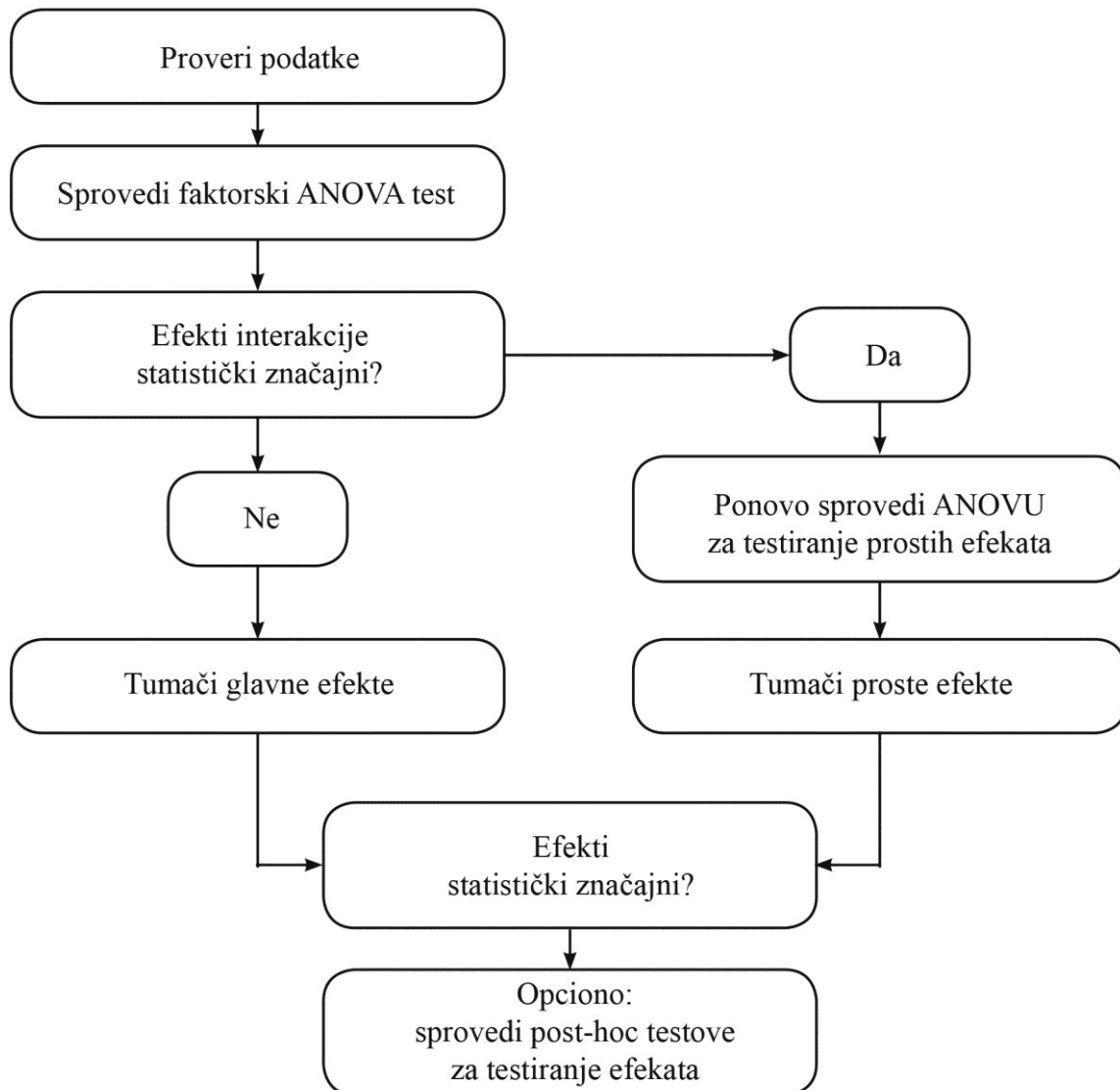
Podaci dobijeni u ovom istraživanju su prikazani u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije ili u vidu apsolutnih i relativnih brojeva. Normalnost raspodele podataka je testirana Kolomogorov-Smirnov testom. Poređenje kontinuiranih varijabli između grupa, ukoliko je distribucija podataka bila normalna vršeno je t testom, a slučaju kada raspodela nije bila normalna Mann-Whitney testom.

Poređenje vrednosti u ponovljenim merenjima je testirano analizom varijanse (ANOVA) za ponovljena merenja, odnosno rađena je dvofaktorska analiza varijanse sa jednim ponovljenim faktorom (vreme – tri merenja u periodu od 6 meseci) i neponovljeni faktor – 2 grupe sa različitim tretmanima (Metformin + Vitamin D, odnosno grupa Metformin). Poređenje vrednosti u ponovljenim merenjima je vršeno prema datoj šemi (Šema 1). Ukoliko se u analizi za ponovljenja merenja pokaže da postoji statistički značajna interakcija u tom slučaju je ponovno rađena ANOVA za ponovljena merenja gde je ispitivan prost efekat. Ukoliko je analiza pokazala da nema statistički značajne interakcije interpretiran je glavni efekat faktora. U analizi ponovljenih merenja tumačeni su sledeći efekti: ukupan efekat vremena, ukupan efekat grupa i efekat interakcije vreme i grupa. Ukupan efekat vremena ukazuje da ima statistički značajne razlike u vrednostima zavisne promenljive tokom vremena. Ukupan efekat grupa ukazuje da li u proseku ima statistički značajne razlike u prosečnim vrednostima zavisne promenljive između grupa. Efekat interakcije vreme i grupa ukazuje da li se tokom vremena zavisna promenljiva statistički značajno menjala između grupa. Za procenu sferičnosti podataka korišćen je Mauchlyjev test. Ukoliko nije zadovoljena sferičnost podataka u ANOVA za ponovljena merenja korišćena je Greenhouse-Geisser ili Huynh-Feldt korekcija i to po sledećem pravilu: ukoliko je  $\epsilon < 0,75$  primenjuje se Greenhouse-Geisser korekcija, u suprotnom primenjuje se Huynh-Feldt korekcija.

Multipla linearna regresiona analiza (enter metod) je korišćena za utvrđivanje statistički značajna razlika u vrednostima praćenih parametara u odnosu na grupe koje su primale vitamin D ili nisu primale vitamin D korigovane za starost, pol i BMI. Hipoteza je testirana sa pragom značajnosti  $p < 0,05$ . Analiza podataka je vršena u programskom paketu SPSS 16.0.

Veličina uzorka izračunata je pomoću komercijalnog statističkog programa G\* power za dvosmerno testiranje nulte hipoteze. Za određivanje veličine uzorka u ovom programskom paketu korišćen je F-test, odnosno ANOVA za ponovljena merenja. Dobijena veličina uzorka je 49 po grupi.

Rezultati statističke analize su prikazani tabelarno i grafički.



Šema 1. Analize varijanse za ponovljena merenja

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Demografski podaci i kliničke karakteristike ispitanika

Od ukupno 130 pacijenta, 114 je uspješno završilo istraživanje, od čega je 49 pacijenata bilo u Metformin + Vitamin D grupi i 65 pacijenata u Metformin grupi. U Tabeli 3. su prikazani demografski podaci i kliničke karakteristike ispitanika. Grupe su bile ujednačene prema polu ( $p=0,256$ ) i dužini trajanja bolesti ( $p=0,188$ ). Ispitanici Metformin + Vitamin D grupe su bili statistički značajno mlađi u odnosu na ispitanike Metformin grupe ( $p=0,044$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Demografske i kliničke karakteristike ispitivane populacije

Varijabla	Metformin + Vitamin D		Metformin		p <sup>1</sup>
	N=49		N=65		
	N	%	N	%	
Pol					
Muški	36	55,4	21	42,9	0,256 <sup>2</sup>
Ženski	29	44,6	28	57,1	
Starost (godine)	60,41 ±	8,55	63,65 ±	8,18	0,044 <sup>1</sup>
Dužina trajanja bolesti (godine)	5,33 ±	2,83	6,08 ±	2,94	0,188 <sup>3</sup>
Pušenje					
Ne	22	44,9	38	58,5	0,356 <sup>2</sup>
Da	12	24,5	12	18,5	
Bivši pušač	15	30,6	15	23,1	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,87 ±	4,52	29,74 ±	5,02	0,834 <sup>3</sup>
OS (cm)	102,06 ±	11,09	105,57 ±	12,72	0,214 <sup>1</sup>
SKP (mmHg)	136,55 ±	24,13	137,85 ±	18,99	0,404 <sup>3</sup>
DKP (mmHg)	83,52 ±	12,79	80,79 ±	9,88	0,491 <sup>3</sup>
Metformin (mg/dan)	1362,24 ±	476,04	1283,08 ±	523,38	0,378 <sup>3</sup>

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ili u vidu apsolutnih i relativnih brojeva, %. <sup>1</sup> t test, <sup>2</sup> Hi-kvadrat test, <sup>3</sup> Mann-Whitney test. BMI–Indeks telesne mase (Body Mass Index), SKP–sistolni krvni pritisak, DKP–dijastolni krvni pritisak

U obe ispitivane grupe najviše je bilo nepušača (Metformin + Vitamin D grupa: 44,9%, Metformin grupa: 58,5%). Učestalost pušenja je bila ujednačena u odnosu na



ispitivane grupe ( $p=0,356$ ). Ostale demografske i kliničke karakteristike prikazane u Tabeli 4. su takođe bile ujednačene u odnosu na ispitivane grupe.

**Tabela 4.** Opšte biohemijske karakteristike ispitivane populacije

Varijabla	Metformin + Vitamin D N=49	Metformin N=65	p <sup>1</sup>
Kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ )	79,45 $\pm$ 15,54	86,46 $\pm$ 23,99	0,082
Holesterol (mmol/L)	5,65 $\pm$ 1,39	5,58 $\pm$ 1,21	0,991
TG (mmol/L)	1,96 $\pm$ 1,51	1,96 $\pm$ 0,91	0,263
HDL (mmol/L)	1,35 $\pm$ 0,34	1,28 $\pm$ 0,32	0,239
LDL (mmol/L)	3,37 $\pm$ 1,03	3,5 $\pm$ 1,38	0,789
Holesterol/HDL (Castelli I indeks)	4,50 $\pm$ 1,73	4,60 $\pm$ 1,39	0,358
HDL/LDL (Castelli II indeks)	2,65 $\pm$ 1,06	2,90 $\pm$ 1,23	0,294
AST (IU/L)	20,80 $\pm$ 7,04	21,33 $\pm$ 8,12	0,710
ALT (IU/L)	25,10 $\pm$ 13,96	25,78 $\pm$ 21,06	0,904
GGT (IU/L)	22,35 $\pm$ 11,80	25,90 $\pm$ 17,21	0,448
ALP (IU/L)	63,29 $\pm$ 14,83	62,43 $\pm$ 15,65	0,744
Ca ukupni (mmol/L)	2,43 $\pm$ 0,11	2,41 $\pm$ 0,10	0,553
Ca 2+ (mmol/L)	1,16 $\pm$ 0,09	1,15 $\pm$ 0,07	0,669
CRP (mg/L)	3,19 $\pm$ 4,2	2,19 $\pm$ 2,41	0,459
Albumini (g/L)	48,39 $\pm$ 2,30	48,56 $\pm$ 2,33	0,503

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija ili u vidu apsolutnih i relativnih brojeva, %. <sup>1</sup> *Mann-Whitney* test. TG–trigliceridi, HDL–holesterol–koncentracija holesterola u lipoproteinima velike gustine, LDL–holesterol– koncentracija holesterola u lipoproteinima male gustine, AST– aspartat amino-transferaza, ALT–alanin amino-transferaza, GGT–gama glutamil transferaza, ALP–alkalna fosfataza, Ca–kalcijum, Ca 2+–kalcijum jonizovani, CRP – C-reaktivni protein

## 4.2. Parametri glikoregulacije

Svi parametri glikoregulacije prikazani u Tabeli 5. su bili ujednačeni u odnosu na ispitivane grupe ( $p>0,05$ ).

**Tabela 5.** Parametri glikoregulacije u ispitivanoj populaciji

Varijabla	Metformin +Vitamin D N=49	Metformin N=65	p <sup>1</sup>
Glikemija našte (mmol/L)	7,86 ± 2,38	7,96 ± 1,43	0,282
HbA1c (%)	6,61 ± 1,04	6,68 ± 0,87	0,387
HOMA-IR	4,63 ± 4,51	4,57 ± 2,74	0,349
TYG indeks	9,20 ± 0,75	9,31 ± 0,52	0,365
Insulinemija našte (μU/L )	13,26 ± 14,03	12,80 ± 6,96	0,445

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, %. <sup>1</sup> Mann-Whitney test. HbA1c–glikozilirani gemoglobin, HOMA-IR–surogat marker insulinske rezistencije

### 4.3. Parametri oksidativnog stresa

Među ispitivanim grupama nije utvrđena statistički značajna razlika između početnih vrednosti parametara oksidativnog stresa, osim za vrednosti NOx i TRC. Početne vrednosti NOx su bile statistički značajno veće kod ispitanika Metformin grupe (p=0,034). Vrednosti TRC su bile statistički značajno manje u grupi koja je primala vitamin D (p=0,013) (Tabela 6).

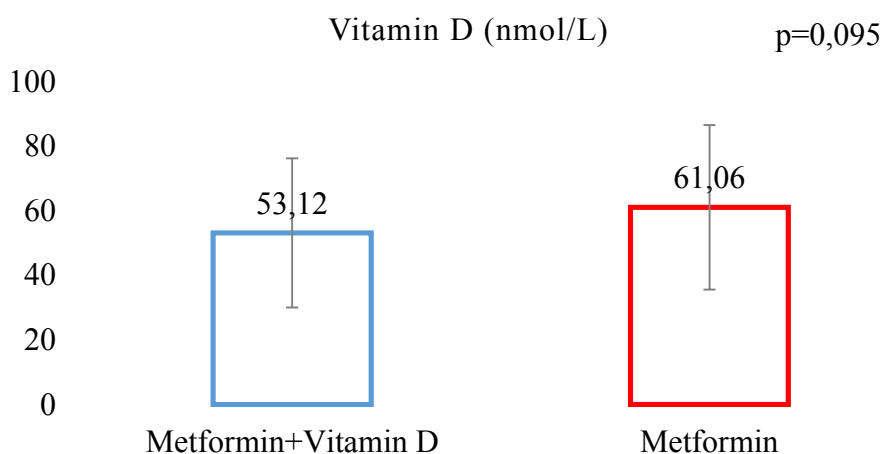
**Tabela 6.** Parametri oksidativnog stresa u ispitivanoj populaciji

Varijabla	Metformin +Vitamin D N=49	Metformin N=65	p <sup>1</sup>
MDA (μM/L)	20,18 ± 3,59	19,73 ± 3,28	0,496 <sup>1</sup>
AOPP (μM hloramin T ekvivalenti)	193,03 ± 147,93	218,58 ± 162,53	0,729 <sup>2</sup>
Katalaza (kat/L)	0,88 ± 0,16	0,86 ± 0,08	0,614 <sup>1</sup>
NOx (μmol/L)	54,34 ± 15,15	68,52 ± 38,21	0,034 <sup>2</sup>
MPO (ng/L)	128,54 ± 84,89	120,40 ± 69,02	0,561 <sup>2</sup>
XO (U/L)	27,47 ± 9,75	29,98 ± 8,43	0,057 <sup>2</sup>
TG/TBARS	0,55 ± 0,32	0,60 ± 0,30	0,172 <sup>2</sup>
TOC μmol/L	0,25 ± 0,19	0,27 ± 0,15	0,078 <sup>2</sup>
TRC (GAE)	0,15 ± 0,08	0,32 ± 0,42	0,013 <sup>2</sup>

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, %. <sup>1</sup> t test, <sup>2</sup> Mann-Whitney test. MDA – malondialdehid, AOPP – produkti uznapredovale oksidacije proteina, NOx – nitrati i nitriti, MPO–mijeloperoksidaza, XO – ksantin oksidaza, TG/TBARS–odnos triglicerida i tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci, TOC–totalni oksidativni kapacitet, TRC–totalni reduktivni kapacitet, GAE–ekvivalenti galne kiseline

#### 4.4. Nivo vitamina D kod ispitanika

U grupi koja je primala vitamin D na početku je bilo 25 pacijenata sa deficijencijom vitamina D (52,1%), a u grupi koja je primala samo metformin 24 pacijenta (36,4%). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti deficijencije vitamina D između ispitivanih grupa ( $p=0,138$ ). Upotrebom *Mann-Whitney* testa utvrđeno je da u 0. mesecu nije postojala statistički značajna razlika u srednjim vrednostima vitamina D između grupa ( $p=0,095$ ) (Grafikon 2).



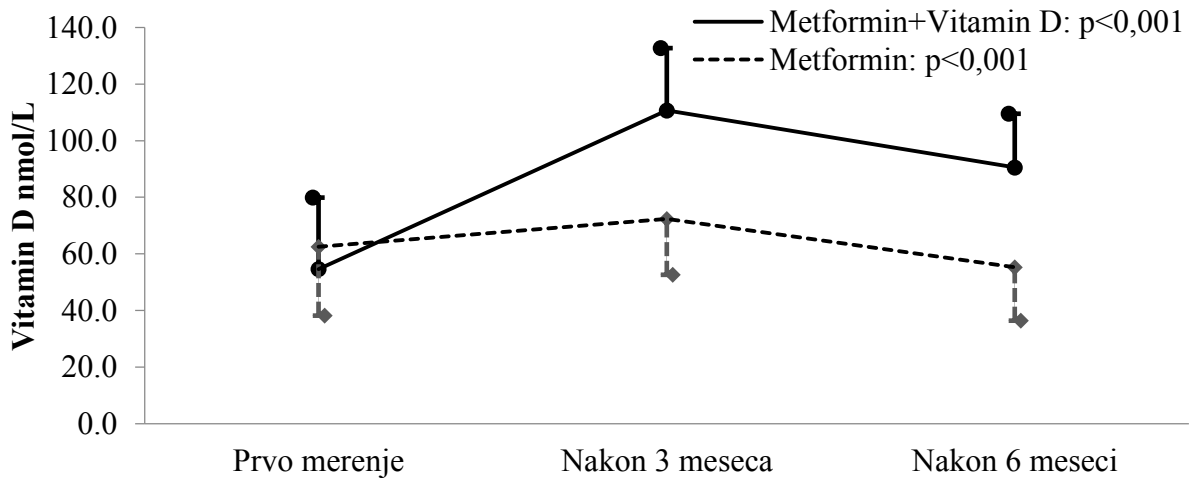
**Grafikon 2.** Prikaz početnih vrednosti vitamina D u ispitivanim grupama

#### 4.5. Rezultati praćenja vrednosti vitamina D u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci

Vrednosti vitamina D su se statistički značajno menjale kroz vreme kako kod ispitanika koji su uzimali vitamin D suplemente ( $p<0,001$ ), tako i kod ispitanika Metformin grupe ( $p<0,001$ ). Kod ispitanika u Metformin + Vitamin D grupi tokom prva 3 meseca je došlo do značajnog porasta vitamina D u odnosu na početne vrednosti ( $p<0,001$ ), a zatim nakon redukovanja doze do statistički značajnog pada između 3. i 6. meseca ( $p<0,001$ ). Ipak, vrednosti vitamina D na kraju istraživanja (nakon 6 meseci) su ostale statistički značajno veće u odnosu na početne u Metformin + Vitamin D grupi ( $p<0,001$ ).

Sličan obrazac promene zabeležen je i u Metformin grupi. U prvih 3 meseca je došlo do statistički značajnog povećanja vrednosti vitamina D ( $p<0,001$ ), a zatim do statistički značajnog pada vrednosti u periodu između 3. i 6. meseca ( $p<0,001$ ). Ipak, vrednosti nakon 6 meseci su statistički značajno manje u odnosu na početne vrednosti ( $p=0,038$ ).

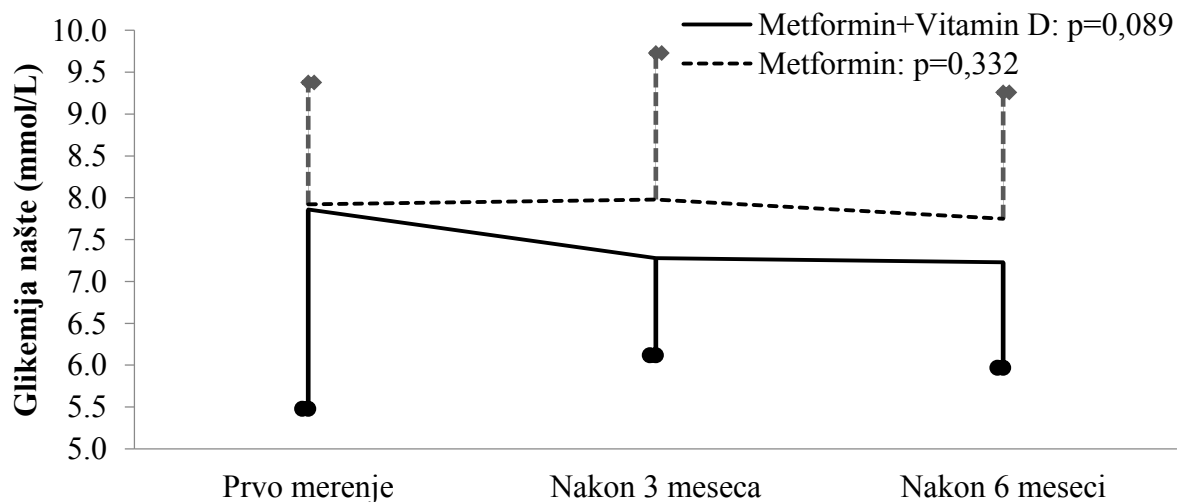
Poređenjem srednjih vrednosti vitamina D između grupa utvrđena je statistički značajna razlika nakon 3 meseca (39,47,  $p < 0,001$ ) i nakon 6 meseci (36,51,  $p < 0,001$ ) (Grafikon 3).



**Grafikon 3.** Koncentracija vitamina D u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu - ANOVA za ponovljena merenja

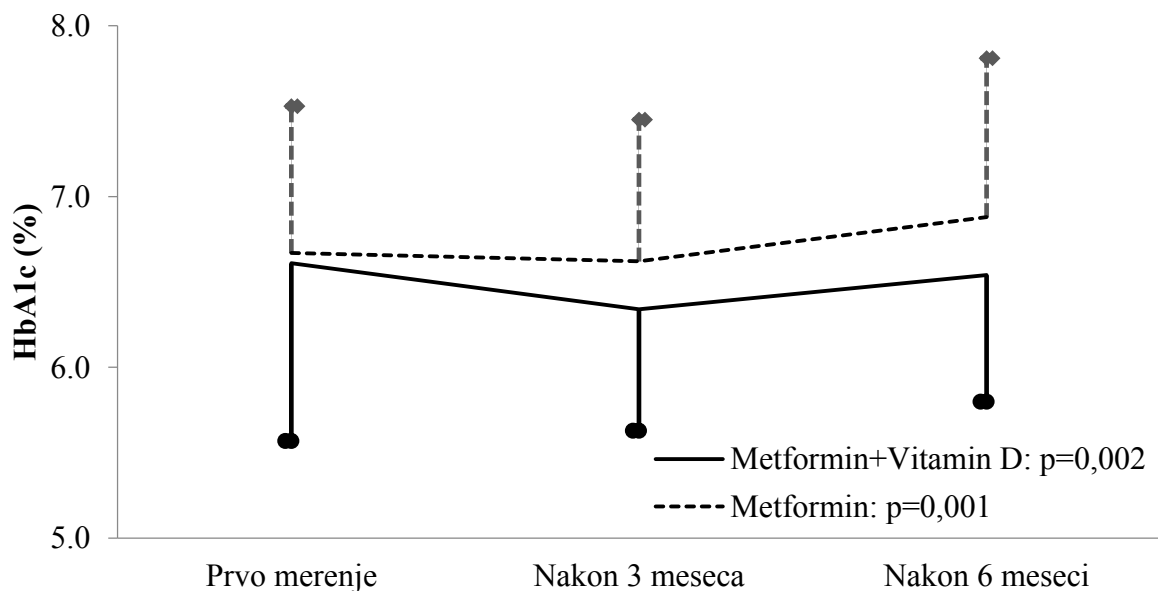
#### 4.6. Rezultati praćenja vrednosti parametara glikoregulacije u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci

Upotrebom testa ANOVA za ponovljena merenja utvrđeno je da se vrednosti glikemije našte nisu statistički značajno menjale kroz vreme u obema ispitivanim grupama, tj. da ne postoji statistički značajan efekat vremena (Grafikon 4).



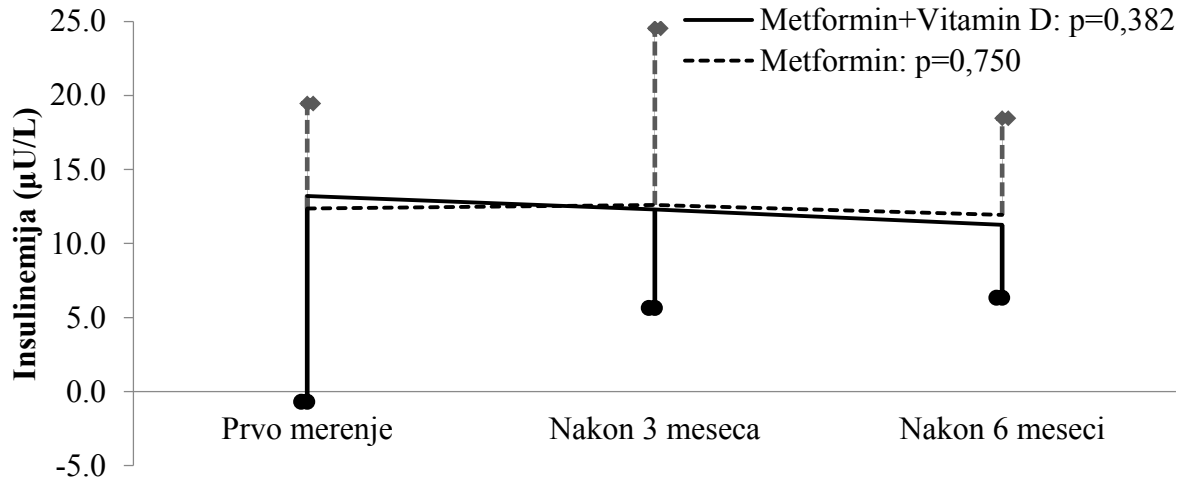
**Grafikon 4.** Vrednosti glikemije našte u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA za ponovljena merenja

Statistička analiza je pokazala da za vrednosti HbA1c u periodu od 6 meseci postoji statistički značajan efekat vremena ( $p < 0,001$ ). U grupi koja je primala vitamin D u periodu od 6 meseci dolazi do statistički značajne promene vrednosti HbA1c ( $p = 0,002$ ). U Metformin grupi koncentracija HbA1c se statistički značajno povećala u istom periodu praćenja ( $p < 0,001$ ). U grupi koja je primala vitamin D došlo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti HbA1c u prvih 3 meseca ( $p = 0,011$ ), zatim u periodu od 3. do 6. meseca dolazi do statistički značajnog povećanja vrednosti ovog parametra ( $p = 0,019$ ). Vrednosti nakon 6 meseci su nešto niže u odnosu na početne vrednosti, ali ne postoji statistički značajna razlika ( $p = 0,509$ ). U Metformin grupi postoji sličan obrazac promene, u prvih 3 meseca vrednosti HbA1c padaju ali ne statistički značajno ( $p = 1,000$ ), a zatim u periodu od 3. do 6. meseca statistički značajno rastu ( $p < 0,001$ ). Vrednosti nakon 6 meseci su statistički značajno veće u odnosu na početne vrednosti u Metformin grupi ( $p = 0,019$ ) (Grafikon 5).



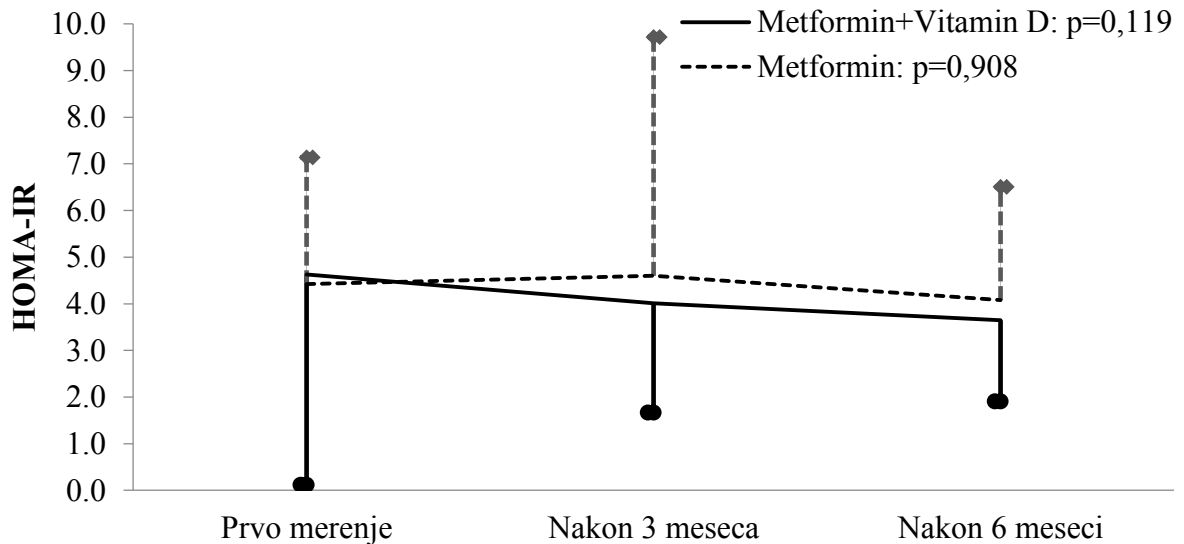
**Grafikon 5.** Vrednosti HbA1c u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti insulinemije se nisu statistički značajno menjale tokom perioda praćenja u obema ispitivanim grupama (Metformin+Vitamin D grupa:  $p = 0,382$ ; Metformin grupa:  $p = 0,750$ ) (Grafikon 6).



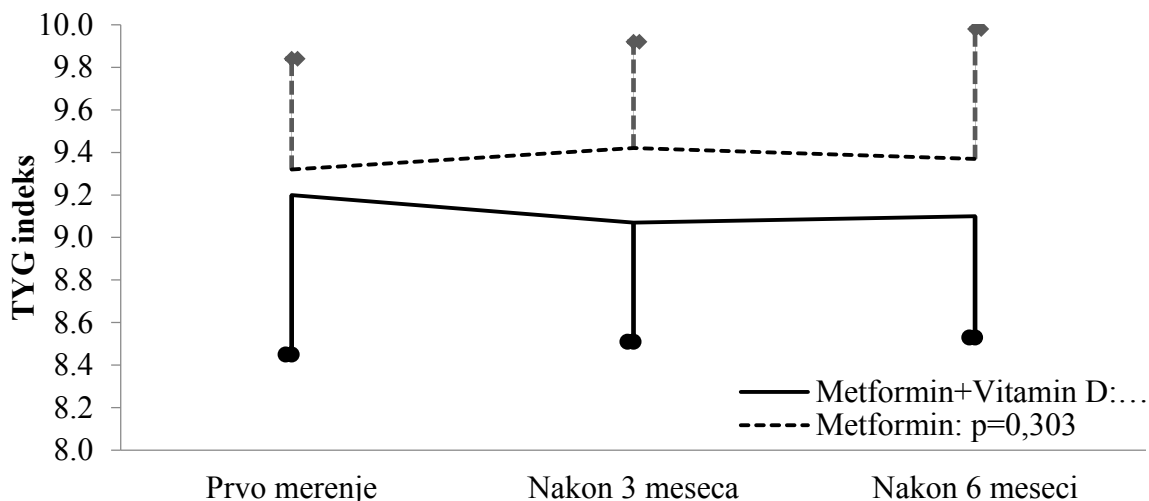
**Grafikon 6.** Vrednosti insulinemije u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti HOMA-IR indeksa se nisu statistički značajno menjale tokom perioda praćenja u obema ispitivanim grupama. Blagi pad vrednosti u periodu od šest meseci je zabeležen u obe grupe ali bez statističke značajnosti (Metformin + Vitamin D:  $p=0,119$ , odnosno u Metformin grupi:  $p=0,908$ ) (Grafikon 7).



**Grafikon 7.** Vrednosti HOMA-IR u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

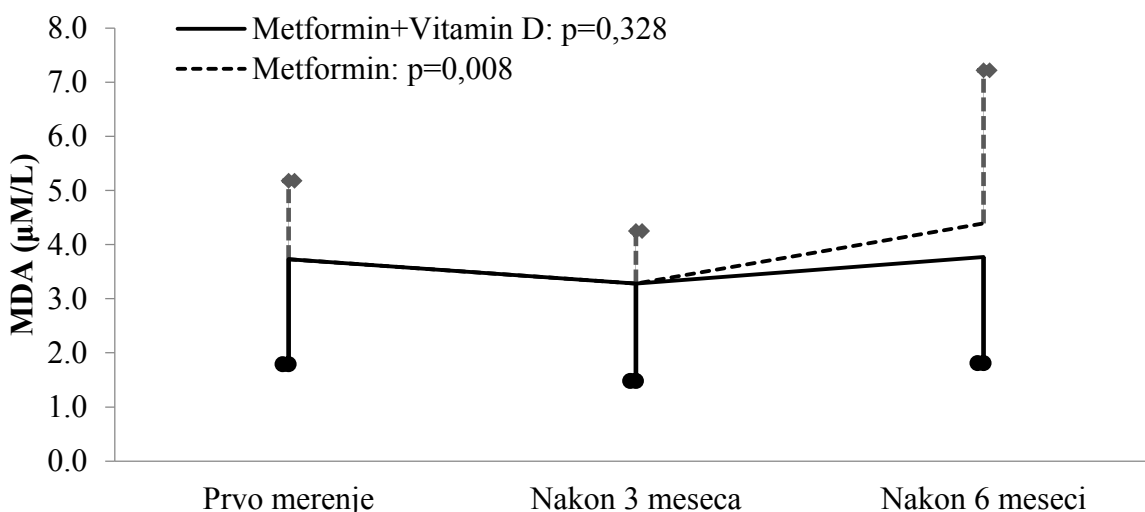
Vrednosti TYG indeksa se takođe ne menjaju statistički značajno u populaciji tokom perioda praćenja od 6 meseci (Metformin + Vitamin D grupa:  $p=0,099$ , Metformin grupa:  $p=0,303$ ) (Grafikon 8).



**Grafikon 8.** Vrednosti TYG indeksa u odnosu na ispitivane grupe u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

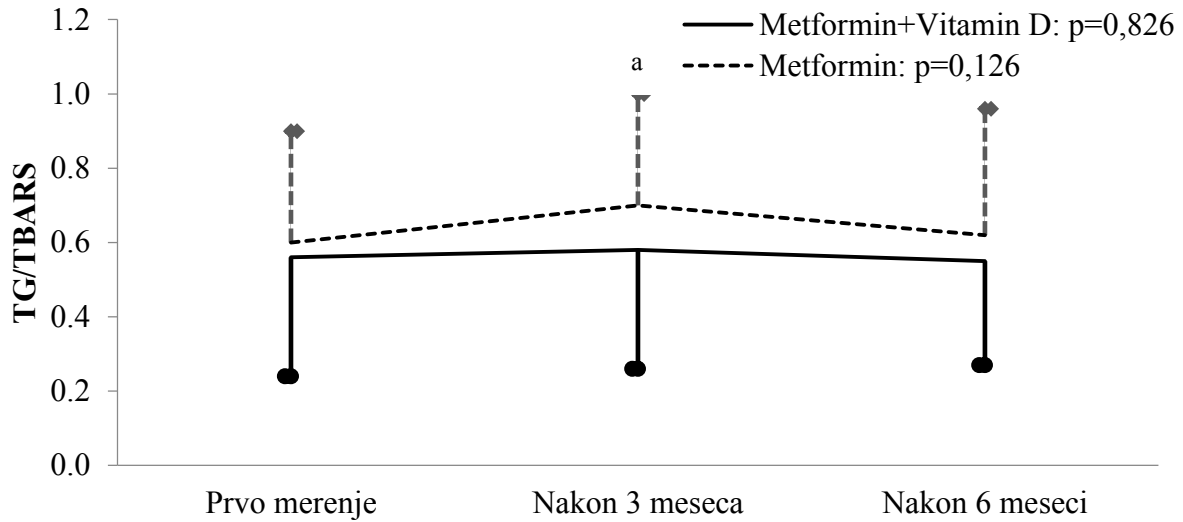
#### 4.7. Rezultati praćenja vrednosti parametara oksidativnog stresa u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci

Analiza je pokazala da se vrednosti MDA statistički značajno ne menjaju u Vitamin D+Metformin grupi tokom vremena ( $p=0,328$ ), odnosno da se u Metformin grupi menjaju statistički značajno ( $p=0,008$ ) tokom perioda praćenja. Na Grafikonu 9 se jasno može uočiti da su profili paralelni za obe grupe, ali da se oni prilikom merenju nakon 3 meseca ne podudaraju već da dolazi do njihovog presecanja. Odnosno, u obe grupe u prvih tri meseca dolazi do smanjenja vrednosti MDA, a zatim u narednih tri meseca dolazi do statistički značajnog povećanja vrednosti u Metformin grupi ( $p=0,023$ ).



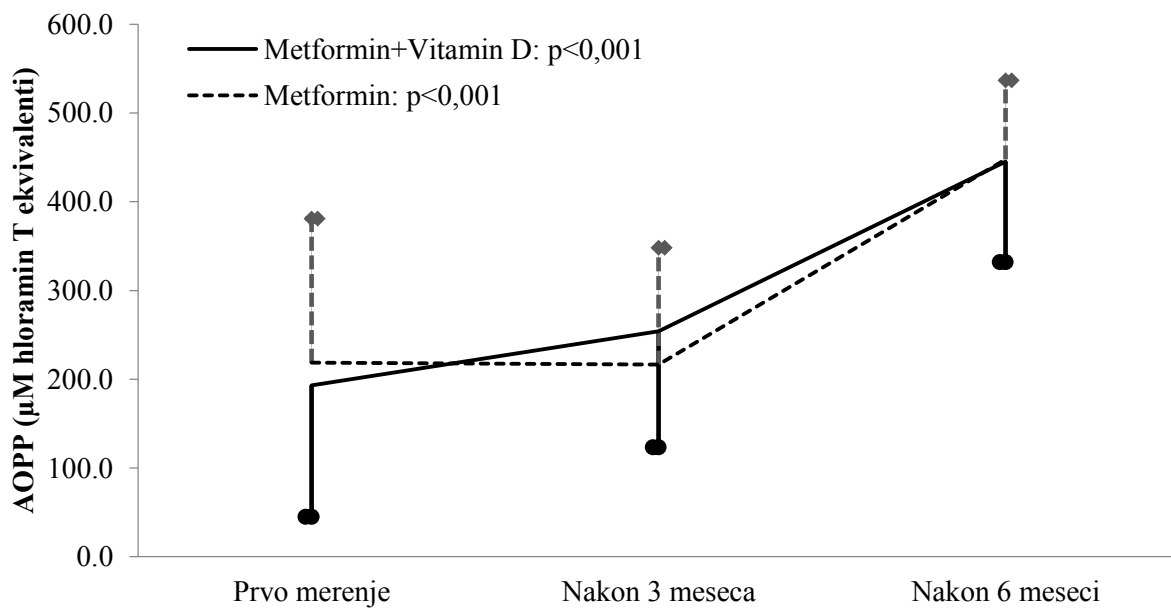
**Grafikon 9.** Vrednosti MDA u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti TG/TBARS se u ispitivanim grupama posle 6 meseci ne menjaju statistički značajno u odnosu na početne vrednosti (Metformin+Vitamin D grupa:  $p=0,826$ , Metformin grupa:  $p=0,126$ ) (Grafikon 10).



**Grafikon 10.** Vrednosti TG/TBARS u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

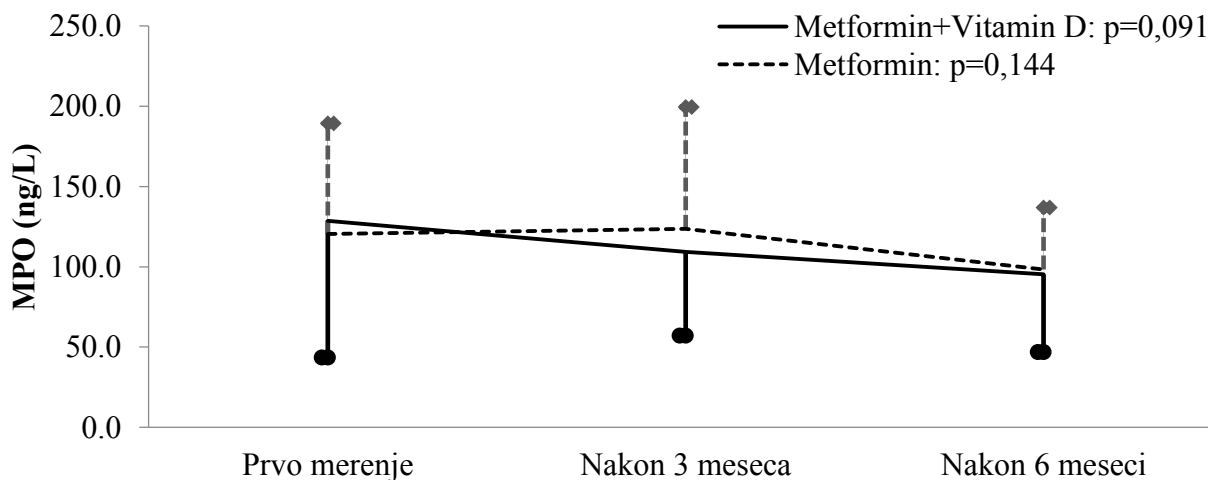
U obema grupama je došlo do statistički značajne promene vrednosti AOPP ( $p<0,001$ ). Vrednosti ovog parametra u prva 3 meseca miruju, a zatim tokom 3 naredna meseca dolazi do statistički značajnog povećanja vrednosti AOPP i u grupi koja je koristila vitamin D i u Metformin grupi ( $p<0,001$ ) (Grafikon 11).



**Grafikon 11.** Vrednosti AOPP u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

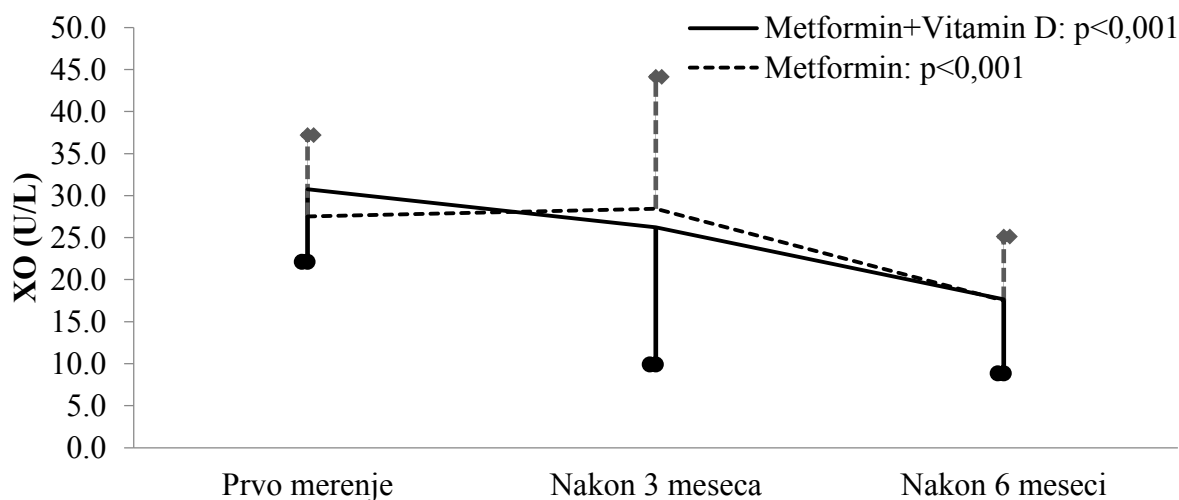


Efekat vremena se pokazao statistički značajan kada su vrednosti MPO u pitanju jer je u celokupnoj populaciji tokom šest meseci došlo do statistički značajnog smanjenja vrednosti ( $p=0,022$ ). Gledano pojedinačno unutar grupa postoji trend smanjenja vrednosti ovog parametra koji nije dostigao statističku značajnost (Metformin+Vitamin D grupa  $p=0,091$ , Meformin grupa  $p=0,144$ ) (Grafikon 12).



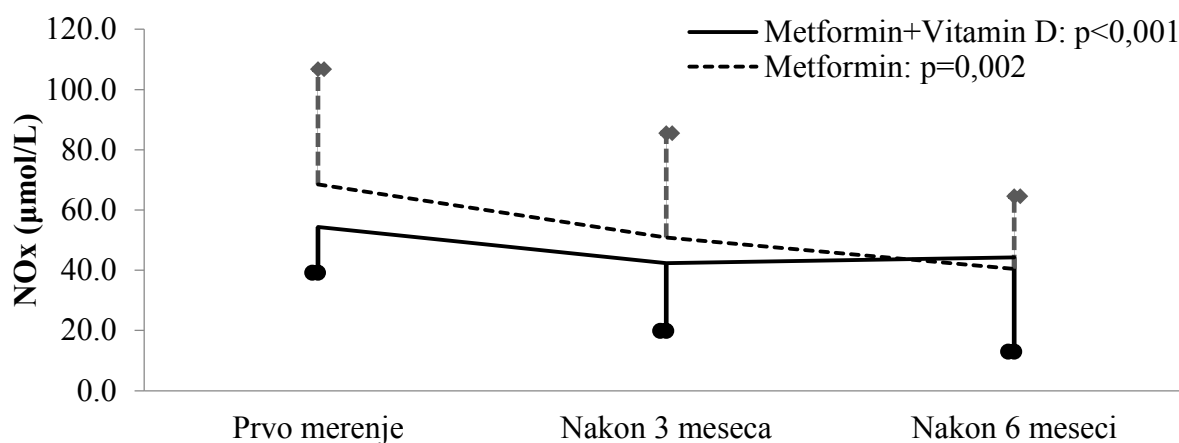
**Grafikon 12.** Vrednosti MPO u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti XO padaju statistički značajno u obe ispitivane grupe ( $p<0,001$ ) tokom 6 meseci. U Metformin grupi vrednosti XO se statistički značajno razlikuju između početnog merenja i merenja nakon 6 meseci ( $p<0,001$ ). U Metformin + Vitamin D grupi vrednosti nakon 6 meseci se statistički značajno razlikuju u odnosu na početne vrednosti ( $p<0,001$ ), ali i u odnosu na vrednosti nakon 3 meseca ( $p<0,001$ ) (Grafikon 13).



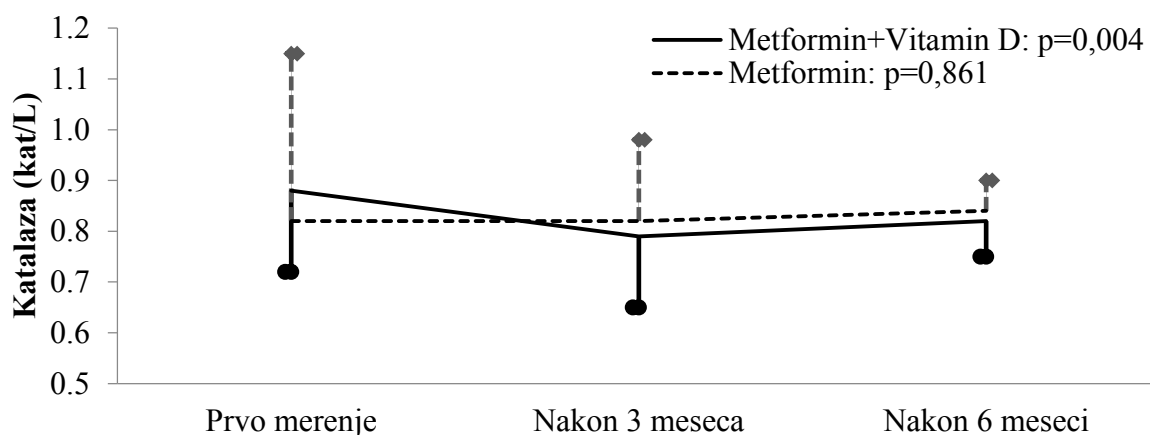
**Grafikon 13.** Vrednosti XO u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Kada su u pitanju vrednosti NOx, efekat vremena se pokazao statistički značajan ( $p < 0,001$ ). U Metformin+Vitamin D grupi postoji statistički značajna razlika između početnih vrednosti i vrednosti nakon 3. meseca ( $p = 0,005$ ). U Metformin grupi vrednosti NOx se takođe statistički značajno menjaju tokom perioda praćenja ( $p = 0,002$ ). Statistički značajna razlika postoji između prvog i drugog merenja ( $p = 0,003$ ), odnosno prvog i trećeg merenja ( $p < 0,001$ ) (Grafikon 14).



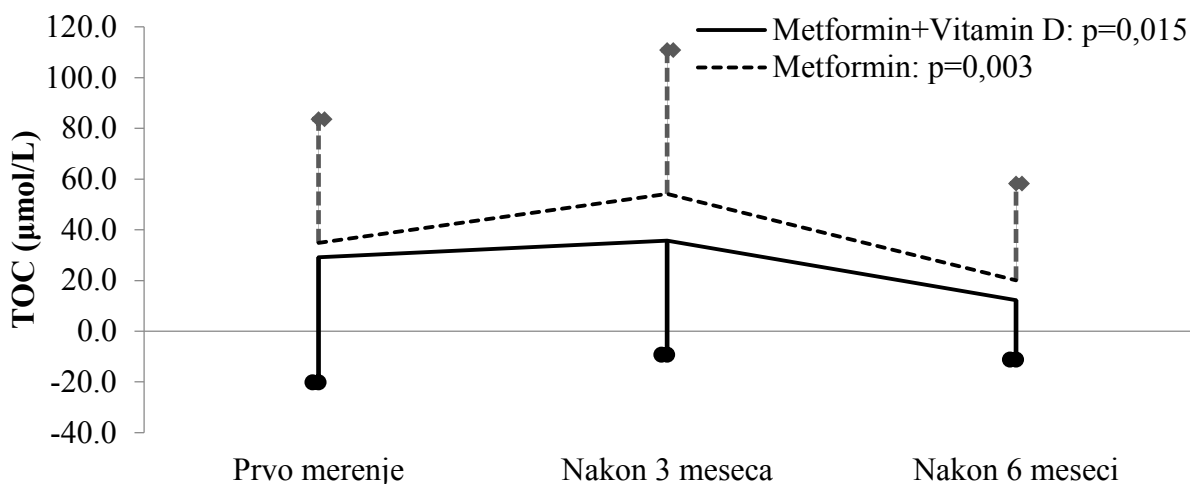
**Grafikon 14.** Vrednosti NADPH oksidaze u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

U Metformin grupi nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima katalaze u periodu od 6 meseci ( $p = 0,861$ ), dok je u Metformin+Vitamin D grupi utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima ovog parametra u periodu od 6 meseci ( $p = 0,004$ ) (Grafikon 15). Post hoc analiza je pokazala da je u Vitamin D + Metformin grupi u prvih 3 meseca došlo do statistički značajnog smanjenja koncentracije katalaze ( $p = 0,007$ ). Između ostalih vremenskih intervala nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ).



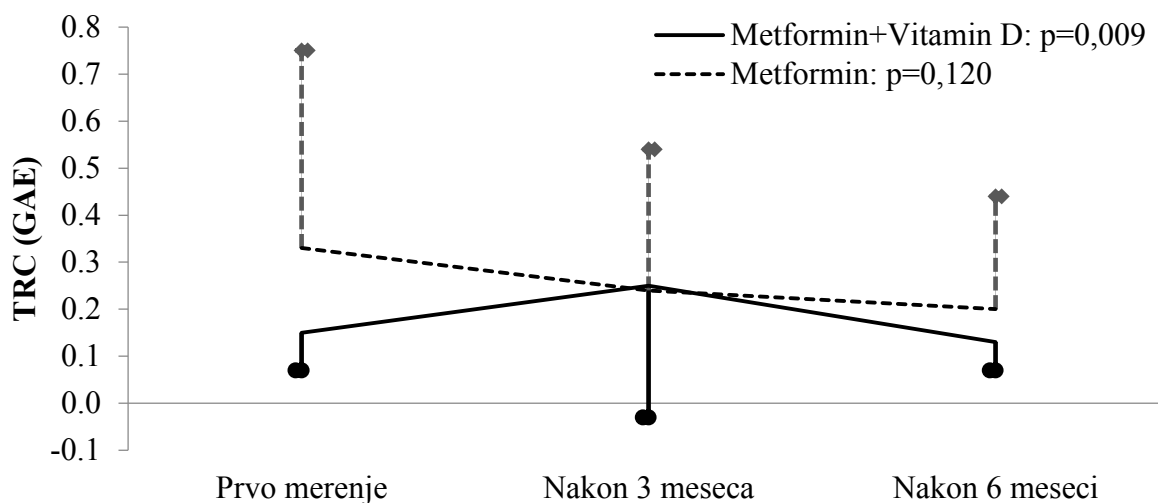
**Grafikon 15.** Vrednosti katalaze u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

U obema grupama dolazi do statistički značajnog smanjenja vrednosti TOC (Vitamin D+Metformin grupa:  $p=0,015$ , odnosno Metformin grupa  $p=0,003$ ). Statistički značajna razlika se postiže između 3. i 6. meseca u obema grupama (Metformin+Vitamin D:  $p=0,009$ , odnosno Metformin  $p=0,004$ ) (Grafikon 16).



**Grafikon 16.** Vrednosti TOC u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

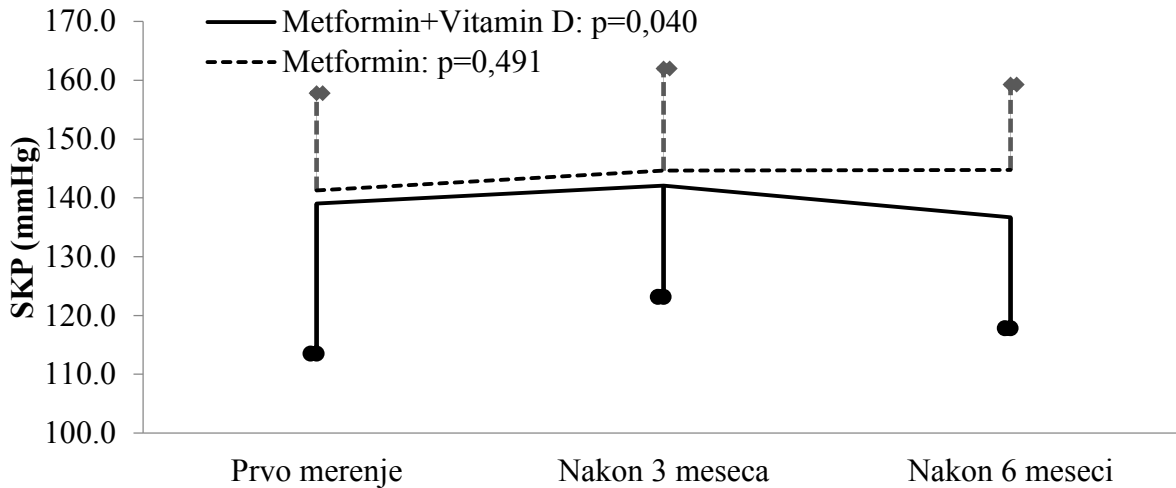
U Metformin grupi vrednosti TRC se ne menjaju statistički značajno u periodu praćenja ( $p=0,120$ ). U Metformin + Vitamin D grupi vrednosti TRC se menjaju statistički značajno tokom perioda praćenja ( $p=0,009$ ). U prvih tri meseca dolazi do blagog povećanja vrednosti ( $p=0,065$ ), a zatim u periodu od trećeg do šestog meseca do statistički značajnog smanjenja vrednosti ( $p=0,017$ ). Vrednosti na kraju perioda praćenja se ne razlikuju statistički značajno u odnosu na početne vrednosti TRC ( $p=0,518$ ) (Grafikon 17).



**Grafikon 17.** Vrednosti TRC u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

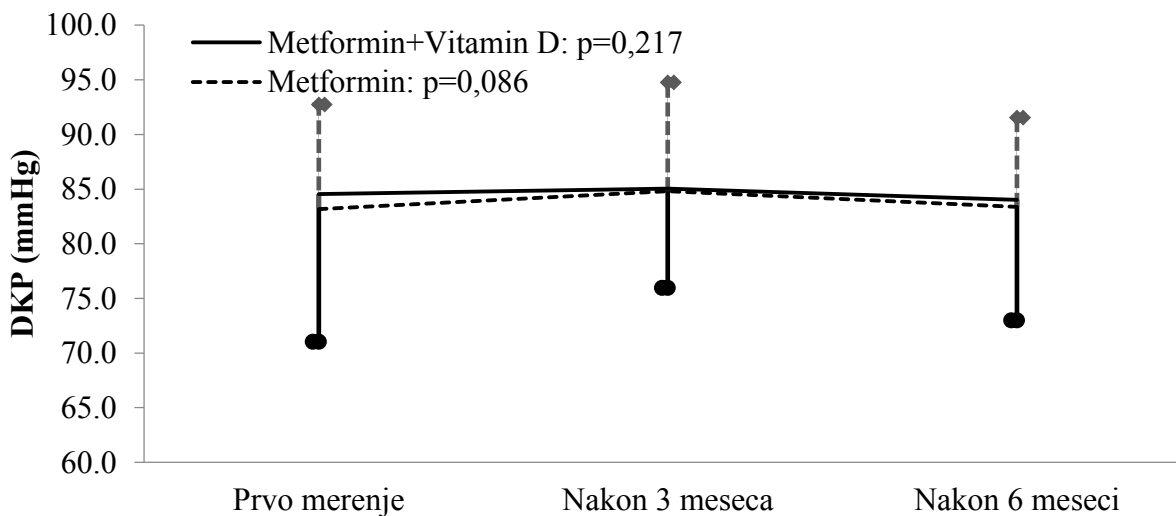
#### 4.8. Rezultati praćenja vrednosti parametara kardiovaskularnog rizika u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci

U grupi koja je primala vitamin D došlo je do statistički značajne promene vrednosti SKP u ispitivanom periodu ( $p=0,040$ ). Statistički značajna razlika u vrednostima SKP je utvrđena u periodu od 3. do 6. meseca ( $p=0,026$ ). U grupi koja je primala samo metformin nije bilo statistički značajne promene vrednosti SKP ( $p=0,491$ ) (Grafikon 18).



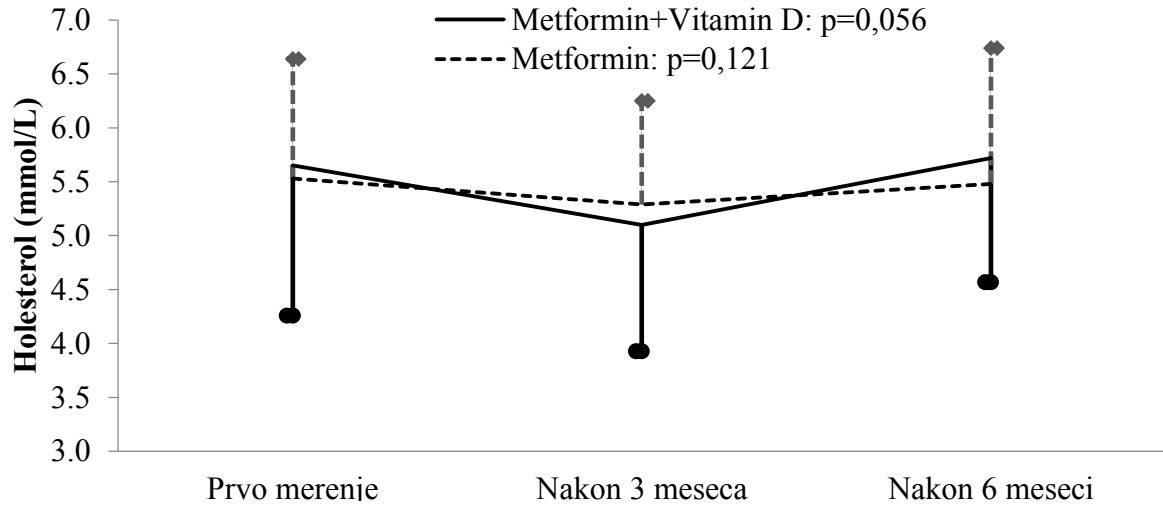
**Grafikon 18.** Vrednosti SKP u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti DKP se nisu menjale statistički značajno u periodu praćenja u grupi koja je primala Metformin + Vitamin D ( $p=0,217$ ), odnosno u grupi koja je primala samo Metformin ( $p=0,086$ ) (Grafikon 19).



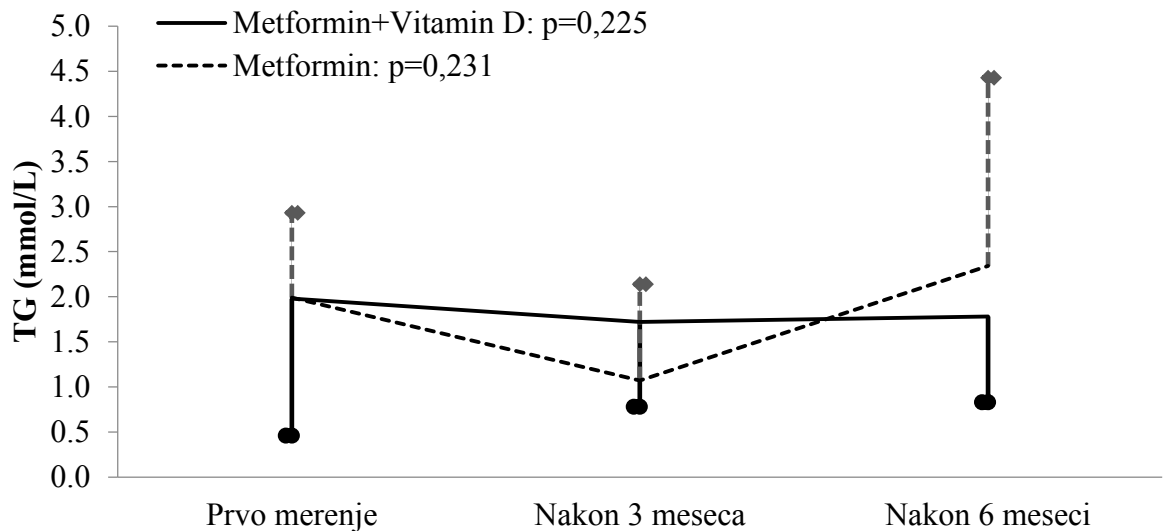
**Grafikon 19.** Vrednosti DKP u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti ukupnog holesterola se ne menjaju značajno u Metformin grupi ( $p=0,121$ ) tokom perioda praćenja, kao ni u grupi koja je primala Metformin + Vitamin D ( $p=0,056$ ) (Grafikon 20).



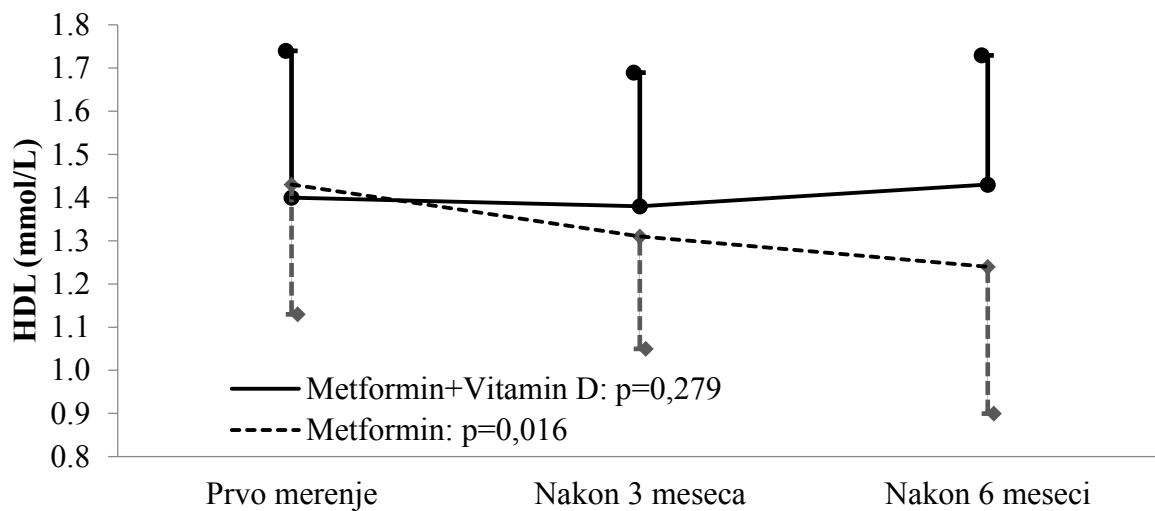
**Grafikon 20.** Vrednosti ukupnog holesterola u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti TG se ne menjaju značajno u Metformin grupi ( $p=0,231$ ) tokom perioda praćenja, kao ni u Metformin + Vitamin D grupi ( $p=0,225$ ) (Grafikon 21).



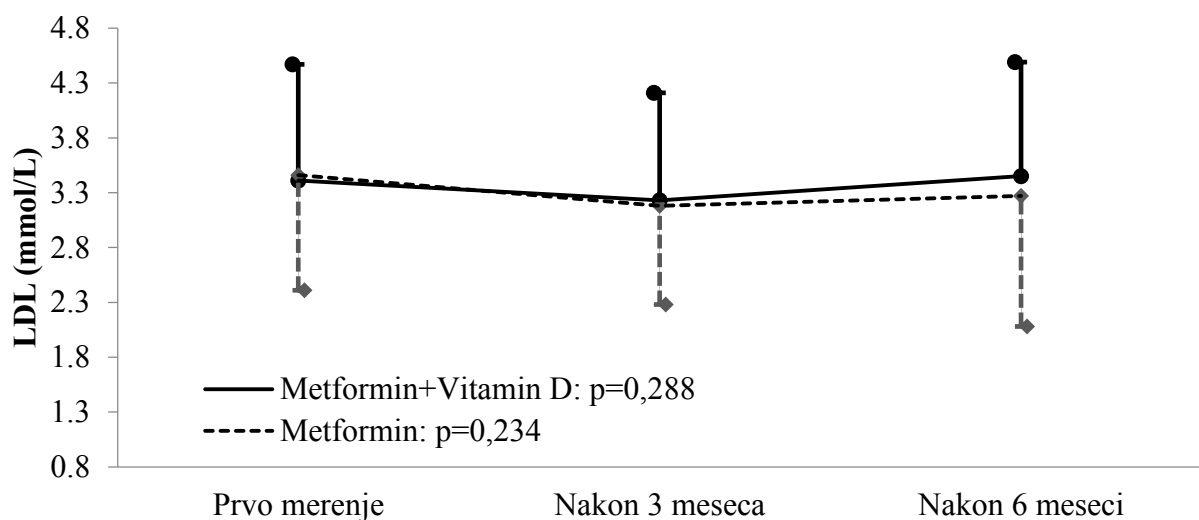
**Grafikon 21.** Vrednosti TG u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

U Metformin grupi se vrednosti HDL holesterola statistički značajno menjaju kroz vreme ( $p=0,016$ ). Vrednosti HDL statistički značajno padaju u prvih 3 meseca ( $p=0,017$ ). U narednih 3 meseca se vrednosti vraćaju skoro na početne ( $p=0,017$ ). U Metformin + Vitamin D grupi vrednosti HDL se ne menjaju statistički značajno u periodu praćenja ( $p=0,279$ ) (Grafikon 22).



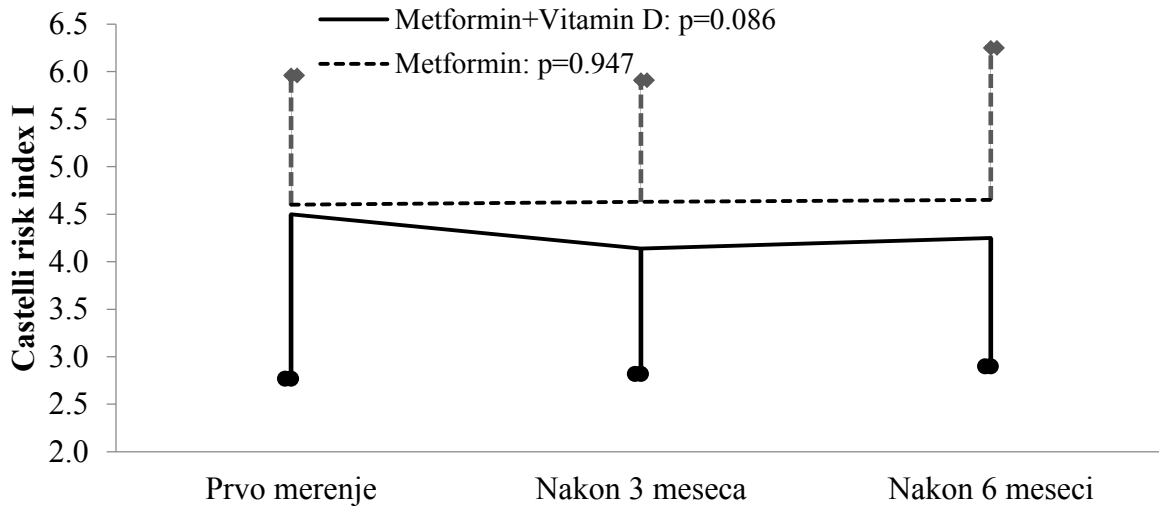
**Grafikon 22.** Vrednosti HDL holesterola u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu –ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti LDL holesterola se ne menjaju značajno u Metformin + Vitamin D grupi ( $p=0,288$ ) tokom perioda praćenja, kao ni u Metformin grupi ( $p=0,234$ ) Grafikon 23.



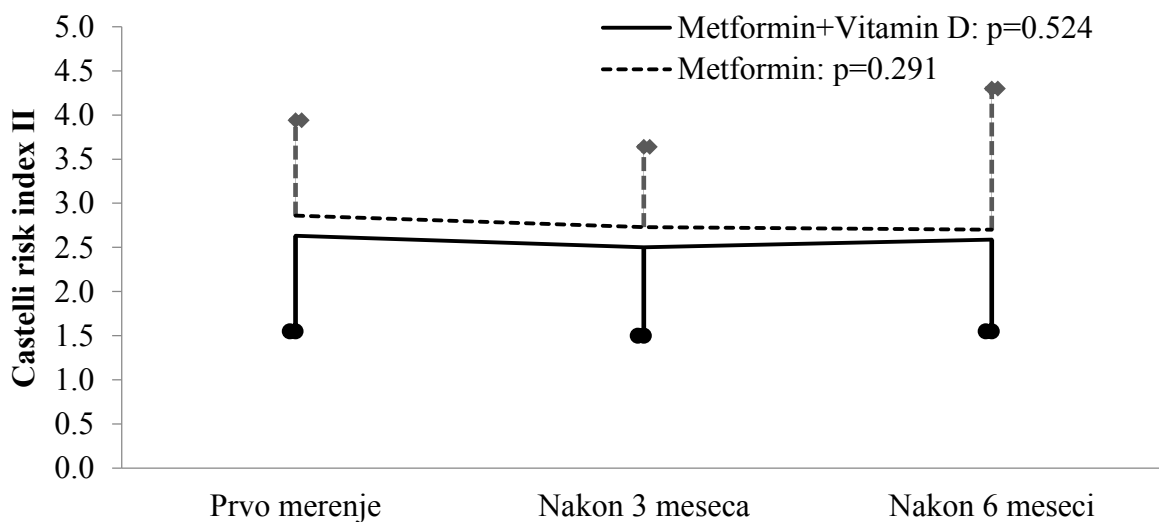
**Grafikon 23.** Vrednosti LDL holesterola u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu –ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti aterogenog indeksa Castelli I se ne menjaju statistički značajno u ispitivanim grupama tokom perioda praćenja (Vitamin D + Metformin grupa:  $p=0,086$ , Metformin grupa:  $p=0,947$ ) (Grafikon 24).



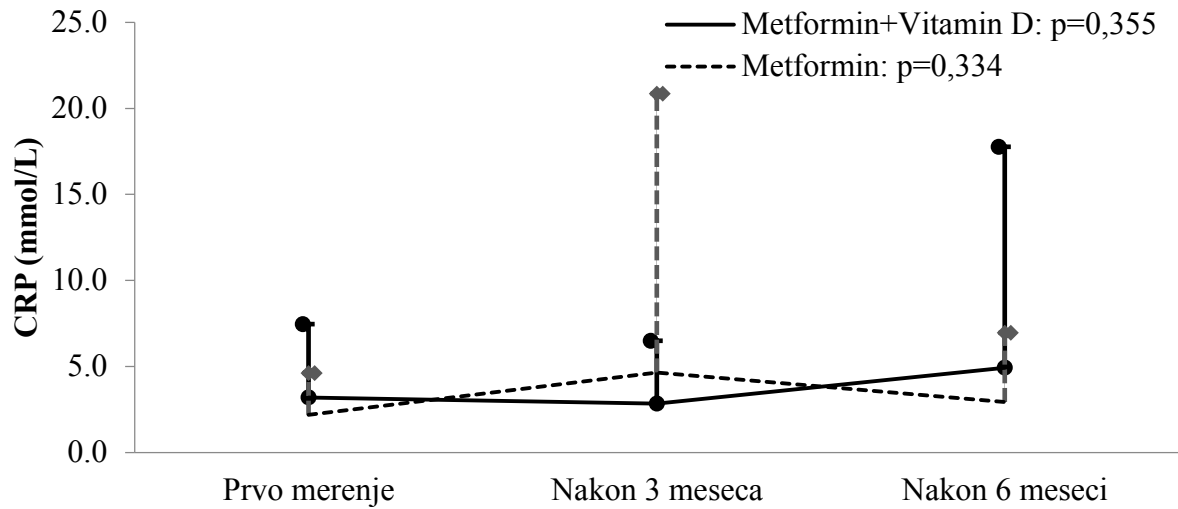
**Grafikon 24.** Vrednosti aterogenog indeksa Castelli I u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu –ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti aterogenog indeksa Castelli II se ne menjaju statistički značajno u ispitivanim grupama tokom perioda praćenja (Vitamin D + Metformin grupa:  $p=0,524$ , Metformin grupa:  $p=0,291$ ) (Grafikon 25).



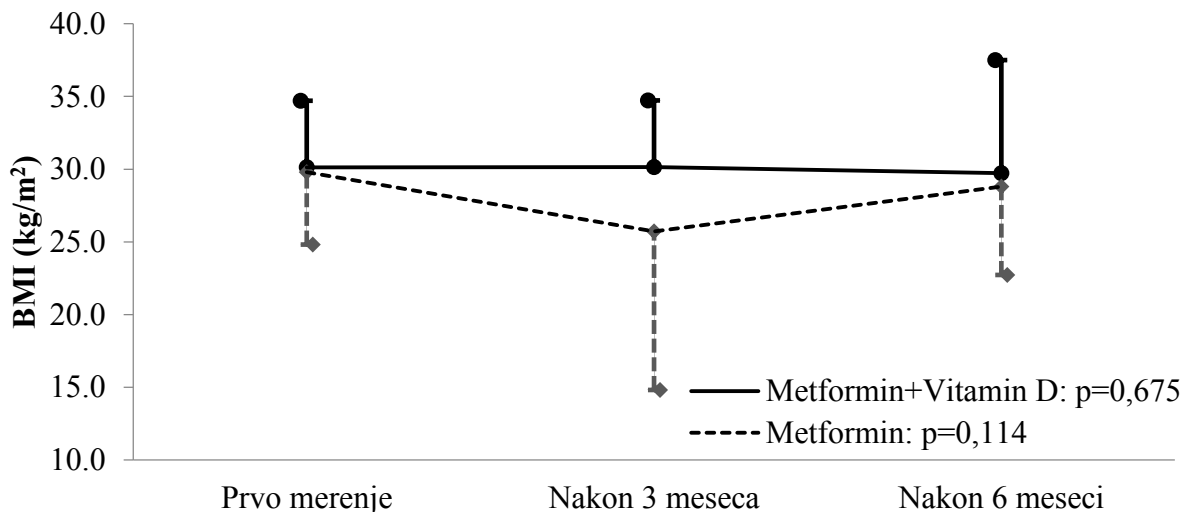
**Grafikon 25.** Vrednosti aterogenog indeksa Castelli II u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

Vrednosti CRP-a se ne menjaju značajno u Metformin + Vitamin D grupi ( $p=0,355$ ) tokom perioda praćenja, kao ni u Metformin grupi ( $p=0,334$ ) (Grafikon 26).



**Grafikon 26.** Vrednosti CRP-a u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

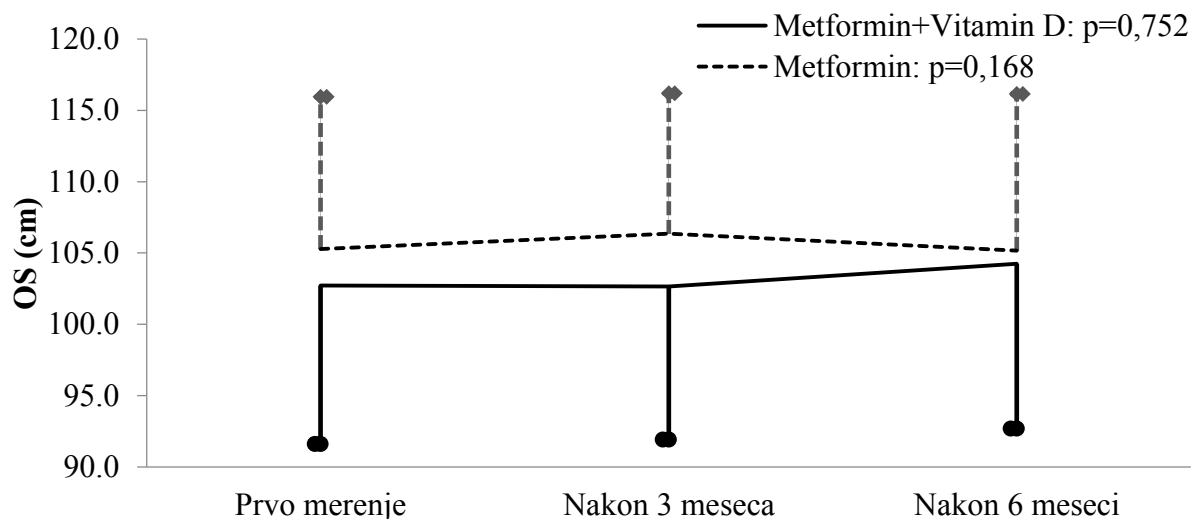
Vrednosti BMI se ne menjaju statistički značajno u periodu praćenja ni u grupi koja je primala Metformin i Vitamin D ( $p=0,675$ ), ni u grupi koja je primala samo Metformin ( $p=0,114$ ) (Grafikon 27).



**Grafikon 27.** Vrednosti BMI u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja



Vrednosti OS se ne menjaju statistički značajno u periodu praćenja u grupi koja je primala Metformin + Vitamin D ( $p=0,752$ ) odnosno u grupi koja je primala samo Metformin ( $p=0,168$ ) (Grafikon 28).



**Grafikon 28.** Vrednosti OS u ispitivanim grupama u periodu od 6 meseci. P vrednost na grafikonu – ANOVA test za ponovljena merenja

#### 4.9. Rezultati analize efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za parametre glikoregulacije tokom perioda praćenja

Statistička analiza je pokazala da za vrednosti HbA1c u periodu od 6 meseci postoji statistički značajan efekat interakcije vreme i ispitivane grupe ( $p=0,033$ ) (Tabela 7).

Takođe, postoji statistički značajan efekat interakcije vreme i ispitivane grupe za vrednosti TYG indeksa ( $p=0,036$ ). Vrednosti TYG indeksa nakon 3 meseca su statistički značajno veće kod pacijenata koji su primali samo Metformin ( $p=0,004$ ). Vrednosti TYG indeksa nakon 6 meseci su statistički značajno veće kod pacijenata koji su primali samo Metformin u odnosu na grupu koja je primala i Vitamin D ( $p=0,030$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Vrednosti parametara glikoregulacije u ispitivanim grupama u periodu praćenja od 6 meseci

	Metformin + Vitamin D grupa			Metformin grupa			p <sup>1</sup>
	0. mesec	3. mesec	6. mesec	0. mesec	3. mesec	6. mesec	
Glikemija našte (mmol/L)	7,86±2,38 7,40 (6,52-8,70)	7,28±1,16 7,35 (6,20-8,10)	7,23±1,26 7,35 (6,12-8,00)	7,92±1,46 7,85 (6,90-8,52)	7,98±1,75 7,85 (6,92-8,48)	7,75±1,51 7,90 (6,90-9,00)	0,071
HbA1c (%)	6,61±1,04 6,35 (5,92-7,10)	6,34±0,71 6,20 (5,80-6,80)	6,54±0,74 6,40 (6,00-7,18)	6,67±0,86 6,50 (6,08-7,22)	6,62±0,83 6,40 (6,00-7,08)	6,88±0,93 6,80 (6,10-7,50)	0,033
Insulinemija (μU/L)	13,20±13,89 11,22 (6,97-14,40)	12,31±6,66 9,81 (7,70-14,74)	11,27±4,93 10,08 (7,65-14,33)	12,36±7,11 11,41 (8,18-16,49)	12,61±11,93 10,26 (6,80-14,63)	11,93±6,57 10,87 (7,25-15,71)	0,628
HOMA-IR	4,63±4,51 3,67 (2,31-4,94)	4,04±2,34 3,63 (2,13-5,15)	3,65±1,74 3,44 (2,25-5,14)	4,42±2,72 3,76 (2,68-5,94)	4,60±5,12 3,39 (2,44-5,11)	4,08±2,43 3,42 (2,22-5,75)	0,491
TYG indeks	9,20±0,75 9,16 (8,78-9,57)	9,07±0,56 9,05 (8,60-9,52)	9,10±0,57 9,15 (8,69-9,50)	9,32±0,52 9,29 (8,95-9,62)	9,42±0,50 9,35 (9,00-9,81)	9,37±0,61 9,29 (8,94-9,79)	0,036

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, odnosno medijana (25.percentil-75.percentil), p - ANOVA za ponovljena merenja – efekat interakcije vreme\*ispitivane grupe

#### 4.10. Rezultati analize efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za parametre oksidativnog stresa tokom perioda praćenja

Kao što je prikazano u Tabeli 8. statistička analiza je pokazala da za parametre oksidativnog stresa nije utvrđen statistički značajan efekat interakcije vreme i ispitivane grupe tokom perioda praćenja.

**Tabela 8.** Vrednosti parametara oksidativnog stresa u ispitivanim grupama u periodu praćenja od 6 meseci

	Vitamin D+Metformin grupa			Metformin grupa			p
	0. mesec	3. mesec	6. mesec	0. mesec	3. mesec	6. mesec	
MDA (TBARS μM/L)	3,73±1,94 3,17 (2,49-4,45)	3,29±1,82 2,97 (2,28-3,46)	3,77±1,96 2,77 (2,35-4,72)	3,62±1,45 3,31 (2,62-4,15)	3,30±0,96 3,07 (2,56-3,88)	4,40±2,760,5 3,00 (2,44-6,46)	0,343
TG/ TBARS	0,56±0,32 0,44 (0,33-0,73)	0,58±0,32 0,48 (0,36-0,64)	0,55±0,28 0,55 (0,32-0,76)	0,60±0,30 0,53 (0,40-0,71)	0,70±0,30 0,62 (0,43-0,83)	0,62±0,34 0,56 (0,35-0,83)	0,496
AOPP (μM)	193,03±147,93 118,14 (92,70-328,00)	253,94±130,48 195,19 (149,08-70,75)	445,09±113,00 474,52 (371,79-526,38)	218,58±162,53 118,38 (101,26-351,79)	216,40±131,95 176,11 (120,34-304,53)	447,72±89,16 440,28 (360,54-524,91)	0,167
MPO (ng/L)	128,54±84,89 99,16 (70,22-130,34)	109,09±51,91 101,66 (83,40-119,00)	95,38±48,34 84,19 (60,17-112,28)	120,40±69,02 102,36 (73,68-163,88)	123,68±75,83 104,60 (82,87-157,59)	98,40±38,56 85,95 (68,92-126,98)	0,450
XO (U/L)	30,75±8,63 25,00 (20,00-32,00)	26,21±16,28 24,45 (19,00-36,00)	17,65±8,82 16,00 (13,75-22,00)	27,51±9,70 30,00 (24,00-36,00)	28,42±15,72 23,00 (15,00-36,50)	17,51±7,62 17,50 (12,25-22,75)	0,296
Katalaza (kat/L)	0,88±0,16 0,86 (0,83-0,91)	0,79±0,14 0,82 (0,74-0,87)	0,82±0,07 0,82 (0,78-0,86)	0,82±0,33 0,85 (0,83-0,90)	0,82±0,16 0,84 (0,73-0,87)	0,84±0,06 0,74 (0,80-0,87)	0,182
NOx (μmol/L)	54,34±15,15 54,80 (45,63-65,13)	42,41±22,53 39,69 (33,86-48,80)	44,25±31,27 47,13 (37,13-59,80)	68,52±38,21 53,80 (45,58-66,80)	50,91±34,54 39,80 (32,47-49,58)	40,49±24,06 43,58 (0,38-51,80)	0,129
TOC (μmol/L)	29,21±49,40 5,83 (0,75-36,66)	35,77±45,05 13,69 (3,14-56,23)	12,30±23,52 5,83 (2,12-10,95)	34,82±48,70 10,34 (1,54-76,37)	54,14±58,68 18,20 (5,30-104,77)	20,03±38,17 6,18 (2,47-14,31)	0,568
TRC (GAE)	0,15±0,08 0,13 (0,10-0,18)	0,25±0,28 0,16 (0,11-0,25)	0,13±0,06 0,12 (0,09-0,16)	0,33±0,42 0,17 (0,12-0,27)	0,24±0,30 0,15 (0,12-0,25)	0,20±0,24 0,12 (0,10-0,19)	0,055

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, odnosno medijana (25.percentil-75.percentil), p – ANOVA za ponovljena merenja – efekat interakcije vreme\*ispitivane grupe

### 4.11. Rezultati analize efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za parametre kardiovaskularnog rizika tokom perioda praćenja

Statistička analiza je pokazala da za vrednosti BMI i OS ne postoji statistički značajan efekat interakcije vreme i ispitivane grupe tokom perioda praćenja ( $p=0,232$ ,  $p=0,350$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Vrednosti parametara kardiovaskularnog rizika u ispitivanim grupama u periodu praćenja od 6 meseci

	Vitamin D+Metformin grupa			Metformin grupa			p
	Baseline	3 meseci	6 meseci	Baseline	3 meseci	6 meseci	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.13±4.58 29,25 (26,49-32,46)	30.14±4.58 29,26 (26,79-33,15)	29.72±7.78 29,56 (26,56-33,10)	29.79±4.98 28,41 (26,66-32,92)	25.73±10.92 28,27 (25,96-32,54)	28.81±6.09 28,45 (26,07-33,35)	0,232
OS (cm)	102,73±11,13 102,00 (97,00-115,25)	102,66±10,72 102,00 (96,00-109,00)	104,24±11,53 103,00 (95,50-108,00)	105,29±10,65 104,00 (97,00-111,25)	106,35±9,86 105,00 (100,00-113,00)	105,16±10,99 104,50 (100,00-1115,75)	0,350
SKP (mmHg)	139,01±25,48 132,50 (118,00-152,25)	142,10±18,92 141,25 (127,00-155,00)	136,68±18,83 138,00 (123,50-150,00)	141,25±16,54 135,50 (127,25-147,25)	144,62±17,38 140,00 (129,50-149,00)	144,76±14,50 145,00 (130,25-158,00)	0,417
DKP (mmHg)	84,55±13,51 82,00 (73,50-91,00)	85,03±9,06 83,75 (78,62-90,00)	84,01±11,01 83,00 (78,00-89,00)	83,18±9,56 80,00 (74,00-85,75)	84,82±9,94 80,00 (75,00-89,50)	83,38±8,16 84,50 (78,50-90,00)	0,074
CRP (mg/L)	3,20±4,25 1,80 (0,69-3,56)	2,84±3,65 1,36 (1,36-3,28)	4,93 ±12,83 1,59 (0,88-3,82)	2,19±2,42 1,36 (0,75-2,81)	4,65±16,21 1,38 (0,69-2,66)	2,93±4,02 1,87 (0,87-3,92)	0,282
Holesterol (mmol/L)	5,65±1,39 5,26 (4,70-6,63)	5,26±1,17 5,10 (4,36-6,08)	5,56±1,15 5,72 (4,75-6,34)	5,53±1,11 5,40 (4,68-6,40)	5,29±0,96 5,30 (4,78-5,90)	5,48±1,26 5,61 (4,21-6,24)	0,694
TG (mmol/L)	1,98±1,52 1,72 (1,04-2,06)	1,72±0,94 1,41 (1,12-2,10)	1,78±0,95 1,70 (1,05-2,14)	1,99±0,94 1,77 (1,31-2,40)	2,19±1,07 1,81 (1,37-2,62)	2,34±2,09 1,88 (1,32-2,72)	0,094
HDL (mmol/L)	1,35 ±0,34 1,35 (1,04-1,62)	1,33±0,31 1,30 (1,09-1,48)	1,38 ±0,30 1,35 (1,14-1,55)	1,26±0,30 1,28 (0,99-1,47)	1,19±0,26 1,20 (1,04-1,40)	1,25 ±0,34 1,21 (1,02-1,45)	0,300
LDL (mmol/L)	3,36 ±1,06 3,14 (2,53-4,14)	3,18±0,98 3,00 (2,38-3,95)	3,40 ±1,04 3,30 (2,73-3,84)	3,41±1,05 3,34 (2,53-4,14)	3,13±0,90 3,19 (2,63-3,74)	3,22 ±1,19 3,20 (2,29-3,99)	0,468
Castelli I indeks	4,50±1,73 3,99 (3,10-5,16)	4,14±1,32 3,75 (3,152-4,87)	4,25±1,35 3,99 (3,33-5,00)	4,60±1,36 4,48 (3,57-5,70)	4,63±1,28 4,23 (3,66-5,47)	4,65±1,60 4,52 (3,66-5,50)	0,228
Castelli II indeks	2,63±1,08 2,42 (1,88-3,29)	2,50±1,00 2,28 (1,77-3,14)	2,59±1,04 2,33 (1,96-3,09)	2,86±1,08 2,80 (2,07-3,74)	2,73±0,91 2,62 (2,08-3,27)	2,70±1,05 2,68 (1,88-3,39)	0,700

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, odnosno medijana (25. percentil-75. percentil), p - ANOVA za ponovljena merenja – efekat interakcije vreme\*ispitivane grupe

Statistička analiza je pokazala da za vrednosti SKP-a, DKP-a i CRP-a ne postoji statistički značajan efekat interakcije vreme i ispitivane grupe tokom perioda praćenja ( $p=0,417$ ,  $p=0,074$ ,  $p=0,282$ ) (Tabela 9).

Slični rezultati su dobijeni i statističkom analizom efekta interakcije vreme i ispitivane grupe za vrednosti ukupnog holesterola, TG-a, HDL-a i LDL-a ( $p=0,694$ ,  $p=0,094$ ,  $p=0,300$ ,  $p=0,468$ ) (Tabela 9).

Statistička analiza je pokazala da za vrednosti indeksa aterogenog rizika (Castell I i Castelli II) ne postoji statistički značajan efekat interakcije vreme i ispitivane grupe tokom perioda praćenja ( $p=0,228$ ,  $p=0,700$ ) (Tabela 9).

## 4.12. Rezultati višestruke linearne regresione analize za period praćenja

### 4.12.1. Vitamin D

Poređenjem srednjih vrednosti vitamina D između grupa utvrđena je statistički značajna razlika nakon 3 meseca ( $39,47$ ,  $p<0,001$ ) i nakon 6 meseci ( $36,51$ ,  $p<0,001$ ) korigovano za početne vrednosti godina starosti, BMI i pola (Tabela 10).

**Tabela 10.** Razlika u vrednostima vitamina D nakon 3 i 6 meseci u odnosu na početne vrednosti

	Nakon 3 meseca		Nakon 6 meseci	
	Korigovani B $\pm$ 95%CI	p	Korigovani B $\pm$ 95%CI	p
Vitamin D (mol/L)	39,47 (31,22-47,71)	<0,001	36,51 (28,96-44,06)	<0,001

Korigovani B za početne vrednosti godina starosti, BMI i pola

### 4.12.2. Parametri glikoregulacije

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima glikemije našte nakon 3 meseca ( $-0,68$ ,  $p=0,027$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 6 meseci ta razlika nije statistički značajna ( $-0,50$ ,  $p=0,098$ ) (Tabela 11).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima TYG indeksa nakon 3 meseca ( $-0,36$ ,  $p=0,001$ ) i nakon 6 meseci ( $-0,30$ ,  $p=0,017$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola (Tabela 11).

Za ostale parametre (HbA1c, insulinemija, HOMA-IR) među grupama nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima nakon 3 ( $p=0,094$ ,  $p=0,665$ ,  $p=0,355$ ), niti nakon 6 meseci ( $p=0,083$ ,  $p=0,454$ ,  $p=0,168$ ) (Tabela 11).

Razlika vrednosti između ispitivanih grupa za HbA1c se statistički značajno razlikuju ukoliko je korigovano samo za starost i BMI ( $-0,35$ , 95%CI  $-0,68-0,10$ ,  $p=0,043$ ). Ukoliko je u model uključen i pol gubi se statistički značajna razlika ( $p=0,083$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Razlika u vrednostima parametara glikoregulacije nakon 3 i 6 meseci u odnosu na početne vrednosti

	Nakon 3 meseca			Nakon 6 meseci		
	Korigovani B	$\pm 95\%CI$	p	Korigovani B	$\pm 95\%CI$	p
Glikemija našte (mmol/L)	-0,68	(-1,27 - -0,08)	0,027	-0,50	(-1,10 - 0,10)	0,098
HbA1c (%)	-0,26	(-0,56 - 0,04)	0,094	-0,30	(-0,64 - 0,04)	0,083
Insulinemija ( $\mu U/L$ )	-0,82	(-4,56 - 2,92)	0,665	-0,84	(-3,04 - 1,37)	0,454
HOMA-IR	-0,74	(-2,31 - 0,84)	0,355	-0,66	(-1,59 - 0,28)	0,168
TYG indeks	-0,36	(-0,58 - -0,15)	0,001	-0,30	(-0,54 - -0,06)	0,017

Korigovani B za početne vrednosti godina starosti, BMI i pola

#### 4.12.3. Parametri oksidativnog stresa

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima TG/TBARS nakon 3. meseca ( $-0,13$ ,  $p=0,049$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 6 meseci ta razlika nije statistički značajna ( $-0,08$ ,  $p=0,213$ ) (Tabela 12).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima MPO samo nakon 6 meseci ( $-33,40$ ,  $p=0,001$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 3. meseca ta razlika nije statistički značajna ( $18,62$ ,  $p=0,200$ ) (Tabela 12).

Za ostale parametre (MDA, AOPP, XO, katalaza,  $NO_x$ , TOC i TRC) među grupama nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima nakon 3 ( $p=0,831$ ,  $p=0,101$ ,  $p=0,909$ ,  $p=0,678$ ,  $p=0,372$ ,  $p=0,109$ ,  $p=0,901$ ), niti nakon 6 meseci ( $p=0,330$ ,  $p=0,941$ ,  $p=0,423$ ,  $p=0,207$ ,  $p=0,377$ ,  $p=0,208$ ,  $p=0,079$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Razlika u vrednostima parametara oksidativnog stresa nakon 3 i 6 meseci u odnosu na početne vrednosti

	Nakon 3 meseca			Nakon 6 meseci		
	Korigovani B	±95%CI	p	Korigovani B	±95%CI	p
MDA (TBARS $\mu\text{M/L}$ )	-0,61	(-0,63 - 0,505)	0,831	-0,50	(-1,51 - 0,51)	0,330
TG/TBARS	-0,13	(-0,25 - 0,00)	0,049	-0,08	(-0,21 - 0,05)	0,213
AOPP ( $\mu\text{M}$ )	44,57	(-8,82 - 94,96)	0,101	-1,55	(-42,86 - 39,77)	0,941
MPO (ng/L)	18,62	(-10,01 - 47,24)	0,200	-33,40	(-52,73 - 14,08)	0,001
XO (U/L)	0,37	(-6,04 - 6,77)	0,909	-1,53	(-5,32 - 2,25)	0,423
Katalaza (kat/L)	-0,01	(-0,07 - 0,05)	0,678	-0,02	(-0,04 - 0,01)	0,207
NOx ( $\mu\text{mol/L}$ )	-5,36	(-17,22 - 6,45)	0,372	4,97	(-6,15 - 16,11)	0,377
TOC ( $\mu\text{mol/L}$ )	-16,67	(-37,09 - 3,75)	0,109	-8,42	(-21,60 - 4,77)	0,208
TRC (GAE)	-0,007	(-0,12 - 0,11)	0,901	-0,06	(-0,14 - 0,08)	0,079

Korigovani B za početne vrednosti starosti, BMI i pola

#### 4.12.4. Parametri kardiovaskularnog rizika

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima BMI-a nakon 3 meseca (4,09,  $p=0,026$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 6 meseci ta razlika nije statistički značajna (0,48,  $p=0,715$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima OS nakon 3 meseca (-3,32,  $p=0,002$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 6 meseci ta razlika nije statistički značajna (-0,21,  $p=0,924$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima SKP-a nakon 3 meseca (0,03,  $p=0,993$ ), kao ni nakon 6 meseci (-5,43,  $p=0,155$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima DKP-a nakon 3 meseca (1,42,  $p=0,471$ ), kao ni nakon 6 meseci (-1,44,  $p=0,474$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima CRP-a nakon 3 meseca (-1,69,  $p=0,753$ ), kao ni nakon 6 meseci (1,67,  $p=0,530$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima ukupnog holesterola nakon 3 meseca (-0,19,  $p=0,293$ ), kao ni nakon 6 meseci (0,08,  $p=0,732$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima TG-a nakon 3 meseca (-0,50,  $p=0,005$ ), kao i nakon 6 meseci (-0,57,  $p=0,027$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima HDL-a samo nakon 6 meseci (0,13,  $p=0,024$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 3 meseca ta razlika nije statistički značajna (-0,29,  $p=0,425$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima ukupnog LDL-a nakon 3 meseca (-0,56,  $p=0,320$ ), kao ni nakon 6 meseci (0,17,  $p=0,366$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima aterogenog indeksa Castelli I nakon 3 meseca (-0,43,  $p=0,032$ ) korigovano za početne vrednosti starosti, BMI i pola, dok nakon 6 meseci ta razlika nije statistički značajna (-0,28,  $p=0,241$ ) (Tabela 13).

Statističkom analizom utvrđeno je da između grupa ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima aterogenog indeksa Castelli II nakon 3 meseca (-0,14,  $p=0,364$ ), niti nakon 6 meseci (0,07,  $p=0,666$ ) (Tabela 13).



**Tabela 13.** Razlika u vrednostima parametara kardiovaskularnog rizika nakon 3 i 6 meseci u odnosu na početne vrednosti

	Nakon 3 meseca			Nakon 6 meseci		
	Korigovani B±95%CI		p	Korigovani B±95%CI		p
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	4,09	(0,49 - 7,68)	0,026	0,48	(-2,11 - 3,06)	0,715
OS (cm)	-3,32	(-5,41 - -1,12)	0,002	-0,21	(-4,63 - 4,21)	0,924
SKP (mmHg)	0,03	(-7,44 - 7,51)	0,993	-5,43	(-12,96 - 2,09)	0,155
DKP (mmHg)	1,42	(-2,47 - 5,30)	0,471	1,44	(-2,53 - 5,41)	0,474
CRP (mg/L)	-1,69	(-6,63 - 3,26)	0,753	1,67	(-1,98 - 5,32)	0,530
Holesterol (mmol/L)	-0,19	(-0,64 - 0,25)	0,293	0,08	(-0,40 - 0,55)	0,732
TG (mmol/L)	-0,50	(-0,91 - -0,10)	0,005	-0,57	(-1,26 - 0,11)	0,027
HDL (mmol/L)	-0,29	(-1,14 - 0,56)	0,425	0,13	(0,01 - 0,25)	0,024
LDL (mmol/L)	-0,56	(1,58 - 0,46)	0,320	0,17	(-0,29 - 0,63)	0,366
Castelli I	-0,43	(-0,82 - -0,04)	0,032	-0,28	(-0,74 - 0,19)	0,241
Castelli II	-0,14	(-0,45 - 0,17)	0,364	0,07	(-0,25 - 0,38)	0,666

Korigovani B za početne vrednosti starosti, BMI i pola

## 5. DISKUSIJA

U ovom istraživanju analiziran je uticaj šestomesečne suplementacije vitaminom D na parametre glikoregulacije, oksidativnog stresa i kardiovaskularnog rizika kod pacijenata obolelih od DM tipa 2 koji su lečeni metforminom. Dobijeni rezultati su pokazali da je vitamin D doveo do značajnog sniženja vrednosti glikemije našte nakon 3 meseca suplementacije. Značajan efekat zabeležen je i za vrednosti HbA1c nakon 6 meseci suplementacije vitaminom D korigovano za godište i BMI. Suplementacija vitaminom D je pokazala značajan uticaj i na vrednosti TYG indeksa koji predstavlja marker IR (108), dok za HOMA-IR indeks značajan efekat nije zabeležen tokom perioda praćenja.

Nedavno objavljena meta-analiza autora Hu i sar. koja je obuhvatila 19 randomizovanih kliničkih istraživanja nije pokazala značajnu razliku u vrednostima parametara glikoregulacije u grupi koja je primala vitamin D u odnosu na grupu koja je primala placebo. Međutim, analiza podgrupa je pokazala povoljan efekat vitamina D na vrednosti HbA1c, HOMA-IR indeksa i insulinemije našte kod ispitanika kod kojih je suplementacija bila kratkoročna, dok u podgrupi pacijenata sa dužim periodom suplementacije (duže od 3 meseca) nije zabeležen povoljan uticaj vitamina D (59). Slične rezultate o uticaju vitamina D na parametre glikoregulacije su dobili Nigil Haroon i sar. sistematskim pregledom i analizom 10 kratkoročnih istraživanja sa periodom suplementacije od 3 meseca (109). U našem istraživanju izostanak povoljnog efekta vitamina D na glikemiju našte i nakon 6 meseci suplementacije, kao i neubedljiv efekat na HbA1c možemo objasniti smanjenjem doze vitamina D nakon 3 meseca suplementacije što je dovelo i do pada serumskog nivoa vitamina D kod ispitanika. Pretpostavljamo da je na pad uticala i smena godišnjih doba, tj promena klimatskih uslova i smanjeno izlaganje UV zracima koje dovodi do smanjenja endogene produkcije vitamina D. Pored toga, životne i prehrambene navike se takođe menjaju tokom godišnjih doba što može uticati na pogoršanje metaboličke kontrole. Kod dugoročnih istraživanja sama percepcija tretmana i motivacija za istim se menja kod ispitanika.

Istraživanja koja su ispitivala uticaj vitamina D na IR su u većini slučajeva koristila kao marker HOMA-IR indeks. Talaei i sar. su zaključili da vitamin D pokazuje značajno poboljšanje IR kod pacijenata čije su vrednosti 25(OH)D3 u krvi bile između 100 i 150 nmol/L (110). U našem istraživanju primenjen je individualan način doziranja za svakog ispitanika prema ES smernicama, a na osnovu početnih vrednosti vitamina D u serumu. Tako su ispitanici koji su na početku imali vitamin D deficijenciju (nivo vitamina  $D \leq 50$  nmol/L)

dobijali 7142 IJ vitamina D na dan, odnosno 50 000 IJ nedeljno prva 3 meseca. Nakon toga doza je smanjena na dozu održavanja koja je iznosila 2000 IJ dnevno što, kako se ispostavilo, nije bilo dovoljno da održi serumske nivoe vitamin D iznad 100 nmol/L koji su, kako tvrde Talaei i sar., potrebni da bi se ispoljili vanskeletni efekt (110). To može biti jedan od razloga zbog čega nismo dobili značajan efekat vitamina D na vrednosti insulinemije naše i HOMA-IR indeksa tokom perioda praćenja. Drugi razlog može biti nedovoljna osetljivost samog HOMA-IR indeksa kao markera IR, s obzirom da smo između grupa dobili statistički značajnu razliku u vrednostima TYG indeksa nakon 3 i nakon 6 meseci. Po autorovom saznanju, ovo je prvo istraživanje u kom je kao marker IR pored HOMA-IR indeksa korišćen i TYG indeks kako bi se ispitaio uticaj suplementacije vitaminom D na IR kod pacijenata sa DMT2. U istraživanju sprovedenom u Brazilu kod 82 ispitanika sa različitim stepenom glukozne tolerancije TYG indeks se pokazao kao bolji marker IR u odnosu na HOMA-IR indeks, potvrđeno preko hiperinsulinemijsko-euglikemskog klamp metoda (111). Takođe, moguće je da suplementacija vitaminom D ima povoljan uticaj samo kod pacijenata koji su vitamin D-deficijentni, posebno kod onih sa lošom glikemijskom kontrolom (112, 113). U našem istraživanju većina ispitanika je imala dobru glikoregulaciju ( $HbA1c \leq 7\%$ ), a oko 60 % ispitanika u Metformin + Vitamin D grupi je imalo deficijenciju vitamina D (nivo vitamina D  $\leq 50$  nmol/L). Sa druge strane, Krul-Poel i sar. su pokazali da kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom vitamin D nije doveo do poboljšanja parametara glikoregulacije. U pomenutom istraživanju pacijenti su dobijali oralnu dozu vitamina D od 50 000 IJ jednom mesečno, što može uticati na drugačiji ishod nego u slučaju da su korišćene jednake dnevne doze vitamina D (114,115).

Brojna istraživanja su pokazala povezanost oksidativnog stresa i DMT2 kao i metaboličkog sindroma. Smatra se da oksidativni stres igra bitnu ulogu u nastanku poremećaja periferne insulinske senzitivnosti i sekrecije insulina. Novija istraživanja upućuju na to da bi vitamin D mogao imati antioksidativno dejstvo, tj. da bi mogao dovesti do smanjenja oksidativnog stresa, ali još uvek ne postoje potpuno usaglašeni naučni dokazi. (116,117). Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali povoljan efekat vitamina D na produkte oksidativne modifikacije lipida i proteina (MDA i AOPP), mada su pacijenti koji su primali vitamin D imali tendenciju sniženja vrednosti MDA za razliku od pacijenata Metformin grupe. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživača Eftekhari i sar. (118). Sa druge strane, Sepidarkish i sar. su sprovedeli meta-analizu čiji su rezultati pokazali da vitamin D može dovesti do sniženja vrednosti MDA, ali samo u grupi kod koje je vitamin D doziran

dvonedeljno u opsegu između 100 000 IJ i 200 000 IJ mesečno. Doze ispod 100 000 IJ i preko 200 000 IJ nisu se pokazale učinkovitim kada je u pitanju uticaj vitamina D na vrednosti markera lipidne peroksidacije. Razliku u rezultatima možemo objasniti različitim doziranjem i načinom primene vitamina D, kao i obuhvaćenom populacijom jer je pomenuta meta-analiza obuhvatila istraživanja kako sa zdravim ispitanicima tako i sa pacijentima koji su bolovali od hroničnih bolesti (119). Za razliku od vrednosti MDA, vrednosti TG/TBARS indeksa su bile značajno niže nakon 3 meseca suplementacije u Vitamin D+Metformin grupi. Ovakvi rezultati ukazuju na smanjenje potencijalnih oksidabilnih supstrata u grupi koja je primala vitamin D. To može biti zahvaljujući lipofilnom dejstvu vitamina D, čime možemo pravdati i izostanak efekta na markere oksidativne modifikacije proteina (AOPP).

Kada je u pitanju uticaj na enzime koji učestvuju u genezi slobodnih radikala, naši rezultati su pokazali da je vitamin D povoljno uticao na vrednosti MPO nakon 3 i nakon 6 meseci suplementacije, dok na vrednosti XO nije ispoljio značajan efekat. Prema autorovom saznanju ovo je prva studija koja je ispitivala uticaj vitamina D istovremeno na oba enzima (MPO, XO) kod pacijenata sa DMT2. Takođe, malo je istraživanja koja su se uopšte bavila uticajem vitamina D na aktivnosti pomenutih enzima pojedinačno. Jedno takvo istraživanje je ispitivalo uticaj konzumiranja vitaminom D obogaćenog jogurta kod pacijenata obolelih od DMT2. Rezultati se u jednom delu slažu sa našim rezultatima, jer je unutar grupe koja je konzumirala vitaminom D obogaćeni jogurt došlo do značajnog sniženja aktivnosti MPO. Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na grupu koja je konzumirala običan jogurt, što se može pravdati korišćenjem manjih doza vitamina D (500 IJ na dan) u odnosu na doze koje su koristili ispitanici u našem istraživanju (7120 IJ ili 2000 IJ na dan) (120). Postoji obilje naučnih podataka koji ukazuju da pored enzima NADPH-oksidade, enzim MPO igra bitnu ulogu u procesu nastanka i razvoja ateroskleroze. Oba enzima učestvuju u stvaranju različitih RVK. Reakcija započinje spajanjem NADPH-oksidade sa plazma membranom, što dovodi do redukcije elektrona u molekularnom kiseoniku i oslobađanja  $\bullet\text{O}_2$  – koji se transformiše u  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zatim, neutrofilna MPO pretvara  $\text{H}_2\text{O}_2$  u HOCL koja ima oksidativna svojstva i pomaže u uništavanju mikroba i malignih ćelija. U različitim ćelijama i različitim stanjima organizma postoji i različita ekspresija izoformi NADPH-oksidade. Određene izoforme ovog enzima nalaze se u ćelijama endotela i njihova aktivnost se pojačava u patofiziološkim uslovima (121-123). Smatra se da povećana koncentracija LDL holesterola pojačava aktivnost određenih izoformi NADPH-oksidade, što posledično dovodi do povećanog stvaranja RVK. Na taj način povećava se transcitoza LDL holesterola i stepen njegove

oksidacije u endotelnim ćelijama. Dolazi i do drugih vaskularnih promena koje podrazumevaju adheziju makrofaga i akumulaciju penastih ćelija (124). Sa druge strane, MPO kao pro-oksidativni enzim uključen u patogenezu ateroskleroze dovodi do modifikacije čestica lipoproteina, naročito aterogenog LDL lipoproteina. Tako struktura apoproteina i lipidno jezgro dobijaju aterogeniju formu koja „zaobilazi“ LDL receptorom kontrolisano preuzimanje ovih molekula što dovodi do povećanog stvaranja penastih ćelija. Međutim oksidativnog oštećenja postaju i drugi molekuli kao što su nezasićene masne kiseline, fosfolipidi, cirkulišuće forme lipoproteina. Oksidativnom modifikacijom HDL holesterola dolazi do stvaranja disfunkcionalne forme ovog molekula (125-130). Oksidativno modifikovani derivati tirozina takođe igraju bitnu ulogu u procesu nastanka ateroskleroze jer su zajedno sa MPO i penastim ćelijama nađeni u aterosklerotskim lezijama. MPO stimuliše i produkciju kolagena što doprinosi remodelovanju ekstracelularnog matriksa. Rezultati koje smo dobili u ovom istraživanju mogu donekle pomoći u rasvetljavanju mehanizma antioksidativnog i antiinflamatornog dejstva vitamina D, jer se po prvi put pokazalo da suplementacija vitaminom D može povoljno uticati na enzim koji direktno učestvuje kako u produkciji slobodnih radikala tako i u inflamaciji posredovanom procesu aterosklerotskog oštećenja endotela. To bi značilo da suplementacija vitaminom D može biti veoma značajna strategija u borbi protiv nastanka i progresije kardiovaskularnih bolesti jer štiti koronarne arterije od aterosklerotskih oštećenja endotela (131-136).

Još jedan bitan faktor od čije produkcije i bioraspoloživosti zavisi pravilno funkcionisanje endotela je NO. U manjim koncentracijama ovaj molekul ima povoljan efekat, dovodi do vazodilatacije i sniženja KP, sprečava agregaciju i adheziju trombocita, ograničava oksidaciju LDL holesterola, inhibira proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i smanjuje ekspresiju proinflamatornih gena povezanih sa aterosklerozom. U većim koncentracijama NO interaguje sa  $\bullet\text{O}_2$  – formirajući peroksinitrit koji je snažan oksidant i dovodi do značajnih oštećenja mnogih tkiva. Regulacija metabolizma NO je naročito bitna kod pacijenata sa DM2, tim pre što je aktivacija NOS pod kontrolom insulina. Na taj način IR može dovesti do poremećaja stvaranja NO, a to posledično utiče i na vaskularni odgovor dovodeći do endotelne disfunkcije. Istraživanja su zabeležila smanjeno izlučivanje NO produkata kao što su nitrati i nitriti (zajednički naziv NOx) kod pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom (137). Meta-analiza koja je imala za cilj da ispita nivoe NOx kod pacijenata sa DM1 i DM2 pokazala je da su nivovi ovih azotnih produkata kod njih povišeni, što govori u prilog hipotezi da su visoke vrednosti NOx povezane sa štetnim kliničkim događajima koji prate pacijente sa dijabetesom a u koje

spadaju pojava endotelne disfunkcije, IR i disfunkcije  $\beta$  ćelija pankreasa (138). Endotelna disfunkcija je jedan od najranijih događaja u procesu ateroskleroze. Sve endotelne ćelije ispoljavaju VDR koji je esencijalan za delovanje vitamina D. Vezivanjem za ovaj receptor vitamin D ostvaruje veoma bitnu ulogu u regulaciji NOs utičući na taj način na bioraspoloživost NO (139). Nekoliko studija je pokazalo da suplementacija vitaminom D dovodi do poboljšanja endotelne disfunkcije kod pacijenata sa DMT2. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali povoljan efekat vitamina D na NO mereno koncentracijom NOx što su pokazali i rezultati meta-analize koja je ispitivala uticaj vitamin D suplementacije na parametre oksidativnog stresa. Ista analiza je pokazala da je efekat vitamina D na NO dozno zavisna jer je povoljan uticaj zabeležen samo kod grupe pacijenata koji su primali između 100 000 i 200 000 IJ (119). Smanjenje doza vitamina D nakon prva tri meseca sa 50 000 IJ na 14 000 IJ nedeljno moglo bi objasniti izostanak povoljnog efekta vitamina D na koncentraciju NOx u našem istraživanju.

Istraživanja su pokazala da je kod pacijenata sa DMT2 povećana aktivnost enzima XO. Ovaj enzim učestvuje u katabolizmu purina, katalizujući terminalnu oksidaciju hipoksantina u ksantin i mokraćnu kiselinu. U toku reakcija dolazi do produkcije slobodnih radikala,  $\bullet\text{O}_2$  – i  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji zajedno sa hiperurikemijom dovode do oštećenja endotela i potpešuju nastanak ateroskleroze. U tom procesu aktivnost NADPH-oksidaze se nadovezuje na aktivnost XO i obratno. Sa druge strane povećana aktivnost XO dovodi do inhibicije enzima NOS i produkcije NO što posledično dovodi do vazospazma i kardijalne ishemije. To potvrđuju i istraživanja koja su pokazala da inhibicijom aktivnosti enzima XO možemo dovesti do poboljšanja funkcije endotela kod pacijenata sa DMT2 (140-142).

O uticaju vitamina D na aktivnost XO kod pacijenata sa DMT2 ne postoji puno podataka u naučnoj literaturi. Moguće objašnjenje za izostanak povoljnog uticaja vitamina D, tj. nepostojanje značajne razlike u vrednostima XO između grupa u našem istraživanju može biti dobra metabolička kontrola kod ispitanika jer hiperglikemija predstavlja jedan od stimulusa koji pokreće oslobađanje XO iz inflamacijom oštećenih ćelija endotela (143,144). Druga dva stimulusa su hipoksija i hiperholesterolemija (145,146). Istraživanja su pokazala da postoji još faktora koji mogu uticati na aktivnost XO, a jedan od njih je i metformin. Čosić i sar. su pokazali da je metformin kod pacijenata sa DMT2 doveo do značajnog pada aktivnosti XO za razliku od skromnog pada u vrednostima glikemije (147).

Antioksidativni status kod naših ispitanika je određivanjem antioksidativnog enzima katalaze koja predstavlja glavni regulator degradacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (148). Ovaj enzim uklanja višak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proizvedenog od strane XO i drugih pro-oksidanasa štiteći na taj način ćeliju od štetnog dejstva RVK (149). Mnoga istraživanja su pokazala da je kod pacijenata sa DMT2 antioksidativna zaštita snižena, a vitamin D bi prema novijim podacima mogao dovesti do njenog poboljšanja. Pretpostavlja se da bi vitamin D mogao uticati na ekspresiju gena koji vrše kontrolu antioksidativnih enzima (150). Suprotno očekivanjima, naši rezultati nisu pokazali povoljan efekat suplementacije vitaminom D na aktivnost antioksidativnog enzima katalaze. Meta-analiza koja je ispitivala antioksidativna svojstva vitamina D je pokazala da suplementacija ovim vitaminom dovodi do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima. U te svrhe analiziran je efekat vitamina D na aktivnost enzima GSH kao i na vrednosti totalnog antioksidativnog kapaciteta koji predstavlja meru sinergističkog delovanja pojedinačnih enzimskih i neenzimskih antioksidanasa (119,151). Uticaj vitamina D na aktivnost katalaze ispitivan je kod miševa sa streptozocin izazvanim dijabetesom gde je nakon suplementacije vitaminom D i Ca došlo do značajnog povećanja aktivnosti ovog enzima (152).

Merenje ukupne antioksidativne aktivnosti plazme u našem istraživanju vršeno je određivanjem reduktivnog kapaciteta polifenola, antioksidanasa prisutnih u plazmi (153). Naši rezultati nisu ukazali na povoljan efekat vitamina D na vrednosti TRC-a koji je jedan od parametara kojim se izražavaju antioksidativna svojstva plazme, a koji je meren gorepomenutom metodom. Iako je zabeležen statistički značajan porast vrednosti TRC u Metformin + Vitamin D grupi nakon 3 meseca suplementacije, statistički značajne razlike u srednjim vrednostima između grupa nije bilo. Meta-analiza koja je ispitivala efekat suplementacije na biomarkere inflamacije i oksidativnog stresa kod pacijenata sa DMT2 pokazala je da vitamin D dovodi do povećanja vrednosti totalnog antioksidativnog kapaciteta (154). Ovo neslaganje u rezultatima možemo objasniti pre svega različitim metodama određivanja antioksidativnog kapaciteta plazme. Za razliku od metode određivanja TRC-a koji predstavlja meru ukupne količine fenola u plazmi, metoda kojom je određivan totalni antioksidativni kapacitet u istraživanjima obuhvaćenim pomenutom meta-analizom se odnosila na procenu antioksidativne zaštite usled zajedničkog delovanja enzimskih i neenzimskih antioksidanasa (153). Drugi mogući razlog leži u činjenici da je suplementacija vitaminom D kod različitih grupa pacijenata pokazala da je samo kod pacijenata koji nisu imali deficijenciju, vitamin D doveo do povećanja antioksidativnog kapaciteta plazme (119). U našem istraživanju grupe su se sastojale kako od pacijenata koji nisu imali tako i od onih

koji jesu imali vitamin D deficijenciju. To može biti jedan od razloga zbog čega nismo dobili statistički značajnu razliku u vrednostima TRC.

Oksidativni kapacitet plazme u našem istraživanju određivan je metodom koja predstavlja meru ukupne količine peroksida u organizmu (106). Prema autorovom saznanju do sada nijedno istraživanje nije ispitivalo uticaj suplementacije vitaminom D na vrednosti TOC-a kod pacijenata sa DMT2. Naši rezultati nisu ukazali na to da bi vitamin D mogao smanjiti ukupnu količinu peroksida u organizmu što može značiti da se antioksidativno dejstvo vitamina D ne zasniva na njegovom uticaju na antioksidativne enzime kakav je na primer katalaza.

Kada su u pitanju parametri kardiovaskularnog rizika opservacione studije su pokazale da bi vitamin D mogao imati protektivni efekat, a mogući mehanizmi se pored uticaja na metabolizam glukoze ogledaju i kroz inhibitorni uticaj na inflamaciju, RAAS i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija (155). Međutim, interventne studije nisu potvrdile ova očekivanja, već su iznedrile kontradiktorne rezultate. Ipak, većina tih studija je imala relativno mali uzorak, a kardiovaskularni ishodi nisu pre početka istraživanja postavljeni kao primarni (156,157).

Meta-analize u kojima je ispitivan uticaj vitamina D na vrednosti SKP i DKP u opštoj populaciji nisu nedvosmisleno ukazale na povoljan efekat vitamin D. Jedna od meta-analiza koju su sprovedi Golzarand i sar. je pokazala da je vitamin D doveo do sniženja vrednosti KP u podgrupi u kojoj su dnevne doze vitmina D bile veće od 800 IJ a suplementacija trajala kraće od 6 meseci, kao i u podgrupi sa starijim ispitanicima (158). Rezultati meta-analize koju su sprovedi Pilz i sar. nisu pokazali da vitamin D dovodi do sniženja vrednosti KP kod hipertenzivnih pacijenata sa vitamin D deficijencijom, dok su rezultati druge meta-analize pokazali da kod upravo ove grupe pacijenata suplementacija vitaminom D dovodi do sniženja i SKP i DKP (159,160). Kada su u pitanju pacijenti sa DMT2, rezultati meta-analize objavljene 2016. godine su pokazali da vitamin D ima povoljan efekat samo na vrednosti DKP, dok su rezultati meta-analize iz 2018. godine pokazali da vitamin D dovodi do sniženja SKP kod pacijenata sa DMT2 (161,162).

U našem istraživanju većina pacijenata je imala hipertenziju i uzimala je redovno antihipertenzive. Vitamin D nije doveo do značajnog sniženja SKP i DKP iako je u Metformin + Vitamin D grupi nakon 3. meseca došlo do statistički značajnog pada vrednosti SKP. Studije koje su pokazale značajan efekat vitamina D na SKP i DKP su koristile



uglavnom 24-časovni monitoring KP što predstavlja precizniju meru srednje vrednosti KP u odnosu na 2 uzastopna merenja u ambulanti izabranog doktora.

Insulinska rezistencija i DMT2 su povezani sa poremećajem lipidnog statusa što podrazumeva dominaciju malih LDL partikula, povećane vrednosti TG a snižene vrednosti HDL holesterola. Svaka od ovih karakteristika dijabetesne dislipidemije povezana je sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti te predstavlja značajan faktor rizika (163). Suplementacija vitaminom D bi mogla imati direktni i indirektni uticaj na modifikaciju lipidnog profila. Povećanjem aktivnosti lipoproteinske lipaze u masnom tkivu moglo bi doći do smanjenja vrednosti TG, dok bi poboljšanje apsorpcije Ca smanjilo apsorpciju masnih kiselina stvaranjem nerastvorljivih kompleksa Ca-masne kiseline u crevima što bi dovelo do smanjenja nivoa LDL holesterola (164). Jafari i sar. su analizirali 17 randomizovanih, placebo kontrolisanih istraživanja koja su pored ostalih kardiovaskularnih faktora rizika ispitivala i uticaj vitamin D suplementacije na lipidni status kod pacijenata sa DMT2 i pokazali da kod većine istraživanja vitamin D dovodi do smanjenja vrednosti ukupnog i LDL holesterola kao i TG. Neka istraživanja ne samo da nisu pokazala povoljan efekat vitamina D na vrednosti ukupnog, LDL holesterola i TG već su pokazala da suplementacija vitaminom D može dovesti i do povećanja njihovih vrednosti (162). Naši rezultati se slažu sa rezultatima istraživanja koje je imalo za cilj da ispita uticaj 6-mesečne vitamin D suplementacije na vrednosti lipida kod pacijenata sa DMT2. Nakon 6 meseci, suplementacija sa 4000 IJ dnevno je dovela do značajnog sniženja vrednosti TG, dok efekat na vrednosti ukupnog, LDL i HDL holesterola nije bio značajan. Kao i u pomenutom istraživanju, većina naših ispitanika je uzimala terapiju za dislipidemiju što je moglo da maskira mali, ali značajan efekat vitamina D na vrednosti lipida. Takođe, deficijencija vitaminom D nije bila kriterijum za ulazak u našu studiju što bi moglo da znači da su vrednosti vitamina D u serumu  $\geq 50$  i  $75$  nmol/L bile adekvatne za kardiovaskularno zdravlje (157). U našem istraživanju povoljan efekat vitamin D je pokazao i na aterogeni indeks Castelli I, ali samo nakon 3 meseca suplementacije što se u potpunosti slaže sa rezultatima gorepomenute meta-analize u kojoj se navodi da je vitamin D pokazao povoljan efekat na lipidni status u podgrupi vitamin D deficijentnih pacijenata sa DMT2 kod kojih je suplementacija trajala kraće od 12 nedelja (163). U našem istraživanju to je period kada je u Metformin + Vitamin D grupi bila veća prevalencija vitamin D deficijentnih ispitanika i kada su veće doze vitamina D korišćene.

Kod pacijenata sa DMT2 nivo sistemske inflamacije, meren nivoom CRP-a prediktor je kardiovaskularne bolesti i lošijeg ishoda, nezavisno od stepena glikoregulacije i drugih faktora kardiovaskularnog rizika (165,166). U studijama preseka pacijenti sa DMT2 su imali značajno višojie vrednosti CRP-a u odnosu na zdrave ispitanike što govori u prilog tome da DMT2 predstavlja stanje hronične inflamacije (167,168). Studije preseka su takođe pokazale inverznu povezanost serumskog nivoa vitamina D sa nivoom CRP što je dovelo do pretpostavke da bi optimalni nivoi vitamina D u krvi mogli smanjiti stepen inflamacije meren nivoom CRP-a (169). Sa teorijskog stanovišta vitamin D bi mogao da utiče na vrednosti CRP-a inhibicijom proinflamatornog transkripcionog faktora (NF- $\kappa$ B) koji je odgovoran za endogenu indukciju CRP-a. Ipak, randomizovana kontrolisana istraživanja koja su ispitivala da li suplementacija vitaminom D može sniziti nivo CRP-a nisu pružila konzistentne rezultate (170). U našem istraživanju kod pacijenata koji su dobijali vitamin D nije bilo značajne razlike u nivoima CRP-a u odnosu na pacijente koji nisu dobijali vitamin D. Za razliku od našeg istraživanja, meta-analiza koja je analizirala rezultate 13 randomizovanih kontrolisanih studija je pokazala da suplementacija vitaminom D kod pacijenata sa DMT2 dovodi do značajnog sniženja vrednosti visoko senzitivnog CRP-a (171). Razlog za pomenuto neslaganje rezultata može ležati u činjenici da u našem istraživanju nisu bili uključeni samo pacijenti sa nivoom vitamin D  $\leq$  50 nmol/L što predstavlja deficijenciju, već i pacijenti sa nivoom vitamina D  $>$  50 nmol/L. Kako je pokazala jedna od najvećih studija preseka upravo nivoi vitamina D koji su bili  $>$  53 nmol/L nisu pokazali inverznu povezanost sa nivoima CRP-a što bi moglo da znači suplementacija vitaminom D može povoljno uticati na CRP samo kod pacijenata koji imaju deficijenciju, a što se i potvrdilo u nekim istraživanjima (172,173).

Gojaznost predstavlja značajan faktor rizika za kardiovaskularne bolesti, a rezultati istraživanja su pokazali da postoji inverzna povezanost vitamina D i BMI i da je vitamin D deficijencija česta kod gojaznih pacijenata. Međutim, dosadašnji rezultati nisu uspeali da pruže dovoljno dokaza koji bi nedvosmisleno ukazali na pozitivnu ulogu vitamina D u tretmanu gojaznosti (174). Naši rezultati nisu pokazali povoljan efekat vitamina D na vrednosti BMI, mada je postojala značajna razlika u vrednostima BMI nakon 3 meseca ali u korist Metformin grupe. Kada je u pitanju uticaj na OS, Vitamin D je imao povoljan efekat nakon 3 meseca, ali verovatno zbog povećanja vrednosti OS u Metformin grupi. Dakle, u Metformin grupi je došlo do sniženja vrednosti BMI koje je bilo praćeno povećanjem OS. Ovaj neočekivani rezultat možemo delom pravdati tendencijom nagomilavanja masnog tkiva u abdominalnoj regiji kod postmenopauzalnih žena, koje su činile skoro polovinu ispitanika u grupi (175).

Ostaje otvoreno pitanje, da li bi, da nije bilo ovih promena u Metformin grupi, vitamin D pokazao povoljan efekat na vrednosti BMI i OS. Drugi razlog može biti taj što smo u istraživanje uključili kako gojazne tako i ispitanike koji nisu bili gojazni. Ova heterogenost uzorka je takođe mogla maskirati povoljan efekat vitamina D na antropometrijske karakteristike ispitanika.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata koji su prikazani u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama prema ES preporukama dovodi do značajnog sniženja određenih parametara metaboličke kontrole kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
  - Naši rezultati su pokazali da je kratkotrajna oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama u trajanju od 3 meseca dovela do značajnog sniženja glikemije našte kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom. Šestomesečna suplementacija nije pokazala povoljan efekat na vrednosti glikemije našte.
  - Naši rezultati su takođe pokazali da je kratkotrajna (3 meseca), kao i dugotrajna (6 meseci) oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama dovela do značajnog sniženja IR mereno TYG indeksom kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
  - Kada su u pitanju ostali parametri glikoregulacije, HbA1c, insulinemija i HOMA-IR indeks, oralna suplementacija vitaminom D nije pokazala povoljan efekat kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
2. Oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama prema ES preporukama imala je povoljan efekat na određene parametre oksidativnog stresa kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
  - Rezultati našeg istraživanja su pokazali novi potencijalni mehanizam antioksidativnog i antiinflamatornog efekta vitamina D jer je šestomesečna suplementacija ovim vitaminom, doziranim u jednakim dnevnim dozama ispoljila povoljan efekat na vrednosti enzima MPO kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
  - Kada su u pitanju ostali enzimi geneze slobodnih radikala (XO) kao i produkti RVN (NOx) oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama nije ispoljila povoljan efekat kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.

- Kratkotrajna oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama u trajanju od 3 meseca pokazala je povoljan efekat na parametre oksidativne modifikacije lipida izraženo kroz odnos TG/TBARS kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom. Šestomesečna suplementacija nije pokazala povoljan efekat na odnos TG/TBARS.
  - Na ostale vrednosti parametara osidativne modifikacije lipida (MDA) kao i na vrednosti parametara oksidativne modifikacije proteina (AOPP), oralna suplementacija vitaminom D doziranim u jednakim dnevnim dozama nije ispoljila povoljan efekat kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
  - Oralna suplementacija vitaminom D doziranim u jednakim dnevnim dozama nije ispoljila povoljan efekat ni na vrednosti TOC kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
  - Kada su u pitanju parametri antioksidativne zaštite (katalaza i TRC), oralna suplementacija vitaminom D doziranim u jednakim dnevnim dozama kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom takođe nije imala povoljan efekat.
3. Oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama prema ES preporukama, ako izuzmemo uticaj na vrednosti TG i aterogenog indeksa Castelli I, nije imala povoljan efekat na parametre kardiovaskularnog rizika kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom.
- Kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom, oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama nije pokazala povoljan efekat kada su vrednosti SKP i DKP u pitanju.
  - Jednake dnevne doze vitamina D, uzete oralnim putem imale su povoljan efekat na vrednosti TG nakon 3 meseca, kao i nakon 6 meseci suplementacije kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom. Na ostale vrednosti parametara lipidnog statusa (ukupni, LDL i HDL holesterol) oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama kod pacijenata sa DMT2 nije ispoljila povoljan efekat.
  - Povoljan efekat oralne suplementacije vitaminom D na vrednosti aterogenih indeksa zabeležen je samo kada je u pitanju Castelli I aterogeni indeks i samo nakon 3 meseca suplementacije.

- Oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom takođe nije ispoljila povoljan efekat na vrednosti CRP.
- Kada su u pitanju antropometrijski parametri, oralna suplementacija vitaminom D, doziranim u jednakim dnevnim dozama kod pacijenata sa DMT2 koji su na terapiji metforminom nije imala povoljan efekat na vrednosti BMI, ali je nakon 3 meseca ispoljila povoljan efekat na vrednosti OS što pre predstavlja uzgredan nalaz nego odraz pravog uticaja vitamina D.

## 7. LITERATURA

1. Gil A, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: classic and novel actions. *Ann Nutr Metab* 2018;72(2):87-95.
2. Demer LL, Hsu JJ, Tintut Y. Steroid Hormone vitamin d: implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 2018;122(11):1576-85.
3. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *J Pharmacol Pharmacother* 2012;3(2):118-26.
4. Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr J* 2010;9:65.
5. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(1):26-34.
6. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol* 2008;52(24):1949-56.
7. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-81.
8. Pilz S, März W, Cashman KD, Kiely ME, Whiting SJ, Holick MF, et al. Rationale and plan for vitamin D food fortification: A review and guidance paper. *Front Endocrinol* 2018;9:373.
9. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013;88(7):720-55.
10. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6):1678S-88S.
11. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr Rev* 2013;34(1):33-83.
12. Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S. Vitamin D and its relationship with obesity and muscle. *Int J Endocrinol* 2014;2014:841248
13. Cojić MM. The role of vitamin d in treating patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Medica Medianae* 2019;58(1):116-24.

14. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 2014;55(1):13-31.
15. Lukaszuk JM, Luebbers PE. 25(OH)D status: Effect of D<sub>3</sub> supplement. *Obes Sci Pract* 2017;3(1):99-105.
16. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(6):1689S–1696S.
17. Jovičić S, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Biochemistry and metabolism of vitamin D. *J Med Biochem* 2012;31(4):309-15.
18. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996;126(4):1159S-64S.
19. Laird E, Ward M, McSorley E, Strain JJ, Wallace J. Vitamin D and bone health: potential mechanisms. *Nutrients* 2010;2(7):693-724.
20. Holick MF. High Prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006;81(3):353-73.
21. Bikle DD. Vitamin D and bone. *Curr Osteoporos Rep* 2012;10(2):151-9.
22. Farrell CJ, Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27(5):675-88.
23. Bouillon R, Van Schoor NM, Gielen E, Boonen S, Mathieu C, Vanderschueren D, et al. Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(8):E1283-304.
24. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005;16:713-6.
25. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1080S-6S.
26. Sai AJ, Walters RW, Fang X, Gallagher JC. Relationship between vitamin D, parathyroid hormone, and bone health. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(3):E436-46.
27. Pfothhauer KM, Shubrook JH. Vitamin D deficiency, its role in health and disease, and current supplementation recommendations. *J Am Osteopath Assoc* 2017;117(5): 301-5.



28. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-30.
29. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):53-8.
30. French D. The (sun)light and dark of 25-hydroxyvitamin D testing. *J Appl Lab Med* 2018; 3(3): 460-73.
31. Rosen CJ, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(4):1146-52.
32. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(4):1153-8.
33. Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbańska M, Łukaszkiwicz J, Płudowski P, Jones G. Vitamin D Toxicity—A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:550.
34. Kweder H, Eidi H. Vitamin D deficiency in elderly: Risk factors and drugs impact on vitamin D status. *Avicenna J Med* 2018;8(4):139-46.
35. Haroon M, Fitzgerald O. Vitamin D deficiency and its repletion: A review of current knowledge and consensus recommendations. *J Arthritis* 2012;1:105.
36. Norman A. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(6):1108-10.
37. Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1995;61(3 Suppl):638S-645S.
38. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull* 2014;39(4):322- 50.

39. Yang Z, Laillou A, Smith G, Schofield D, Moench-Pfanner R. A review of vitamin D fortification: implications for nutrition programming in Southeast Asia. *Food Nutr Bull* 2013;34(2 Suppl):S81-9.
40. Djekic-Ivankovic M, Weiler H, Jones G, Kaufmann M, Kaludjerovic J, Aleksic-Velickovic V, et al. Vitamin D status in mothers with pre-eclampsia and their infants: a case-control study from Serbia, a country without a vitamin D fortification policy. *Public Health Nutr* 2017;20(10):1825-35.
41. Vanlint S. Vitamin D and obesity. *Nutrients* 2013;5(3):949-56.
42. Pourshahidi LK. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc* 2015;74(2):115-24.
43. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012; 95(6):1357-64.
44. Khazai N, Judd SE, Tangpricha V. Calcium and vitamin D: skeletal and extraskeletal health. *Curr Rheumatol Rep* 2008;10(2):110-7.
45. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011;65(9):1005-15.
46. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(6):2017-29.
47. Gluseth HL, Wium C, Birkeland KI. Vitamin D and insulin action and secretion –an overview of current understanding and future perspectives. *Eur Endocrinol* 2010; 6(2):13-8.
48. Al-Shoumer KA, Al-Essa TM. Is there a relationship between vitamin D with insulin resistance and diabetes mellitus? *World J Diabetes* 2015;6(8):1057-64.
49. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005;48(7):1247-57.
50. Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014; 43(1):205-32.

51. Harinarayan CV. Vitamin D and diabetes mellitus. *Hormones* 2014;13(2):163-81.
52. Angellotti E, Pittas AG. The role of vitamin D in the prevention of type 2 diabetes: To D or not to D? *Endocrinology* 2017;158(7):2013-21.
53. Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:634195.
54. George PS, Pearson ER, Witham MD. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2012;29(8):e142-50.
55. Seida JC, Mitri J, Colmers IN, Majumdar SR, Davidson MB, Edwards AL, et al. Clinical review: Effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(10):3551-60.
56. Wu C, Qiu S, Zhu X, Li L. Vitamin D supplementation and glycemic control in type 2 diabetes patients: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2017;73:67-76.
57. Mirhosseini N, Vatanparast H, Mazidi M, Kimball SM. The effect of improved serum 25-hydroxyvitamin D status on glycemic control in diabetic patients: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102(9):3097-110.
58. Krul-Poel YH, Ter Wee MM, Lips P, Simsek S. Management of endocrine disease: the effect of vitamin D supplementation on glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2017;176(1):R1-R14.
59. Hu Z, Chen J, Sun X, Wang L, Wang A. Efficacy of vitamin D supplementation on glycemic control in type 2 diabetes patients: A meta-analysis of interventional studies. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(14):e14970.
60. Lee WC, Mokhtar SS, Munisamy S, Yahaya S, Rasool AHG. Vitamin D status and oxidative stress in diabetes mellitus. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018;64(7):60-9.
61. Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? *Japan Med Assoc J* 2002;45(7): 271-6.
62. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49(2 Suppl 1):3-8.

63. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017: 8416763.
64. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;5(1):9-19.
65. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018;13:757-72.
66. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 2015;30(1):11-26.
67. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol* 2011;1(2):941-69.
68. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:5698931.
69. Costa ED, Rezende BA, Cortes SF, Lemos VS. Neuronal nitric oxide synthase in vascular physiology and diseases. *Front Physiol* 2016;7:206.
70. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13(1):97-104.
71. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress-clinical diagnostic significance. *J Med Biochem* 2008;27(4):409-25.
72. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors* 2008; 34(2):171-80.
73. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants (Basel)* 2019;8(3).pii:E72.
74. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:360438.
75. Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 2005;31(6):551-7.

76. Al-Dalaen SM, Al-Qtaitat AI. Review article: oxidative stress versus antioxidants. *American journal of bioscience and bioengineering* 2014;2(5):60-71.
77. Bigagli E, Lodovici M. Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:5953685.
78. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J* 2016;24(5):547-53.
79. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014;2014:761264.
80. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci* 2018;63(1):68-78.
81. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 2018;54(4):287-93.
82. Szaleczky E, Prechl J, Fehér J, Somogyi A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus--a rational approach. *Postgrad Med J* 1999;75(879):13-7.
83. Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil* 2013;14(4):158-72.
84. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Front Pharmacol* 2018;9:1162.
85. Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res* 2010;2(3):316-31.
86. Majkić-Singh N. Etiologija dijabetes mellitus-a. *Jugoslav Med Biohem* 2003;22(suppl 1):5-11.
87. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija-modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslav Med Biohem* 2002;21(2):69-84.
88. Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and  $\beta$ -cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol* 2012;214(1):11-20.

89. Čolak E, Majkić-Singh N. The effect of hyperglycemia and oxidative stress on the development and progress of vascular complications in type 2 diabetes. *Jugoslav Med Biohem* 2009;28(2):63-71.
90. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 2015;5(1):194-222.
91. Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Fernández-Mejía C. Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. In: Morales-Gonzalez JA (Ed). *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*. IntechOpen; 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/51788>
92. Nikooyeh B, Neyestani TR. Oxidative stress, type 2 diabetes and vitamin D: past, present and future. *Diabetes Metab Res Rev* 2016;32:260-7.
93. Neyestani TR. Vitamin D, oxidative stress and diabetes: Is there a link? In: Preedy VR, ed. *Diabetes: Oxidative stress and dietary antioxidants*. 1<sup>st</sup> ed. London: Academic Press; 2014. p. 111-20.
94. Tagliaferri S, Porri D, De Giuseppe R, Manuelli M, Alessio F, Cena H. The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. *Nutr Res Rev* 2019;32(1):99-105.
95. Tang H, Li D, Li Y, Zhang X, Song Y, Li X. Effects of vitamin D supplementation on glucose and insulin homeostasis and incident diabetes among nondiabetic adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Endocrinol* 2018;2018:7908764.
96. Standards of medical care in diabetes-2011. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2011;34(1):S11-61.
97. Nasri H, Behradmanesh S, Maghsoudi AR, Ahmadi A, Nasri P, Rafieian-Kopaei M. Efficacy of supplementary vitamin D on improvement of glycemic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus; a randomized double blind clinical trial. *J Renal Inj Prev* 2013;3(1):31-4.
98. Barbalho SM, Tofano RJ, de Campos AL, Rodrigues AS, Quesada K, Bechara MD, et al. Association between vitamin D status and metabolic syndrome risk factors. *Diabetes Metab Syndr* 2018;12(4):501-7.

99. Bhardwaj S, Bhattacharjee J, Bhatnagar MK, Tyagi S. Atherogenic index of plasma, Castelli risk index and atherogenic coefficient-new parameters in assessing cardiovascular risk. *Int J Pharm Biol Sci* 2013;3(3):359-64.
100. Jean CD, Maryse T, Marie JF. Plasma malondialdehyde levels during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1983;129:319-22.
101. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161(5):2524-32.
102. Kizaki H, Sakurada T. Simple micro-assay methods for enzymes of purine metabolism. *J Lab Clin Med* 1977;89(5):1135-44.
103. Boban M, Kocic G, Radenkovic S, Pavlovic R, Cvetkovic T, Deljanin-Ilic M, et al. Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease. *Ren Fail* 2014;36(4):613-8.
104. Klisic A, Kocic G, Kavarić N, Pavlovic R, Soldatovic I, Ninic A. Nitric oxide products are not associated with metabolic syndrome. *J Med Biochem* 2019;38(3):361-7.
105. Goth L. Serum catalase: reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clin Chem* 1991;37(2):2043-7.
106. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38(12):1103-11.
107. Cournot M, Burillo E, Saulnier PJ, Planesse C, Gand E, Rehman M, et al. Circulating concentrations of redox biomarkers do not improve the prediction of adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Heart Assoc* 2018;7(5):e007397.
108. Unger G, Benozzi SF, Perruzza F, Pennacchiotti GL. Triglycerides and glucose index: a useful indicator of insulin resistance. *Endocrinol Nutr* 2014;61(10):533-40.
109. Nigil Haroon N, Anton A, John J, Mittal M. Effect of vitamin D supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review of interventional studies. *J Diabetes Metab Disord* 2015;14:3.

110. Talaei A, Mohamadi M, Adgi Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2013;5(1):8.
111. Vasques AC, Novaes FS, de Oliveira Mda S, Souza JR, Yamanaka A, Pareja JC, et al. TyG index performs better than HOMA in a Brazilian population: a hyperglycemic clamp validated study. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93(3):e98-e100.
112. Krul-Poel YH, Ter Wee MM, Lips P, Simsek S. Management of endocrine disease: The effect of vitamin D supplementation on glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2017;176(1):R1- R14.
113. Soric MM, Renner ET, Smith SR. Effect of daily vitamin D supplementation on HbA1c in patients with uncontrolled type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *J Diabetes* 2012;4(1):104- 5.
114. Krul-Poel YH, Westra S, ten Boekel E, ter Wee MM, van Schoor NM, van Wijland H, et al. Effect of vitamin D supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes (SUNNY trial): a randomized placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 2015; 38(8):1420-6.
115. Dalle Carbonare L, Valenti M.T, Del Forno F, Caneva E, Pietrobelli A. Vitamin D: Daily vs. monthly use in children and elderly-What is going on? *Nutrients* 2017;9(7):652.
116. Saif-Elnasr M, Ibrahim I.M, Alkady MM. Role of Vitamin D on glycemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *J Res Med Sci* 2017;22:22.
117. Kocić R, Pavlović D, Kocić G, Pesić M. Susceptibility to oxidative stress, insulin resistance, and insulin secretory response in the development of diabetes from obesity. *Vojnosanit Pregl* 2007;64(6):391-7.
118. Eftekhari MH, Akbarzadeh M, Dabbaghmanesh MH, Hassanzadeh J. The effect of calcitriol on lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *ARYA Atheroscler* 2014;10(2):82.
119. Sepidarkish M, Farsi F, Akbari-Fakhrabadi M, Namazi N, Almasi-Hashiani A, Maleki Hagiagha A, et al. The effect of vitamin D supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacol Res* 2019;139:141-52.



120. Nikooyeh B, Neyestani TR, Tayebinejad N, et al. Daily intake of vitamin D- or calcium-vitamin D-fortified Persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: evidence for antioxidative properties of vitamin D. *J Hum Nutr Diet* 2014;27(2):276-83.
121. Violi F, Carnevale R, Loffredo L, Pignatelli P, Gallin JI. NADPH oxidase-2 and atherothrombosis: Insight from chronic granulomatous disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37(2):218-25.
122. Madamanchi NR, Runge MS. NADPH oxidases and atherosclerosis: unraveling the details. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298(1):H1-2.
123. Pattison DI, Davies MJ. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med Chem* 2006;13:3271-90.
124. Meyer JW, Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett* 2000;472(1):1-4.
125. Mirmohammadsadeghi A, Gharipour M, Roohafza H, Dianatkah M, Sadeghi M. Effects of selenium supplementation on paraoxonase-1 and myeloperoxidase activity in subjects with cardiovascular disease: the Selenegene study, a double-blind randomized controlled trial. *Arch Med Sci Atheroscler Dis* 2018;3:e112-8.
126. Kawai Y, Kiyokawa H, Kimura Y, Kato Y, Tsuchiya K, Terao J. Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of aminophospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation. *Biochemistry* 2006;45:14201-11.
127. Pattison DI, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis and computational modeling. *Chem Res Toxicol* 2003;16:439-49.
128. Thukkani AK, McHowat J, Hsu FF, Brennan ML, Hazen SL, Ford DA. Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 2003;108:3128-33.
129. Pattison DI, Hawkins CL, Davies MJ. What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? A kinetic modeling approach. *Chem Res Toxicol* 2009;22:807-17.

130. Shao B, Oda MN, Bergt C, Fu X, Green PS, Brot N, et al. Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2006;281(14):9001-4.
131. DeNichilo MO, Panagopoulos V, Rayner TE, Borowicz RA, Greenwood JE, Evdokiou A. Peroxidase enzymes regulate collagen extracellular matrix biosynthesis. *Am J Pathol* 2015;185:1372-84.
132. Carr AC, Winterbourn CC. Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem J* 1997;327:275-81.
133. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003;25:259-74.
134. Fu X, Mueller DM, Heinecke JW. Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides, and sulfonamides by hypochlorous acid: a potential pathway for oxidative cross-linking of low-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Biochemistry* 2002;41:1293-301.
135. Pullar JM, Vissers MC, Winterbourn CC. Glutathione oxidation by hypochlorous acid in endothelial cells produces glutathione sulfonamide as a major product but not glutathione disulfide. *J Biol Chem* 2001;276:22120-5.
136. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm* 2008;2008:135625.
137. Tessari P, Cecchet D, Cosma A, Vettore M, Coracina A, Millioni R, et al. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes* 2010;59(9):2152-9.
138. Assmann TS, Brondani LA, Bouças AP, Rheinheimer J, de Souza BM, et al. Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide* 2016;61:1- 9.
139. Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and endothelial function. *Nutrients* 2020;12(2):575.

140. Miric DJ, Kisić BM, Filipović-Danić S, Grbić R, Dragojević I, Mirić MB, Puhalo-Sladoje D. Xanthine oxidase activity in type 2 diabetes mellitus patients with and without diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Res* 2016;2016:4370490.
141. Battelli MG, Polito L, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: not only oxidative stress. *Atherosclerosis* 2014;237(2):562-7.
142. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension* 2000;35:746-51.
143. Azenabor A, Erivona R, Adejumo E, Ozuruoke D, Azenabor R. Xanthine oxidase activity in type 2 diabetic Nigerians. *Diabetes Metab Syndr* 2019;13:2021-4.
144. Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, et al. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* 2002;51:1118-24.
145. Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J* 2010;31:2741-8.
146. Sunagawa S, Shirakura T, Hokama N, Kozuka C, Yonamine M, Namba T, et al. Activity of xanthine oxidase in plasma correlates with indices of insulin resistance and liver dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: a pilot exploratory study. *J Diabetes Investig* 2019;10:94-103.
147. Ćosić V, Antić S, Pešić M, Jovanović O, Kundalić S, Djordjević VB. Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in type 2 diabetic patients? *Clin Chem Lab Med* 2001;39:818-21.
148. Goth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:e93.
149. Jandrić-Balen M, Božikov V, Božikov J, Metelko Ž, Jandrić I, Romić Ž. Impact of glycemic control on antioxidant enzyme activity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Croat* 2004;33:131-5.
150. Cojić M, Kocić R, Klisić A, Cvejanov-Kezunović Lj, Kavarić N, Kocić G. A novel mechanism of vitamin D anti-inflammatory/antioxidative potential in type 2 diabetic patients on metformin therapy. *Arch Med Sci* 2020; 16(1).

151. Wang Y, Yang M, Lee SG, Davis CG, Kenny A, Koo SI, et al. Plasma total antioxidant capacity is associated with dietary intake and plasma level of antioxidants in postmenopausal women. *J Nutr Biochem* 2012;23(12):1725-31.
152. Alatawi FS, Faridi UA, Alatawi MS. Effect of treatment with vitamin D plus calcium on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Pharm J* 2018;26:1208-13.
153. Lamuela-Raventós RM. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F, eds. *Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications*. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Ltd; 2018. p. 107-115.
154. Mansournia MA, Ostadmohammadi V, Doosti-Irani A, Ghayour-Mobarhan M, Ferns G, Akbari H, et al. The effects of vitamin D supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Horm Metab Res* 2018;50(6):429-40.
155. Danik JS, Manson JE. Vitamin d and cardiovascular disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2012;14(4):414-24.
156. Chin K, Appel LJ, Michos ED. Vitamin D, calcium, and cardiovascular disease: A "D"vantageous or "D"etrimental? An era of uncertainty. *Curr Atheroscler Rep* 2017;19(1):5.
157. Angellotti E, D'Alessio D, Dawson-Hughes B, Chu Y, Nelson J, Hu P, et al. Effect of vitamin D supplementation on cardiovascular risk in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 2019;38(5):2449- 53.
158. Zhang D, Cheng C, Wang Y, Sun H, Yu S, Xue Y, et al. Effect of vitamin D on blood pressure and hypertension in the general population: An update meta-analysis of cohort studies and randomized controlled trials. *Prev Chronic Dis* 2020;17:190307.
159. Pilz S, Gaksch M, Kienreich K, Grübler M, Verheyen N, Fahrleitner-Pammer A, et al. Effects of vitamin D on blood pressure and cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial. *Hypertension* 2015;65(6):1195- 201.
160. He Silu BS, Hao Xiyuan MS. The effect of vitamin D3 on blood pressure in people with vitamin D deficiency. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(19):e15284.

161. Lee KJ, Lee YJ. Effects of vitamin D on blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016;54(4):233-42.
162. Jafari T, Fallah AA, Rostampour N, Mahmoodnia L. Vitamin D ameliorates systolic but not diastolic blood pressure in patients with type 2 diabetes: Results from a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Vitam Nutr Res* 2018;88(1-2):90-9.
163. Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(6):1496-504.
164. Mirhosseini N, Rainsbury J, Kimball SM. Vitamin D Supplementation, serum 25(OH)D concentrations and cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:87.
165. Svensson E, Mor A, Rungby J, Berencsi K, Nielsen JS, Stidsen JV, et al. Lifestyle and clinical factors associated with elevated C-reactive protein among newly diagnosed Type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study from the nationwide DD2 cohort. *BMC Endocr Disord* 2014;14:74.
166. Cardoso CR, Leite NC, Salles GF. Prognostic importance of C-reactive protein in high cardiovascular risk patients with type 2 diabetes mellitus: The Rio de Janeiro Type 2 Diabetes Cohort Study. *J Am Heart Assoc* 2016;5(11):e004554.
167. King DE, Mainous AG, Buchanan TA, Pearson WS. C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(5):1535-9.
168. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, et al. The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *Eur Cardiol* 2019;14(1):50-9.
169. Tao RX, Zhou QF, Xu ZW, Hao JH, Huang K, Mou Z, et al. Inverse correlation between vitamin D and C-reactive protein in newborns. *Nutrients* 2015;7(11):9218-28.
170. Mazidi M, Rezaie P, Vatanparast H. Impact of vitamin D supplementation on C-reactive protein; a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Nutr* 2018;4(1):1.

171. Yu Y, Tian L, Xiao Y, Huang G, Zhang M. Effect of vitamin D supplementation on some inflammatory biomarkers in type 2 diabetes mellitus subjects: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Nutr Metab* 2018; 73(1):62-73.
172. Cannell JJ, Grant WB, Holick MF. Vitamin D and inflammation. *Dermatoendocrinol* 2015;6(1):e983401.
173. Mirzavandi F, Talenezhad N, Razmpoosh E, Nadjarzadeh A, Mozaffari-Khosravi H. The effect of intramuscular megadose of vitamin D injections on E-selectin, CRP and biochemical parameters in vitamin D-deficient patients with type-2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Complement Ther Med* 2020;49:102346.
174. Chrysostomou S, Saranti E. The effect of vitamin D supplementation on the treatment of overweight and obesity: A systematic review of randomized controlled trials. *J Obes Ther* 2017;1(2): 1000105.
175. Mantatzis M, Milousis T, Katargari S, Delistamatis A, Papachristou DN, Prassopoulos P. Abdominal adipose tissue distribution on MRI and diabetes. *Acad Radiol* 2014; 21(5):667-74.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Milena M Cojić rođena je 26.07.1981. godine u Podgorici. Udata je i ima kćerku Lenu.

Osnovnu i srednju školu završila je u Podgorici kao odličan đak i dobitnik diplome „Luča“. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 2000/2001 godine, a završila februara 2009. godine.

Specijalizaciju iz oblasti porodične medicine započela je na Medicinskom fakultetu u Podgorici 2013. godine gde je i položila specijalistički ispit sa odličnim uspehom, februara 2017. godine.

Doktorske akademske studije upisala je na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Nišu (školske 2013/2014 godine) i položila sve programom predviđene ispite sa odličnim uspehom.

Završila je nekoliko poslediplomskih edukativnih kurseva iz oblasti porodične medicine kao i školu meta-analize u Londonu, 2016. godine.

Aktivno se služi engleskim jezikom.

Nakon obavljenog staža u Kliničkom centru Srbije i položenog stručnog ispita u decembru 2009. godine zasnovala je radni odnos u Domu zdravlja Podgorica. Angažovanje u nastavi započela kao demonstrator na Medicinskom fakultetu u Podgorici za predmet porodična medicina 2015. godine, a od 2017. postaje saradnik u nastavi za predmete porodična i opšta medicina.

Učestvovala je kao saradnik na projektu digitalizacije protokola za akutne nekomplikovane infekcije urinarnog trakta i akutne respiratorne infekcije u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, Svetska zdravstvena organizacija, Ministarstvo zdravlja Crne Gore i JZU Dom zdravlja, Podgorica- Projektni ciklus 01.11.2018.-31.03.2020.

Učestvovala je u radu većeg broja naučnih i stručnih skupova iz oblasti porodične medicine i endokrinologije u zemlji i u inostranstvu, kao učesnik, autor radova, predavač i član naučnog odbora. Učestvovala je kao predavač na više seminara kontinuirane medicinske edukacije u organizaciji Medicinskog fakulteta u Podgorici i Kliničkog centra Crne Gore.

Kao član radne grupe učestvovala je u izradi vodiča za dijagnozu i tretman akutnih nekomplikovanih urinarnih infekcija kod odraslih pacijenata u primarnoj zdravstvenoj zaštiti kao i u izradi vodiča za akutne respiratorne infekcije kod odraslih pacijenata u primarnoj zdravstvenoj zaštiti.

Potpredsednik je Udruženja doktora opšte/porodične medicine Crne Gore i nacionalni predstavnik Crne Gore u Evropskoj akademiji nastavnika/učitelja opšte/porodične medicine (EURACT) kao i nacionalni predstavnik Crne Gore u Evropskom kardiovaskularnom udruženju za primarnu zdravstvenu zaštitu (European primary care cardiovascular society).

Rezultati naučno-istraživačkog rada (izabrane publikacije):

1. **Cojic M**, Kocic R, Klisic A, Cvejanov-Kezunovic Lj, Kavarić N, Kocic G. A novel mechanism of vitamin D anti-inflammatory/antioxidative potential in type 2 diabetic patients on metformin therapy. Arch Med Sci 2020;1-9. doi: <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.92832>. **Q1, IF 2.380**
2. **Cojić M**. The role of vitamin D in treating patients with type 2 diabetes mellitus. Acta Medica Medianae 2019;58(1):116-124.
3. **Cojić M**, Cvejanov-Kezunović Lj, Stanković J, Kavarić N, Koraćević M, Damjanović Lj. Control of glycemia and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes in primary care in Montenegro. Facta Universitatis, Series: Medicine & Biology 2018, 20(1):16-20.
4. Petek Šter M, Cvejanov-Kezunović Lj, **Cojić M**, Petek D, Švab I. Specialty training in family medicine in Montenegro-an evaluation of the programme by the first generation of trainees. Zdr Varst 2018; 57(2): 96-105. **Q2, IF 1.074**.
5. **Cojić M**, Cvejanov-Kezunović Lj. Subclinical Hypothyroidism – Whether and When To Start Treatment? Open Access Maced J Med Sci 2017; 5(7): 1042–1046.
6. Pajić S, Boljević T, Antić S, Mrvaljević M, **Cojić M**, Janić J, et al. Mukokela u submandibularnoj pljuvačnoj žlezdi-Prikaz slučaja i literaturni pregled. Timočki medicinski glasnik 2017;42(1):48-52.
7. Pajić S, Boljević T, Antić S, Mrvaljević M, **Cojić M**, Janić J, et al. Proptosis and diplopia as consequences in trauma of craniofacial junction. Facta Universitatis, Series: Medicine & Biology 2017; 19(1): 38-44.
8. Masic I, Mujanovic OB, Racic M, Gavran L, Stanetic K, Hodzic M, **Cojic M**, Cvejanov-Kezunovic L et al. Comparative Analysis of Family Medicine Education and Exams at Cathedras of Family Medicine of Universities in Southeastern Europe - "Splitska inicijativa", Sarajevo, 2017. Acta Inform Med 2017; 25(1): 61-72.



## IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom

**EFEKTI SUPLEMENTACIJE VITAMINOM D NA GLIKOREGULACIJU I  
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD PACIJENATA SA DIJABETESOM  
MELITUSOM TIPA 2 NA TERAPIJI METFORMINOM**

koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivala na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredila autorska prava, niti zloupotrebila intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:



\_\_\_\_\_  
Dr Milena M. Cojić

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI  
ŠTAMPANOG I ELEKTRONSKOG OBLIKA  
DOKTORSKE DISERTACIJE**

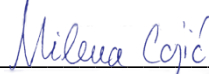
Naslov disertacije:

**EFEKTI SUPLEMENTACIJE VITAMINOM D NA GLIKOREGULACIJU I  
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD PACIJENATA SA DIJABETESOM  
MELITUSOM TIPA 2 NA TERAPIJI METFORMINOM**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predala za unošenje u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom obliku.

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:



\_\_\_\_\_  
Dr Milena M. Cojić

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetu biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom:

### **EFEKTI SUPLEMENTACIJE VITAMINOM D NA GLIKOREGULACIJU I PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD PACIJENATA SA DIJABETESOM MELITUSOM TIP 2 NA TERAPIJI METFORMINOM**

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)

**3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)**

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:



Dr Milena M. Cojić