



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali
INDIRIZZO: Epatologia e chirurgia epato-biliare.

CICLO XXVII

STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA E COMPLICANZE CRONICHE NEL DIABETICO DI TIPO 1: RUOLO DELLA VITAMINA D E DEI POLIMORFISMI DEL RE-CETTORE DELLA VITAMINA D

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Gatta

Supervisore :Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

Dottorando : Dott.ssa Elisa Cipponeri

*A Giorgio, Beatrice, Riccardo
ed ai miei genitori*

Sintesi

Introduzione e background. La malattia epatica su base non alcolica (NAFLD) ha una prevalenza del 20-30% tra gli adulti occidentali. Tale dato raggiunge il 90% nei pazienti affetti da obesità patologica. Recenti studi hanno dimostrato un incremento della incidenza di NAFLD anche tra i pazienti affetti da diabete di tipo 1 (T1D) in cui si assocerebbe ad una maggiore incidenza di nefropatia diabetica cronica (CKD) e altre malattie microvascolari. Inoltre dati in letteratura indicano che basse concentrazioni di vitamina D si associano alla severità della steatosi, alla necroinfiammazione ed alla fibrosi nella NAFLD. Parallelamente la vitamina D interviene nella patogenesi del T1DM ed i polimorfismi (SNPs) del suo recettore (VDR) sono stati descritti tra i fattori di suscettibilità per il T1DM. Benché i dati in letteratura supportino la correlazione tra NAFLD e vitamina D ad oggi, a nostro sapere, non ci sono studi che abbiano analizzato la correlazione tra NAFLD, vitamina D e diabete di tipo 1.

Materiali e metodi. Sono stati reclutati in maniera consecutiva 265 pazienti affetti da diabete di tipo 1. I pazienti hanno eseguito una ecografia epatica ed un prelievo ematico per il dosaggio di vitamina D, PTH, calcio, fosforo, magnesio e per la determinazione dei Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) del recettore della vitamina D. Sono stati studiati i più comuni SNPs del recettore della vitamina D: Fok, Bsm, Apa, Taq. Gli aplotipi del VDR dei siti polimorfici per B-A-T sono: aplotipo 1 (base GGT), aplo-

tipo 2 (base ATC), aplotipo 3 (base GTT), aplotipo 4 (base ATT). Sulla base dei parametri ematochimici e biometrici valutati, è stato calcolato il fatty liver index, marcatore non invasivo di steatosi epatica, utilizzato come parametro di conferma del reperto ecografico di steatosi epatica. Per il calcolo del FLI viene utilizzato un algoritmo basato su BMI, circonferenza vita, trigliceridi, e gamma glutamil transpeptidasi. Per valori di $FLI \geq 60$, la probabilità di avere steatosi epatica è superiore al 78%; per valori inferiori a 20 la probabilità invece di non presentare tale patologia supera il 91%.

Risultati. Risultati metabolici. La steatosi non sembra essere influenzata dai livelli di vitamina D. Nella nostra popolazione la steatosi si associava ad una maggior prevalenza di nefropatia diabetica ed a maggiori spessori medio intimali. I livelli di vitamina D non influenzavano la presenza di complicanze croniche.

Risultati genetici. 183 pazienti presentavano l'aplotipo 1 ed 85 pazienti gli altri aplotipi (aplotipo 2, aplotipo 3); L'aplotipo 1 si associava ad un maggiore deficit di vitamina D, ad un peggior compenso metabolico, ad una maggiore prevalenza di sindrome metabolica nonché ad un maggior spessore del grasso peritoneale e preperitoneale. Dall'analisi in trend per diversi aplotipi, è emerso il rischio crescente di sviluppare complicanze passando dall'aplotipo 3 all'aplotipo 1.

Conclusioni. Nel nostro studio la steatosi epatica e la vitamina D non appaiono essere correlate, né i livelli di vitamina D sembrano influenzare la presenza di complicanze croniche legate al dia-

bete. Tra gli SNPs del VDR i pazienti con aplotipo 1 non presentavano segni di steatosi epatica bensì presentavano la sindrome metabolica, contrariamente a quanto comunemente riscontrato in letteratura in cui la steatosi epatica è anche considerata un marker epatico di sindrome metabolica. Tale aplotipo sembrerebbe invece essere un elemento favorente la presenza di complicanze e di sindrome metabolica che, in questi pazienti, si manifesterebbero a prescindere dalla presenza di NAFLD.

Abstract

Background. Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an increasing worldwide problem with a prevalence estimated around 20-30% in western countries. Recent studies demonstrated an increase of NAFLD prevalence even among type 1 (T1DM) diabetes patients. In T1DM NAFLD is associated to an increase of chronic kidney disease (CKD) and microvascular diseases. Moreover in NAFLD low vitamin D concentrations are related to steatosis severity, necroinflammation and progression on hepatic injury. At the same time vitamin D seems to take part to T1DM pathogenesis, in particular Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms (SNPs) are involved in T1DM susceptibility. In our knowledge there are no studies supporting the influence of vitamin D levels on NAFLD in T1DM.

Materials and methods. 265 T1DM patients have been enrolled consecutively. We performed liver scan and took a blood withdrawal for determination of vitamin D, PTH, calcium, phosphor, magnesium, and for determination of VDR SNPs. We studied the commonest polymorphism of VDR: Bsm, Apa, Taq. On the basis of biochemical parameters we calculated fatty liver index (FLI) as indirect measurement of hepatic steatosis.

Results. *Metabolic results.* According to our results NAFLD did not seem to be related to vitamin D levels. Patients with NAFLD showed greater prevalence of diabetic kidney disease and greater

st intimal thickness. Moreover vitamin D levels did not influence prevalence of chronic diabetic complications.

Genetic results. 183 patients presented only apolotype 1 and 85 the other aplotypes. Apolotype 1 was associated to greater deficit of vitamin D and a worst metabolic control. Besides apolotype 1 was associated to greatest prevalence of metabolic syndrome and pre-peritoneal and peritoneal fat. From trend analysis of different aplotypes, apolotype 1 showed greater risk of chronic complications compared to other aplotypes.

Conclusions. In our study NAFLD and vitamin D did not seem to be influenced each other nor vitamin D levels influenced prevalence of diabetes-related chronic complications. Among SNPs of VDR, in apolotype 1 patients NAFLD did not seem hepatic sign of metabolic syndrome rather marker of diabetes-related chronic complications and metabolic syndrome, the latter even without NAFLD.

Indice

Introduzione	10
NAFLD	10
Fisiopatologia della NAFLD	10
Epidemiologia della NAFLD	18
Incidenza	18
Prevalenza	20
NAFLD e diabete di tipo 1	23
Vitamina D	27
Fisiologia della vitamina D	27
Effetti extrascheletrici della vitamina D.	33
Vitamina D e diabete di tipo 1	33
Vitamina D e NAFLD	36
Il recettore della vitamina D (VDR)	38
Polimorfismi (SNPs) del VDR	43
SNPs del VDR e diabete di tipo 1	45
Deficit di vitamina D	48
Prevalenza e fattori di rischio	48
Studio sperimentale	50
Background e rationale	50
Materiali e metodi	53
Analisi statistica	58
Risultati	59
Risultati metabolici	59

NAFLD e vitamina D

62

Sindrome metabolica (SM)	66
Complicanze NAFLD e Vitamina D	70
Parametri ecografici	71
Risultati genetici	73
Vitamina D/Controllo metabolico	76
Complicanze	77
NAFLD/sidrome metabolica	77
Parametri ecografici	77
Conclusioni	78
Bibliografia	81

Introduzione

NAFLD

Fisiopatologia della NAFLD

La non- alcoholic fatty liver disease (NAFLD) è una patologia che racchiude un ampio spettro di disordini che vanno dalla semplice steatosi alla steatoepatite quindi alla fibrosi ed infine all' eventuale cirrosi (figura 1) ¹.

Nell'ultimo decennio è stato dimostrato come il confine clinico della NAFLD non sia esclusivamente relegato all'aspetto epatologico ma interessi più organi ed apparati ² contribuendo ad incrementare l'incidenza di complicanze croniche extraepatiche .

a riprova di ciò è stato dimostrato che la NAFLD aumenti il rischio di diabete di tipo 2 (T2DM), malattie cardiovascolari (CVD), malattie cardiache e malattie renali croniche (CKD), nonché sia fortemente legata alla sindrome metabolica della quale, secondo alcuni Autori, rappresenta il segno epatologico ³.

Sebbene il primo organo ad essere colpito nella NAFLD sia il fegato, la maggior parte di decessi, nei pazienti con NAFLD, avviene per le malattie cardiovascolari, a riprova di quanto testè esposto.

Fino a poco tempo fa la ipotesi patogenetica alla base della NAFLD era rappresentata dal “two hits model” secondo il quale il viale erano due insulti epatici sequenziali: il primo caratterizzato dall’accumulo di trigliceridi ed acidi grassi liberi (principalmente conseguente ad insulinoresistenza ed/o obesità) ed il secondo responsabile della progressione dalla steatosi a steatoepatite o fibrosi ⁴.

Di recente il “two hits model” è stato contestato per l’evidenza di un incrementato rapporto tra gli acidi grassi saturi/insaturi trasportati od immagazzinati nel fegato che spiegherebbe la progressione dalla steatosi alla NASH ⁵; per tale motivo è stato sostituito dal “multiple-hits hypothesis” che tiene conto di diversi processi paralleli che coinvolgono anche dei fattori extraepatici (genetici e nutrizionali) che possono contribuire allo sviluppo ed alla progressione dell’inflammazione epatica ⁶.

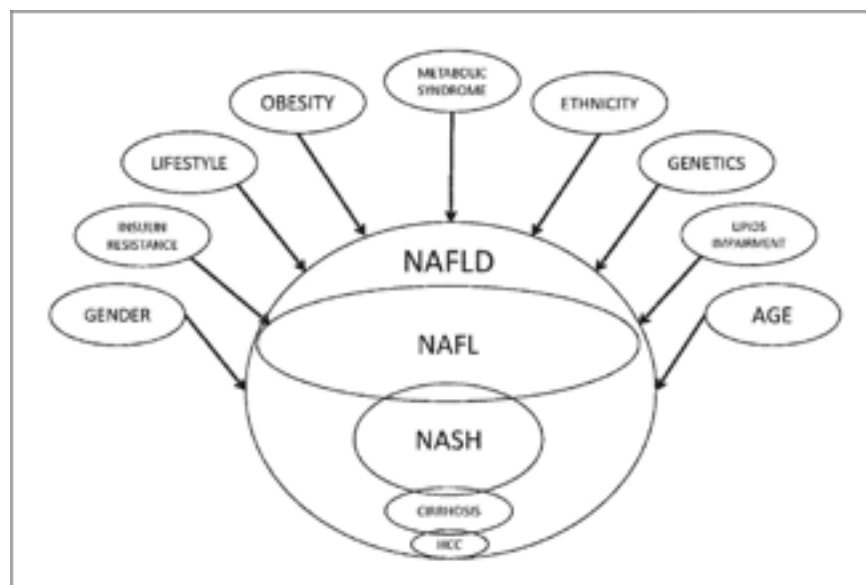


FIGURA 1. NON ALCOHOLIC FATTY LIVER: STORIA NATURALE

Dal punto di vista fisiopatologico l'elemento scatenante la NAFLD è l'accumulo epatico di lipidi che, se accumulati in grandi quantità, rappresentano il fattore di rischio per la progressione del danno epatico dalla statosi alla cirrosi passando per la fibrosi epatica.

Sebbene i principali fattori di rischio per la progressione del danno epatico siano ben conosciuti (età > 50 anni, obesità, insulino resistenza, T2DM, aumento della ferritinemia, polimorfismo I148M del patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3))^{7 8 9} non è ancora chiaro come essi agiscano sulla progressione della malattia.

In particolare, riguardo i polimorfismi del PNPLA3, le persone con NAFLD portatrici del polimorfismo I148M hanno un profilo plasmatico maggiormente carente di triacilgliceroli rispetto alle persone senza tale polimorfismo. Tale evidenza supporta l'ipotesi che il polimorfismo I148M del PNPLA3 inibisca la lipolisi intraepatocellulare e stimoli piuttosto la sintesi di triacilgliceroli, ulteriori studi servono però ancora a conferma di ciò¹⁰.

L'eccessivo accumulo dei triacilgliceroli rappresenta uno dei cardini del processo fisiopatologico che sottende la NAFLD.

In particolare quando vi è un disequilibrio tra la spesa energetica e l'intake calorico il glucosio in eccesso viene convertito in lipidi che vengono immagazzinati, sotto forma di triacilgliceroli nei depositi di tessuto adiposo e nei diversi organi.

Nel momento in cui i lipidi si accumulano in organi o tessuti non deputati all'accumulo di grasso (come ad esempio momento o il fegato) si parla di accumulo ectopico di grasso ¹¹.

La NAFLD è un esempio di accumulo ectopico di grasso; essa è spesso associata ad altri elementi come l'incremento della secrezione di epatochine, un aumento della gluconeogenesi, una riduzione della sintesi di glicogeno ed un'inibizione dei segnali insulinici ^{12 13 14}.

L'accumulo di grasso ectopico nel fegato spesso determina insulina resistenza e uno stato di infiammazione cronica che contribuiscono alla progressione del danno epatico fino alla cirrosi, passando dalla fibrosi, ed aumenta il rischio di carcinoma epatocellulare (HCC).

Insieme al metabolismo dei lipidi, recenti evidenze vedono la disbiosi intestinale come nuovo interprete nella patogenesi della NAFLD in virtù del ruolo regolatore della stessa in numerosi pathways infiammatori e metabolici intrepatici probabilmente mediati dall'incrementato assorbimento intestinale di molti prodotti batterici come gli acidi grassi a catena corta, lipopolissaccaridi ed endotossine^{15 16}.

Sebbene l'obesità sia fortemente associata alla statosi epatica essa non rappresenta la "conditio sine qua non" per lo sviluppo della NAFLD. Pazienti con lipodistrofia, infatti, hanno una marcata insulina resistenza e frequentemente sviluppano la steatosi epatica e diabete di tipo 2; ciò sottolinea quando che sia di-

sfunzione del tessuto adiposo piuttosto che la massa grassa di per se la maggiore determinante per la patogenesi della NAFLD.

In particolare l'incremento degli acidi grassi liberi (FFA) dalle riserve di tessuto adiposo incrementano la disponibilità per l'accumulo intraepatico della acyl-CoA a lunga catena, soprattutto tra gli individui che conducono uno stile di vita sedentario.

L'accumulo intraepatico di lipidi è la causa di insulinoresistenza epatica e periferica nonché dell'inflammazone epatica ¹⁷.

All'interno degli epatociti gli acidi grassi a lunga catena (LCFAs) vengono esterificati con il glicerol-3-fosfato (derivante dalla glicolisi) per formare mono-acil-gliceroli, di-acil-gliceroli (DAG) e tri-acil-gliceroli (TAG).

La sintesi di lipidi può incrementare la produzione di prodotti intermedi, come il DAG, l'acido di-palmitoil- fosfatico (Di-P PA) ed altri prodotti di derivazione lipidica come le ceramidi;

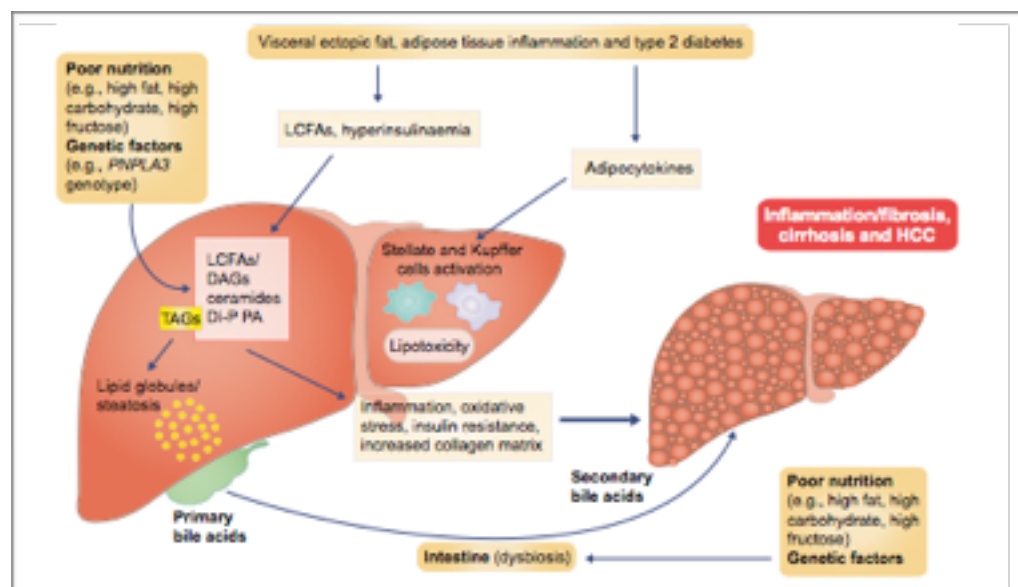


FIGURA 2. PATOGENESI DELLA NAFLD (DA TARGHER 2015)

l'incrementata produzione di tali lipidi, in particolare del DAG, è determinate nel causare l'insulino resistenza intraepatica ¹⁸, nel promuovere l'infiammazione epatica e nel contribuire ad incrementare il rischio di progressione in NASH.

Nel fegato la produzione di ceramici utilizza LCFAs; le ceramidi si possono accumulare nelle cellule attraverso tre differenti processi: 1) attraverso l'idrolisi della sfingomieline, fosfolipide di membrana per intercessione dell'enzima sfingomielinasi; 2) attraverso la sintesi de novo di LCFAs come il palmito e la serie 3) attraverso un pathway misto che utilizza la sfingosina e forme di ceramide.

Contrariamente a quanto si riteneva in passato, in cui si considerava la ceramide una semplice molecola strutturale, attualmente si ritiene che l'incremento della ceramide nelle membrane cellulari possa causare insulinoresistenza ¹⁹.

La sintesi di lipidi come il DAG è strettamente correlata all'attivazione della cascata infiammatoria, il DAG può essi stesso contribuire alla produzione di citochine infiammatorie (TNF- α ; Interleuchina-6) e di fattori procoagulanti (es. fattore VIII).

Inoltre la disbiosi intestinale, probabilmente causata da una dieta particolarmente ricca in carboidrati semplici e povera in fibre, può influenzare altri pathways lipidici, come quelli coinvolti nel metabolismo degli acidi biliari, contribuendo pertanto ad incrementare la infiammazione epatica e la conseguente fibrosi favorendo la progressione alla cirrosi e, in alcuni casi, all'HCC (figura 2) ²⁰.

Di recente, la vitamina D ha rivestito il ruolo di nuovo protagonista nella patogenesi della NAFLD, in particolare alcuni studi ne hanno dimostrato una associazione pressochè diretta tra i livelli di vitamina D e l'entità di danno epatico nei pazienti con NAFLD ^{21 22}.

Le possibili ipotesi patogenetiche che imputano al deficit di vitamina D un possibile ruolo nella patogenesi della NAFLD possono essere riconducibili 1) alle azioni pleiotropiche esercitate dalla vitamina D e dall'ubiquitarità del suo recettore (VDR); 2) al possibile ruolo della vitamina D sull'attività dell'adiponectina; 3) agli effetti immunomodulatori della vitamina D.

La vitamina D media i propri segnali intracellulari attraverso il VDR che è costitutivamente espresso nel fegato ^{23 24}.

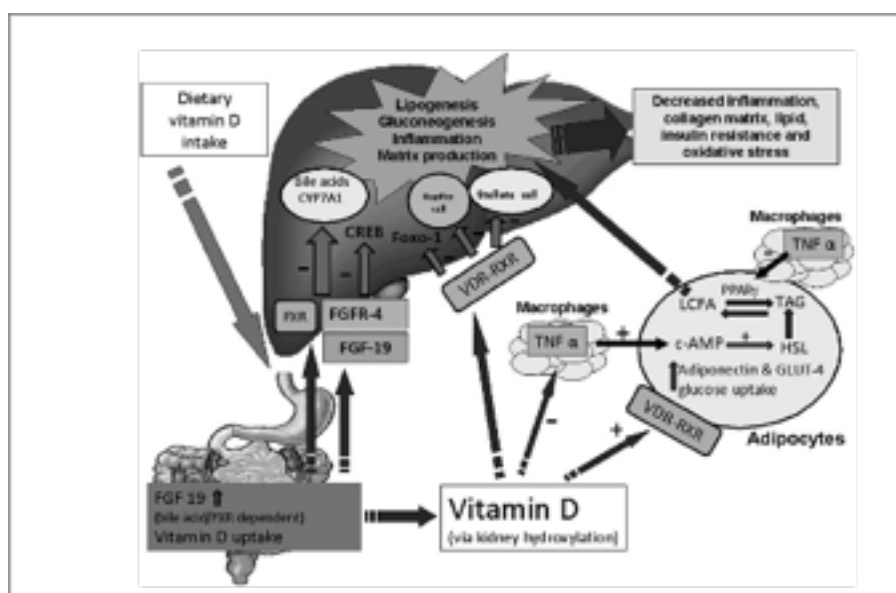


FIGURA 3. RUOLO DELLA VITAMINA D NELLA PATOGENESI DELLA NAFLD

E' stato stimato che il VDR regoli più di 200 geni coinvolti nel metabolismo glucidico ²⁵ e lipidico, nell'infiammazione, nella proliferazione e differenziazione cellulare nonché nell' apoptosi ²⁶.

L'adiponectina è una citochina dal noto potere antifiammatorio; tale citochina, insieme alla espressione del suo recettore a livello epatico, è ridotta nei pazienti con NASH ²⁷. La vitamina D sembrerebbe essere positivamente associata ai livelli di adiponectina, indipendentemente dal BMI²⁸.

Gli effetti immunomodulatori della vitamina D sono ben conosciuti (attivazione dei monociti e della risposta del sistema immune innato). In particolare, nella NAFLD, la vitamina D interverrebbe nel modulare la necroinfiammazione epatica attraverso l'attivazione dei Toll-like receptors (TLR) 2 e 4. I TLR2 e 4 sono coinvolti nel signalling dei lipopolisaccaridi e nel riconoscimento dei batteri attraverso il CD 14 (recettore delle endotossine) e la lipopolisaccaride-binding protein, confermando la partecipazione della disbiosi intestinale nella patogenesi della NAFLD.

L'aumentato carico di ligandi del TLR conseguente alla sovracrescita batterica intestinale ed alla aumentata permeabilità intestinale sottolinea l'importanza dell'interazione fegato- intestino e l'importanza dell' immunomodulazione, nella progressione della NAFLD ²⁹.

Epidemiologia della NAFLD

Incidenza

L'incidenza mondiale della NAFLD non è ben conosciuta.

Infatti solamente pochi studi sono stati pubblicati su tale argomento ed i risultati sono ampiamenti divergenti a causa della variabilità delle manifestazioni della NAFLD in funzione dei differenti gruppi etnici e delle diverse popolazioni valutate.

Per ragioni ancora non completamente chiare la NAFLD è più frequente negli uomini rispetto alle donne, sebbene le stime della NAFLD non siano completamente precise l'incidenza della stessa è stimata essere compresa tra 20/10,000 persone/anno con un picco di incidenza intorno alla sesta decade vita ³⁰.

In uno studio Giapponese su 3146 individui senza NAFLD (ma con sindrome metabolica) seguiti per 414 giorni l'incidenza è stata del 10% ³¹.

In un altro studio, sempre giapponese l'incidenza della NAFLD è stata stimata di 31 casi su 1000 persone all'anno ³².

Risultati pressochè analoghi si sono avuti in Europa in uno studio inglese in cui l'incidenza è stata stimata di soli 29 casi su 100.000 persone/anno ³³.

Da uno studio italiano in cui i pazienti sono stati seguiti in un follow up di 8 anni l'incidenza della NAFLD è salita a 18.5 nuovi casi/1000 persone/anno ³⁴.

I risultati discordanti degli studi esaminati, come anticipato in precedenza, rendono difficile una reale stima dell'incidenza delle NAFLD, anche in virtù della difficoltà nel comparare tali studi per via delle differenze tra le popolazioni esaminate, le differenti etnie e la durata del follow up.

Malgrado ciò, è facilmente valutabile una stima indiretta dell'incidenza della NAFLD considerando l'incidenza dei suoi fattori di rischio. Nelle ultime tre decadi, infatti, l'incidenza dell'obesità è aumentata di circa 3 volte per tale motivo è presumibile ipotizzare un incremento dell'incidenza della NAFLD (anche se l'obesità non rappresenta l'unico fattore di rischio)³⁵.

Prevalenza

La prevalenza esatta della NAFLD non è ben conosciuta dal momento che ancora non sono disponibili sei markers diagnostici specifici e non invasivi di tale gruppo di patologie.

Ciò malgrado la prevalenza stimata di NAFLD nella popolazione generale è stimata intorno al 20-30% e del 2-3% per la NASH ³⁶.

Gli studi che fino ad ora condotti quelli che hanno utilizzato le aminotrasferasi come test di screening hanno riscontrato un incremento delle stesse tra il 3 ed il 6% nella popolazione generale. Questo collocherebbe la steatoepatite al primo od al secondo posto tra le cause di incremento delle aminotrasferasi in funzione della copresenza di obesità ³⁷.

Molti di pazienti che presentavano un incremento inaspettato delle aminotrasferasi avevano la NAFLD, in virtù della forte relazione esistente tra l'incremento degli enzimi epatici e la presenza di fattori di rischio metabolici ³⁸.

Il limite degli studi che utilizzano l'incremento delle aminotrasferasi come indicatore di NAFLD è l'esclusione di tutte quelle forme di NAFLD con transaminasi nella norma.

Dagli studi che hanno utilizzato l'ecografia epatica come strumento di screening per la NAFLD, la prevalenza della NAFLD è stata stimata tra il 20 ed il 30% nei paesi occidentali ed orientali ³⁹.

Infine, dagli studi che hanno utilizzato la spettroscopia di risonanza magnetica per la stima del contenuto di trigliceridi epatico

è emerso che un terzo della popolazione generale degli Stati Uniti ha un eccessivo accumulo di grasso nel fegato ⁴⁰.

Malgrado quanto emerso dagli studi sopra descritti non conosciamo l'effettiva entità di danno epatico corrispondente a tali ritrovamenti; per fare ciò il gold standard, ad oggi, è la biopsia epatica che, non è stata eseguita negli studi di popolazione sopra descritti.

L'attuale prevalenza stimata su studi di popolazione è stimata intorno la 30-40% tra gli uomini e il 15-20% delle donne ⁴¹ per aumentare fino al 70% tra le persone affette da diabete di tipo 2 ⁴².

La progressione della NAFLD a steatoepatite non alcolica (NASH) interessa circa il 30-40% delle persone; di queste circa il 50% sviluppa fibrosi ⁴³.

Da una metanalisi di circa 40 studi è emerso che la NASH aumenta il rischio di mortalità legata a patologie epatiche fino a 10 volte in funzione della presenza o meno di fibrosi; quest'ultima rappresenta un forte fattore predittivo di mortalità tra i pazienti con diagnosi istologica di NAFLD⁴⁴.

Nel 2009 il 10% dei pazienti con NASH ha ricevuto un trapianto attico negli Stati Uniti; in considerazione dello spettro di patologie che racchiude la NAFLD e delle quali la NAFLD è causa/conseguenza è verosimile che nei prossimi anni la NAFLD sarà una delle principali indicazioni che richiederanno un trapianto epatico ⁴⁵.

Tali risultati sottolineano la gravità della steatosi epatica come problema reale per la salute pubblica rappresentano in paesi come la Francia il 55% delle cause di incrementi insperati delle transaminasi ed il 39% delle cause di malattie epatiche negli Stati Uniti ^{46 47}. L'obesità rimane comunque un forte predittore di NAFLD tra le persone che consumano meno di 30-50 g di alcool al giorno ⁴⁸.

NAFLD e diabete di tipo 1

Da recenti evidenze emerge che la NAFLD, sebbene sia da sempre associata al paziente affetto da diabete di tipo 2 o a pazienti con sindrome metabolica, sia anche una caratteristica del diabete di tipo 1 (T1DM). In pazienti con diabete di tipo 1 la NAFLD si manifesta con una prevalenza superiore del 44% rispetto alla popolazione non diabetica anche con ALT nel range di normalità ⁴⁹
^{50 51 52}.

Sebbene il T1DM sia caratterizzato dalla mancanza di insulina, obesità ed insulinoresistenza sono due fattori che si possono sviluppare anche nei pazienti diabetici di tipo 1.

Quando tali fattori coesistono nel diabetico di tipo 1 si parla di “double diabetes”. Tale termine, utilizzato da Killpatrick è utilizzato per descrivere il nuovo “fenotipo clinico” del paziente diabetico di tipo 1 che presenta caratteristiche proprie del diabete di tipo 1 (autoimmunità) e contemporaneamente tratti un tempo peculiari del diabete di tipo 2: obesità viscerale ed insulinoresistenza che, come precedentemente descritto sono dei fattori di rischio per la NAFLD ⁵³. Questo spiegherebbe altresì l’incrementata prevalenza della sindrome metabolica nei soggetti con T1DM (20-50%) ⁵⁴.

I fattori di rischio nella patogenesi della NAFLD nel T1DM sono: l’età avanzata, l’elevato BMI, l’ipertensione arteriosa e lo

scarso controllo glicemico, l'insulinoresistenza (indipendentemente dal BMI). Inoltre rispetto ai pazienti con DM1 senza NAFLD, i pazienti diabetici di tipo 1 con NAFLD presentano una maggior propensione al danno renale, alla retinopatia diabetica e al rischio cardiovascolare, indipendentemente da fattori quali l'età, il sesso, la durata di malattia, l'HbA1c, la storia di fumo di sigaretta, l'assetto lipidico o l'assunzione di farmaci ^{55 56}.

Nel diabete di tipo 1 l'insulina somministrata sottocute è assorbita e passa nel flusso ematico ed una frazione di essa raggiungere il fegato tramite la vena e l'arteria epatiche.

E' verosimile che il rapporto tra l'insulinemia della vena portale e quella della arteria epatica sia pressoché uguale ad 1. La conseguenza di ciò, sebbene ancora non chiara, potrebbe avere delle ripercussioni sua sul metabolismo dei carboidrati che nella degradazione insulinica ⁵⁷.

Le possibili ipotesi patogenetiche sulla NAFLD nel T1DM possono essere riconducibili all'alterato metabolismo di carboidrati e del glicogeno.

Gli epatociti incamerano il glucosio indipendentemente dall'insulina attraverso il trasportatore del glucosio GLUT-2, trasportatore a bassa affinità ed alta capacità che consente l'ingresso del glucosio anche in presenza di alte concentrazioni di glucosio nei sinusoidi epatici.

Negli epatociti il glucosio è rapidamente fosforilato a glucosio -6- fosfato, quindi il flusso di glucosio è diretto verso la sintesi di glicogeno attraverso diretta od indiretta di produzione del glicogeno o verso la glicolisi ⁵⁸.

In pazienti T1DM con scadente controllo metabolico è stata osservata un'alterazione della sintesi epatica di glicogeno che è stata in parte ripristinata dopo il miglioramento del controllo metabolico mediante una migliore insulinizzazione dei pazienti ⁵⁹.

Sebbene l'inibizione della glicogenolisi si manifesti in pazienti con ridotti livelli di glucagone di insulinemia e in condizioni di scompenso metabolico ⁶⁰, il trattamento insulinico intensivo ed un buon controllo metabolico non escludono eventuali elevati livelli glicogeno (probabilmente non tali da causare epatomegalia) ⁶¹.

In base a quanto sopra esposto l'accumulo epatico di glicogeno nei pazienti con diabete instabile è causato da un flusso passivo di glucosio nell'epatocita in maniera insulino-indipendente ⁶². Nell'epatocita il glucosio è convertito in glicogeno dalla glicogeno sintetasi. Tale enzima esiste nella forma inattiva fosforilata e si attiva per defosforilazione dall'enzima fosfatasi. La concentrazione della fosfatasi è mantenuta dall'insulina, e la sua attività dipende dalla presenza di glucosio.

Per cui, la sintesi epatica di glicogeno è promossa alte concentrazioni citoplasmatiche di glucosio e dalla presenza di insulina.

Questo è quanto avviene sia nei pazienti con diabete instabile (in cui vi è sia iperglicemia che iperinsulinemia- per correggere l'iperglicemia-) che tra i pazienti con frequenti ipoglicemie (che sono costretti ad assumere maggiori quantità di glucosio per correggere l'ipoglicemia). Tale ipotesi sembrerebbe giustificare i risultati ottenuti in uno studio condotto da Nakamuta *et al.* in cui il trattamento insulinico massivo della chetoacidosi diabetica era stato l'elemento scatenante l'epatomegalia⁶³.

Confermando la diagnosi ecografica della NAFLD nei T1DM va posta in diagnosi differenziale l'epatopatia glicogenica che non può essere differenziata ecograficamente dalla NAFLD.

L'epatopatia glicogenica solitamente si verifica dopo l'insulinizzazione del paziente diabetico già in cattivo controllo metabolico. Nei bambini tale condizione raramente può evolvere in fibrosi ma può portare alla sindrome di Mauriac che si presenta con epatomegalia, incremento delle transaminasi, ritardo di crescita e pubertà ritardata ⁶⁴.

Vitamina D

Fisiologia della vitamina D

Le vitamine sono sostanze naturali acquisite con il cibo e non sintetizzate dal nostro organismo: è pertanto improprio parlare di “vitamina” D in quanto gran parte di essa viene prodotta dall’organismo durante l’esposizione ai raggi solari; per tale motivo sarebbe più corretto definirla un pro-ormone steroideo liposolubile ⁶⁵.

L’irradiazione dei raggi solari UV-B (lunghezza d’onda 290-315 nm) è la primaria fonte di vitamina D (oltre alla supplementazione dietetica). Le fonti di vitamina D derivati dalla dieta sono limitate. Esse includono l’olio di pesce (come il salmone, il merluzzo e le sardine), il tuorlo d’uovo, alcuni cibi supplementati con vitamina D, alcuni cereali, succo d’arancia, yogurt e le margarine ^{66 67 68}.

In molte nazioni Europee il latte vaccino non è per default arricchito con vitamina D contrariamente alla margarina ed alcuni tipi di cereali.

Esistono due forme di vitamina D: la vitamina D₂ (ergocalciferolo) che deriva dai lieviti e dell’ergosterolo delle piante, e la vi-

tamina D_3 (colecalfiferolo) che si trova in alcuni tipi di pesce ed è sintetizzato nella pelle.

Il bilancio vitaminico D è rappresentato all'apporto sia di vitamina D_2 che D_3 .

L'irradiazione cutanea con raggi UV-B stimola la fotolisi del 7-deidro- colesterolo (provitamina D_3) a previtamina D_3 nella membrana plasmatica dei cheratinociti umani. Una volta formata nella pelle la previtamina D_3 è rapidamente convertita in vitamina D_3 dalla temperatura cutanea. La vitamina D_3 derivante dalla pelle e la vitamina D derivante dalla dieta vanno incontro a due sequenziali idrolisi; la prima nel fegato dove viene trasformata in 25-idrossivitamina D (25(OH)D) o calcifediolo, (la cui concentrazione sierica consente di valutare lo stato vitaminico D dell'individuo)^{69 70} e la seconda nel rene, mediante l'enzima 1- α -idrossilasi (CYP27B1), dove la vitamina D viene convertita nella forma attiva: l'1,25(OH)₂D o calcitriolo; questa attività renale è regolata principalmente dal paratormone (PTH) (figura 4)⁷¹.

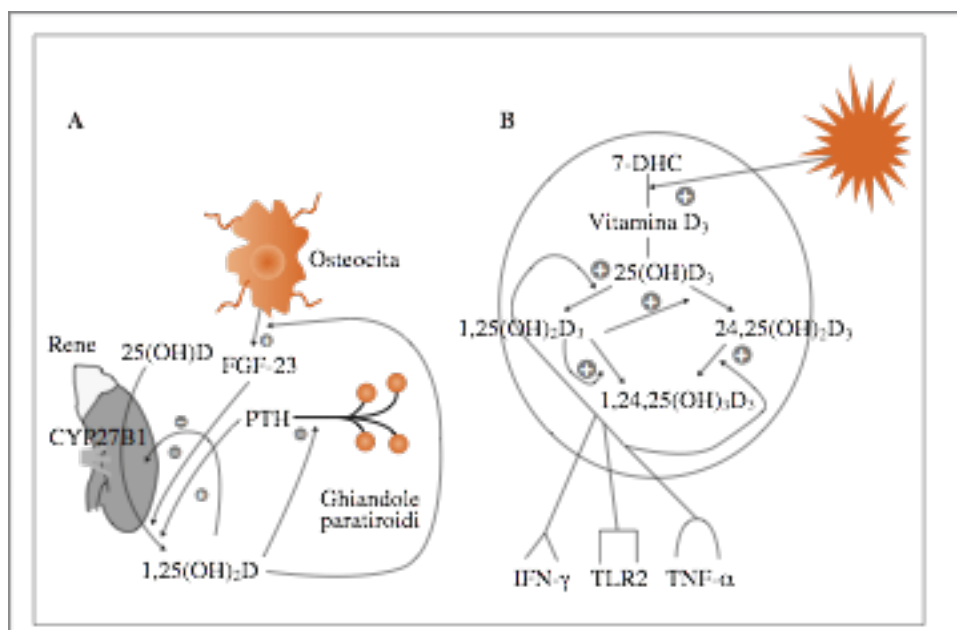


FIGURA 4. ATTIVAZIONE RENALE DELL'1,25 (OH)₂ D E SINTESI CUTANEA DELLA VITAMINA D

L'1,25(OH)₂D stimola l'espressione dell'enzima catabolico 25(OH)D-24-idrossilasi (CYP24A1), che trasforma calcifediolo e calcitriolo in acido calcitroico, idrosolubile e biologicamente inattivo.

L'eccessiva esposizione ai raggi solari non causa intossicazione di vitamina D dal momento che sia la vitamina D₃ che la previtamina D₃ sono fotolizzate nei fotoprodotti inattivi^{72 73}.

La pigmentazione cutanea derivante dalla melanina è un'effettiva protezione solare; un'incrementata pigmentazione cutanea può

ridurre la sintesi di vitamina D fino al 99% come se venisse applicata una protezione solare di SPF 15 ^{74 75}.

I cheratinociti sono altresì capaci di idrolizzare la 25(OH)D per produrre 1,25(OH)₂D. La 1,25(OH)₂D derivante dai cheratinociti o dal renale è in grado di regolare la differenziazione dei cheratinociti⁷⁶. L'apoptosi dei melanociti e la produzione di melanina e potrebbe essere un altro meccanismo per regolare la sintesi cutanea di vitamina D₃ attraverso un feedback negativo.

Il ligando della 1,25(OH)₂D si lega ad alta affinità con il recettore della vitamina D (VDR) e stimola l'aumento dell'assorbimento interstiziale di calcio e fosforo. In aggiunta la vitamina D è coinvolta nella formazione, nel riassorbimento e nella mineralizzazione ossea e nel mantenere la funzione neuromuscolare (figura 5) ⁷⁷.

I livelli circolanti di 1,25(OH)₂D riducono i livelli sierici di paratormone (PTH) sia direttamente, esercitando un feed-back negativo sulle paratiroidi, che indirettamente aumentando le concentrazioni sieriche di calcio.

Quando i livelli di vitamina D sono inadeguati ne consegue un'immediata alterazione del metabolismo calcio-fosforo. La vitamina D è primariamente responsabile della regolazione dell'efficienza dell'assorbimento intestinale di calcio. In condizioni di

ipovitaminosi D il piccolo intestino assorbe circa il 10-15% del calcio assunto con l'alimentazione.

Viceversa quando i livelli di vitamina D sono ottimali l'assorbimento intestinale di vitamina D è del 30-40%⁷⁸. Per cui, quando i livelli di vitamina D sono bassi l'assorbimento di calcio è insufficiente per soddisfarne le richieste non solamente a livello osseo ma anche per tutte le funzioni metaboliche e per l'attività neuromuscolari.

Alla carenza vitaminica D il corpo risponde incrementando i livelli di PTH sierici.

L'incremento del PTH ripristina l'omeostasi del calcio incrementandone il riassorbimento tubulare renale, aumentando il riassorbimento osseo ed incrementando la produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

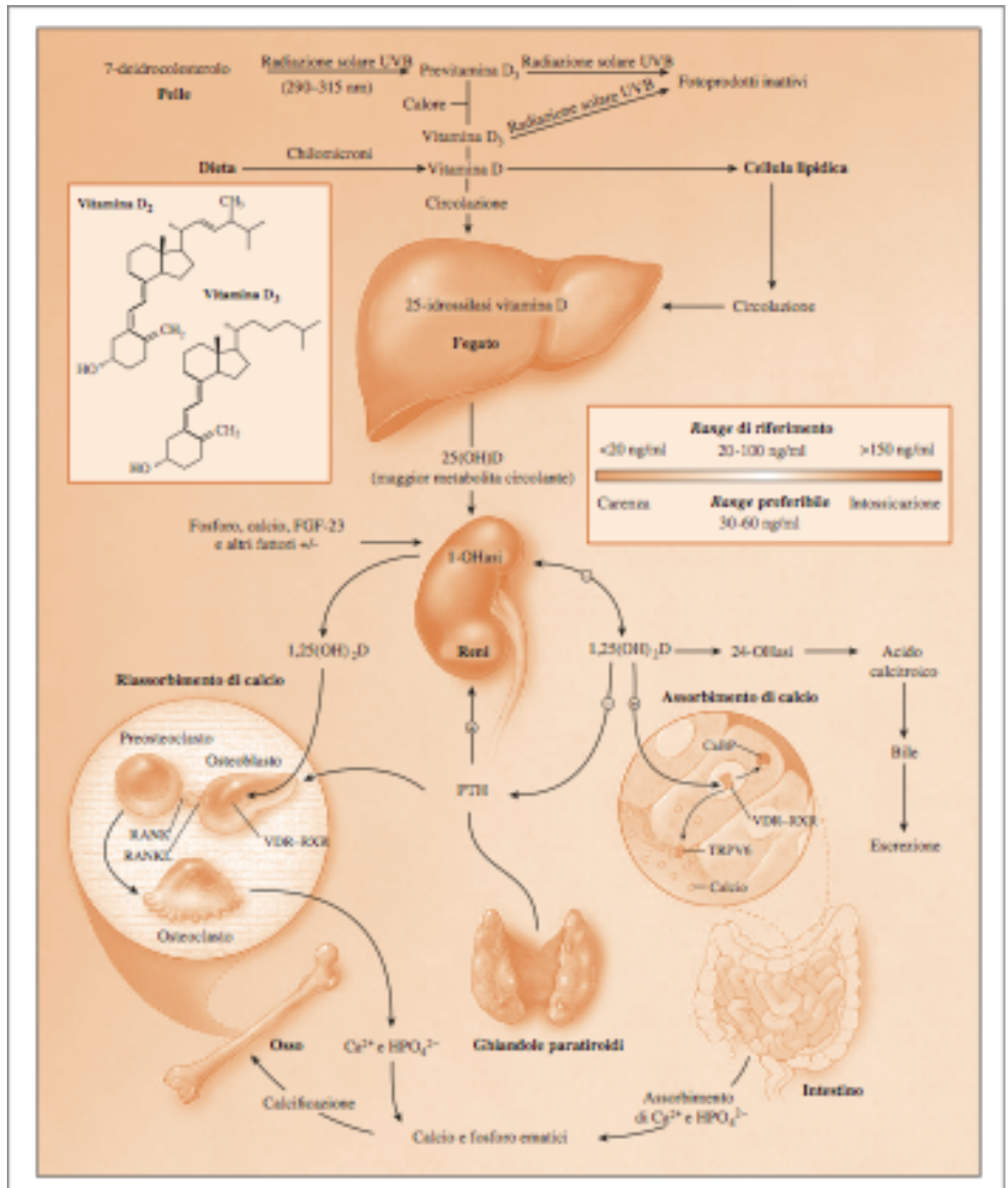


FIGURA 5. METABOLISMO DELLA VITAMINA D

Effetti extrascheletrici della vitamina D.

Vitamina D e diabete di tipo 1

La scoperta che quasi tutti i tessuti (es. cervello, colon, prostata, mammella, etc) e le cellule (es. macrofagi, linfociti attivati etc) del nostro organismo esprimono il recettore per la vitamina D (VDR) e che molte esprimono anche la CYP27B1 (che converte la 25(OH)D nella forma attiva 1,25(OH)2D) ha aperto nuovi orizzonti sulle molteplici funzioni non scheletriche di questa molecola.

A livello dei tessuti extrascheletrici, a differenza del corrispettivo enzima renale, l'1- α -idrossilasi non è regolata dal PTH, ma dalla disponibilità del substrato, ovvero dai livelli di 25(OH)D.

Nei tessuti che non sono deputati alla regolazione del calcio, come il colon, la prostata e la mammella, la produzione locale di 1,25(OH)2D si pensa sia atta a regolare più di 200 geni deputati nella regolazione del metabolismo glucidico, dell'immunità (esercitando un effetto immunomodulatoria sui mioici sui linfociti B e T attivati), della secrezione insulinica del sistema cardiovascolare (inibendo la produzione di renina nel rene)⁷⁹ nonché nella crescita cellulare e nella differenziazione cellulare; è proprio nella crescita e nella differenziazione cellulare che la vitamina D mediterebbe la riduzione rischio trasformazione maligna delle cellule stesse^{80 81}.

L'interazione tra vitamina D e sistema immunitario è stata oggetto di innumerevoli studi e pubblicazioni nel corso degli ultimi anni, la maggior parte dei quali ha enfatizzato la presenza di un forte legame tra deficit di vitamina D e varie patologie autoimmuni, in particolare diabete mellito tipo 1, sclerosi multipla, lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide e malattie infiammatorie croniche intestinali (morbo di Crohn, rettocolite ulcerosa).

È stato inoltre dimostrato che la vitamina D e analoghi non solo prevencono lo sviluppo di malattie autoimmuni, ma possono anche essere utilizzati nel loro trattamento ⁸².

E' ampiamente dimostrato che vi sia una maggiore prevalenza di ipovitaminosi D tra i soggetti T1DM rispetto alla popolazione non diabetica e che sia il deficit di vitamina D che l'incidenza di T1DM presentino un gradiente Nord-Sud ^{83 84}.

Nella patogenesi del diabete di tipo 1 la vitamina D interviene e il ruolo immunomodulatore della 1,25(OH)₂D influisce sulla produzione di citochine, riducendola, e nella proliferazione di linfociti, entrambi meccanismi implicati nella patogenesi del T1DM e che rendono le beta cellule meno prone alla infiammazione; ciò determina una riduzione dell'infiltrazione e da parte dei linfociti T, un incremento delle cellule regolatrici e un arresto del processo immune (figura 6).

Inoltre la 1,25(OH)₂D riduce l'espressione dell'MHC di classe I riducendo la vulnerabilità delle β cellule all'azione citologica dei linfociti T ⁸⁵. In aggiunta le β cellule esprimono il VDR e rispon-

dono alla 1,25(OH)₂D incrementando la produzione di insulina

86.

Studi su animali hanno dimostrato il ruolo della vitamina D nell'arresto dell'insulite e della progressione a T1DM nei topi NOD nonché la prevenzione dello sviluppo del T1DM dopo la somministrazione di importanti dosi di vitamina D ⁸⁷.

Similmente, da quanto emerso negli studi sugli umani la supplementazione con vitamina D si associa ad una riduzione del rischio di T1DM. Allo stesso modo la supplementazione con vitamina D durante la gravidanza riduce il rischio di sviluppare T1DM nel prodotto del concepimento ^{88 89}.

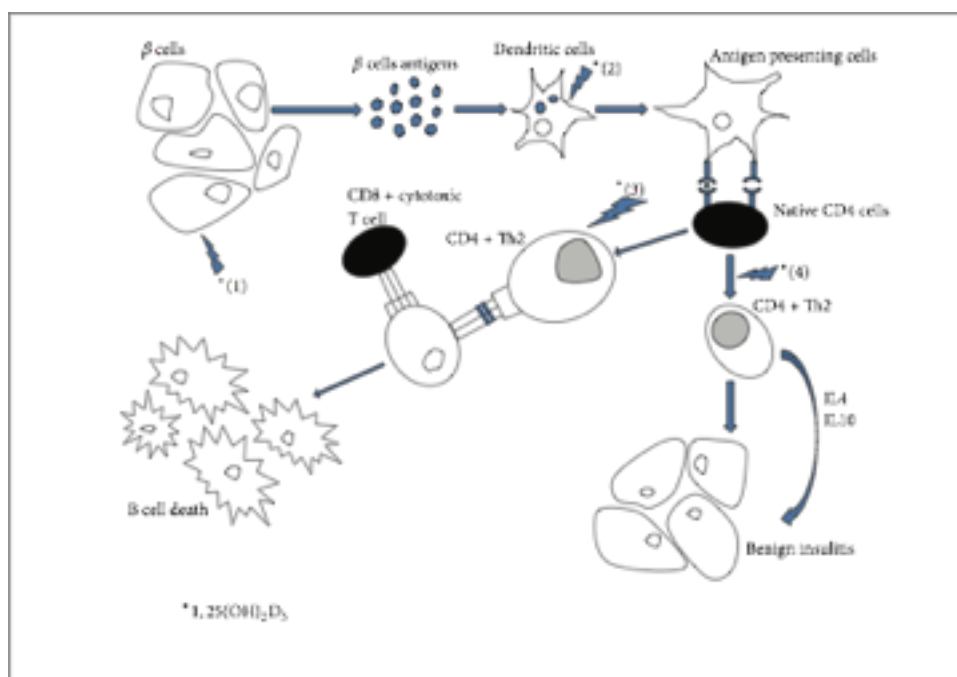


FIGURA 6. RUOLO DELLA VITAMINA D NELLA PATOGENESI DEL T1DM

Vitamina D e NAFLD

Come descritto nei capitoli precedenti anche il fegato presenta il VDR e risente degli effetti della vitamina D. In particolare è stato dimostrato che negli epatociti dei pazienti con NAFLD, rispetto ai pazienti senza NAFLD, siano più frequenti i polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) a carico del gene codificante per la proteina legante la vitamina D, principale carrier della stessa. Inoltre i pazienti con NAFLD, rispetto ai controlli senza NAFLD, presentano minori livelli di vitamina D ⁹⁰.

A livello epatico il VDR esercita un ruolo nella progressione della fibrosi, inoltre, la sua espressione è inversamente correlata alla severità della NAFLD indipendentemente da altri parametri metabolici come il BMI, l'insulino resistenza o l'adiponectina.

Le basi patogenetiche secondo le quali la vitamina D potrebbe essere legata allo sviluppo della NAFLD riguardano prevalentemente l'effetto della vitamina D sulla infiammazione (attraverso la modulazione delle citochine), sull'insulinoreistenza e sull'effetto antiproliferativo e antifibrotico.

La vitamina D, infatti, nella NAFLD esercita un'influenza positiva sull'adiponectina (adipochina chiave nella patogenesi della NAFLD) e sulla riduzione dei livelli di citochine pro infiammatorie come l'IL6 e la IL1 β provvedendo in tal modo ad arrestare la progressione del danno epatico ⁹¹.

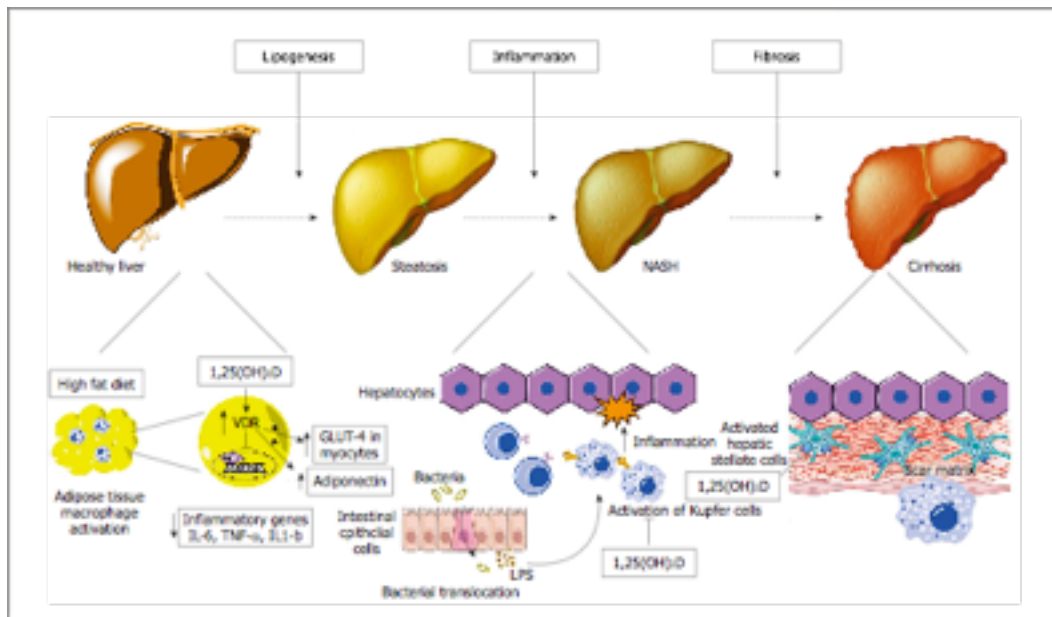


FIGURA 7. RUOLO DELLA VITAMINA D NELLA PATOGENESI DELLA NAFLD

La vitamina D interviene sull'insulinoresistenza modulando l'espressione del recettore GLUT-4 e la sua traslazione sulla superficie cellulare incrementando così l'uptake di glucosio e la sua utilizzazione ⁹².

l'effetto antiproliferativo ed antifibrotico esercitato sulle cellule stellate del fegato è ancora oggetto di studi e di approfondimenti. Ciò malgrado vi sono evidenze che le cellule stellate abbiano marcatamente espresso il VDR il cui signalling abbia la funzione di sopprimere l'espressione dei geni coinvolti nella fibrosi e nella formazione di collagene di tipo 1 nonché di inibire la proliferazione delle cellule stellate (figura 7) ⁹³.

Il recettore della vitamina D (VDR)

Come sopra descritto le azioni della vitamina D sono veicolate dall'interazione con il suo recettore nucleare (VDR) che è ubiquitario in molti organi e tessuti.

Gli effetti della Vitamina D sono mediati dal VDR, che forma un complesso eterodimerico con il recettore dell'acido retinoico ed interagisce con i fattori di trascrizione.

Il gene del VDR è situato sul cromosoma 12 (12q12-14) codifica per una proteina di 427 aminoacidi (aa), che regola il trasporto e l'omeostasi del calcio. Il gene in toto è costituito da 14 esoni; i 6 esoni da 1a a 1f codificano per la regione 5' non tradotta mentre gli 8 esoni dal 2 al 9 codificano per la proteina VDR⁹⁴.

I promotori del VDR si trovano negli esoni 1d, 1a e 1f e danno luogo a diversi trascritti tessuto specifici ⁹⁵.

In particolare il VDR è espresso ubiquitariamente nel sistema immunitario, in alcune ghiandole endocrine come le paratiroidi, le beta cellule pancreatiche, l'ipofisi, il fegato, il tessuto scheletrico, la ghiandola mammaria etc ⁹⁶.

Il VDR è composto da tre domini: 1) il dominio di N-terminale di transattivazione per il legame al fattore di trascrizione TFIIB ; 2) il dominio C-terminale di legame con la vitamina D (Ligand Binding Domain) che riconosce la molecola di calcitriolo 3) e la regione cerniera che lega i due precedenti domini tra loro rappresentata da due dita di zinco che interagiscono con sequenze specifiche del DNA nelle regioni promotrici della trascrizione dei

geni regolati dall' 1,25(OH)2D3, e che sono inoltre responsabili della formazione di un eterodimero con il Recettore dell'acido retinoico (RXR)⁹⁷.

Dopo il legame con la 1,25(OH)2D3 il VDR nucleare media l'attivazione trascrizionale.

Il VDR legatosi alla vitamina D si associa al RXR formando un eterodimero VDR-RXR. Tale eterodimero (VDR-RXR) attiva o reprime diversi geni target legandosi agli elementi responsivi alla vitamina D positivi o negativi (Vitamin D Responsive Elements, VDREs e Negative Vitamin D Responsive Elements, nVDREs) presenti nelle regioni promotrice, enhancer e di soppressione dei geni stessi ⁹⁸.

In questo modo il VDR regola l'espressione di geni coinvolti nelle diverse funzioni biologiche incluso lo sviluppo di organi, il controllo del ciclo cellulare, l'omeostasi del calcio e del fosforo nel metabolismo osseo, e la detossificazione da xenobiotici⁹⁹.

Il VDR esercita altresì un ruolo nella risposta immune innata ed acquisita, per tale motivo è implicato in un'ampia varietà di malattie quali, ad esempio, alcuni tumori, malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico, la malattia di Chron, il diabete di tipo 1, la sclerosi multipla e l'artite reumatoide.

L'analisi ontologica di circa 11,031 geni target putativi del VDR gene del VDR ha rivelato il coinvolgimento del VDR in diverse funzioni, quali il metabolismo (43%), la morfologia cellulare e tissulare (19%), l'adesione e la giunzione cellulare (10%), la dif-

ferenziamento e lo sviluppo cellulare (10%), l'angiogenesi (9%) e la transizione da epiteliale a mesenchimale (5%)¹⁰⁰.

La regolazione del VDR in condizioni basali è terminata da diversi fattori: ambientali, genetici ed epigenetici (figura 8).

I fattori ambientali che influenzano il VDR sono la dieta, esposizione ai raggi solari, l'età, l'inquinamento, il fumo di sigaretta e le infezioni intercorrenti. La maggior parte di tali fattori esercita le proprie azioni alterando i livelli di vitamina D (intesa come D₂ e D₃, precursori della ligando attivo del VDR, la 1 α , 25(OH)₂D). Come descritto nel paragrafo precedente la produzione di 1 α ,25(OH)₂D avviene nei reni e nei tessuti con il CYP27B1. Quando legata al VDR la forma attiva della vitamina D regola l'espressione dei VDREs nelle sue stesse regioni enhancers regolando pertanto il VDR stesso.

L'acquisizione del precursore della vitamina D, così come la produzione e la biodisponibilità del legando attivo è quindi essenziale per la regolazione e l'attività del VDR.

Livelli maggiori di 25(OH)D provenienti dalla dieta possono contribuire a incrementare i livelli di 1,25(OH)₂D attiva influenzando l'autoregolazione del VDR attraverso i VDREs ed i suoi enhancers¹⁰¹. Parallelamente la VDR legata alla vitamina D esercita una funzione autoregolatrice reprimendo, indirettamente, il CYP27B1 e riducendo quindi i livelli di vitamina D attiva downregolando la funzione del VDR¹⁰².

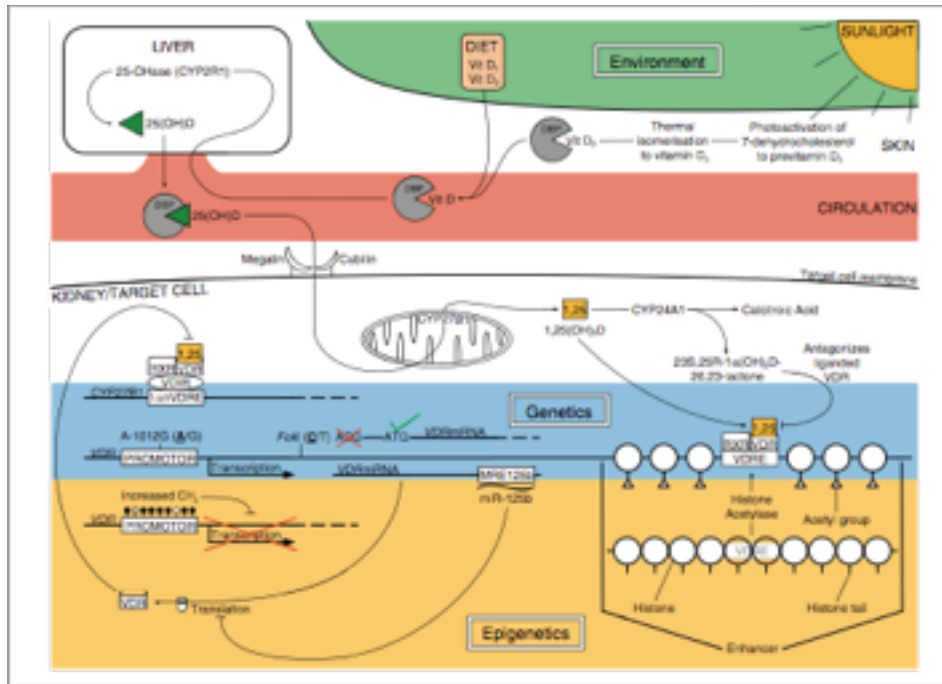


FIGURA 8. MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEL VDR

I fattori genetici intervengono nelle funzioni del VDR attraverso l'azione di esoni codificanti e non codificanti sotto il controllo di quattro promoters, alcuni dei quali tessuto specifici.

L'epigenetica si riferisce a cambiamenti sui geni transienti ed ereditari che non sono causati dalla variazione di sequenza nucleotidica ma da stimate epigenetiche con la mediazione del DNA, la modificazione delle sit-in e del RNA non codificante.

La regolazione epigenetica della funzione genica può avvenire su quattro livelli: la metilazione del DNA, le modifiche degli istoni, RNA non codificante e la variazione del "folding" delle proteine. Il VDR È regolato almeno tre meccanismi epigenetici, alcuni tessuto specifici: la mediazione del DNA le modifiche degli istoni e le alterazioni sull'RNA.

La metilazione del DNA quando aberrante, come nel caso della ipermetilazione nel promoter nella regione enhancer solitamente porta una cessazione dell'espressione genica. Casi di ipermetilazione del VDR sono stati riscontrati in alcuni tipi di tumore determinando un'alterazione dell'espressione e della funzione del VDR ¹⁰³.

Gli istoni sono solitamente modificati post-trascrizionalmente, primariamente nel dominio ammino terminale. Diverse modifiche sui differenti residui dando luogo a ruoli distinti nel facilitare la trascrizione attiva o la repressione di geni o di alcune regioni geniche alle quali sono legati. Per quanto riguarda il VDR, sono state riscontrate alcune modifiche introniche in alcuni tipi di tumore come l'osteosarcoma. Tuttavia però, gli effetti specifici delle modifiche degli istoni sulla regolazione trascrizionale del VDR rimangono poco chiare ¹⁰⁴.

La stabilità dell'mRNA è un fattore determinante negli ultimi stadi della produzione delle proteine. Gli RNA Non codificanti RNAs (ncRNAs) sono molecole di RNA che non codificano per proteine ma che possono avere profondi effetti sulla stabilità degli mRNA. Gli ncRNA includono i micro RNA e lncRNA entrambi possono influire sulla stabilità dell'mRNA del VDR alterandone la stabilità. A riguardo poche sono ancora le evidenze scientifiche ¹⁰⁵.

Polimorfismi (SNPs) del VDR

Ad oggi, sono stati individuati all'interno del gene VDR più di 200 polimorfismi ¹⁰⁶. La maggior parte di essi è collocata in regioni non codificanti del gene, posizionate al 3'UTR, al 5'UTR e nelle regioni del promotore; a differenza dei polimorfismi delle regioni codificanti, essi non modificano la struttura aminoacidica del recettore, ma possono interferire con la trascrizione delle regioni codificanti o con la stabilità dell' mRNA. In alcuni casi, è stato suggerito che potrebbero essere in linkage disequilibrium con altri polimorfismi funzionali all'interno del gene VDR o in geni vicini.

La maggior parte di essi sono polimorfismi della lunghezza del frammento di restrizione (restriction fragment length polymorphisms, RFLP), individuabili quindi con l'utilizzo di diversi enzimi di restrizione.

I polimorfismi del VDR sono stati associati con il rischio di diverse patologie metaboliche, autoimmuni e neoplastiche, tra cui osteoporosi, osteoartrite, diabete, melanoma, carcinoma alla mammella e alla prostata. Tuttavia la valutazione dell'importanza di questi polimorfismi si è rivelata complessa e, come risultato, solo un piccolo numero di questi polimorfismi è stato studiato su larga scala.

In particolare, i quattro polimorfismi più studiati sono quelli caratterizzati dall'utilizzo degli enzimi di restrizione FokI, BsmI, ApaI e TaqI ¹⁰⁷. Gli alleli sono stati rispettivamente chiamati F-f,

B-b, A-a, e T-t: le lettere minuscole identificano la presenza del sito di restrizione e le lettere maiuscole indicano l'assenza di tale sito.

È interessante notare che i principali polimorfismi studiati non influiscono sulla struttura della proteina VDR, tuttavia è stato ipotizzato un loro ruolo nella variazione della stabilità del trascritto¹⁰⁸.

Gli alleli di BsmI, ApaI e TaqI mostrano un forte linkage disequilibrium, mentre non sembra esserci nessuna concordanza con gli alleli di FokI (figura 9)¹⁰⁹.

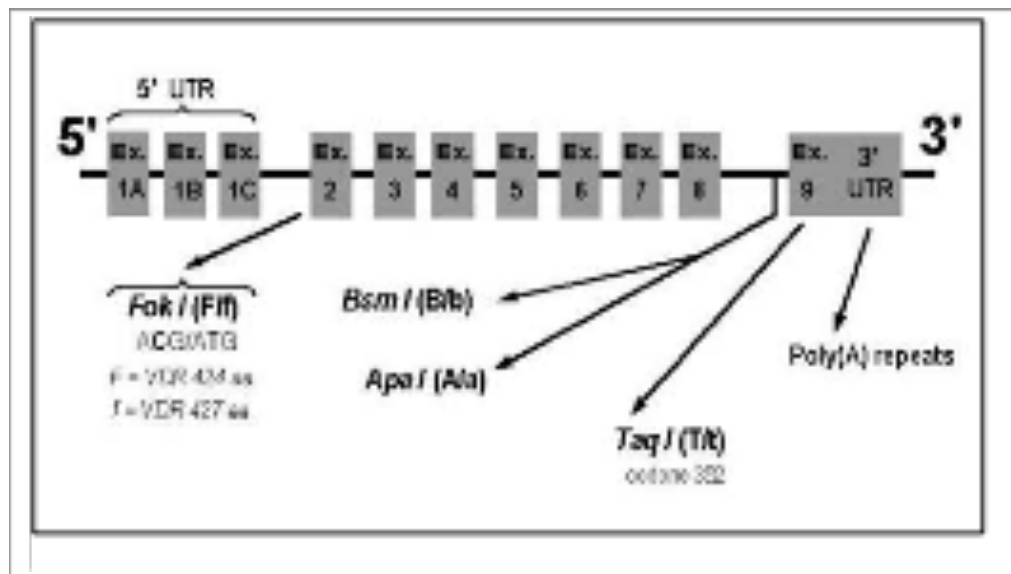


FIGURA 9. POLIMORFISMI DEL GENE DEL VDR (EX=ESONE, UTR= REGIONE NON TRASCITTA)

SNPs del VDR e diabete di tipo 1

I polimorfismi del VDR possono essere associati ad un'alterata unzione genica o espressione genica.

Come precedentemente descritto cinque sono i polimorfismi del VDR che sono stati maggiormente oggetto di studio: *FokI* (nell'esone 2), *BsmI*, *Tru9I*, *ApaI*, nell'intorno 8 e *TaqI* (nell'esone 9).

Studi di associazione delle varianti alleliche del VDR condotti su diverse popolazioni hanno portato a risultati contrastanti, infatti alcuni studi mostravano una associazione tra SNPs del VDR e T1DM molto significativa mentre altri studi non confermavano tali risultati.

La variante del genotipo Bb + BB del polimorfismo del *BsmI* è associata ad un significativo incremento del rischio di T1DM più del 30% rispetto al genotipo omozigote bb, contrariamente ai polimorfismi *FokI*, *ApaI* e *TaqI* tra gli Asiatici.

Tali differenze potrebbero suggerire il ruolo del polimorfismo del *BsmI* nella patogenesi del T1DM e potrebbero spiegare eventuali differenze nella suscettibilità al diabete di tipo 1.

Dal momento che il background genetico risente dell'etnia e del contesto geografico è necessario ponderare i risultati dei vari studi scientifici sugli SNPs del VDR nel T1DM tenendo conto delle popolazioni studiate. Fatta questa ulteriore differenziazione quanto detto in precedenza risulta confermato nelle popolazioni asiatiche ma non nelle europee (tabella 1) ¹¹⁰.

Nello studio DAISY (The Diabetes Autoimmunity Study in the Young) condotto su 1692 bambini europei non diabetici seguiti per 10

anni è emerso che gli SNPs del VDR non influenzavano significativamente il rischio di sviluppare T1D; tale risultato potrebbe essere legato al possibile effetto del VDR sulla patogenesi del T1DM solamente nel rapido sviluppo della malattia in presenza di anticorpi anti insula (IA) ma non per l'intera popolazione di pazienti geneticamente suscettibili (HLA-DR,DQ).

Popolazione	Polimorfismo del VDR associato con T1DM
Bangladesh	<i>FokI, BsmI, ApaI, TaqI</i>
Brasile	nessuna associazione
Cile	<i>BsmI, ApaI, TaqI</i>
Croazia	<i>Tru91, FokI</i>
Finlandia	nessuna associazione
Germania	<i>TakI, ApaI, BsmI, TruI</i>
Grecia	<i>FokI, BsmI, ApaI, TaqI</i>
Ungheria	<i>BsmI, ApaI, Tru91</i>
Nord India	<i>FokI, TaqI</i>
Sud India	<i>BsmI</i>
Italia	nessuna associazione

TABELLA 1. SNPS DEL VDR ASSOCIATI AL T1DM NELLE DIVERSE NAZIONI

Parallelamente è emerso che SNPs funzionali del VDR come VDR rs2228570 sono dei predittori di progressione dello sviluppo del T1DM. Una possibile spiegazione di tali differenze nei risultati ottenuti nei diversi studi potrebbe essere riconducibile al diverso background etnico delle popolazioni studiate nonché all'interazione tra fattori genetici ed ambientali coinvolti nella patogenesi del diabete di tipo 1 e le possibili differenze nell'esposizione ai raggi UV.

Infatti i polimorfismi del VDR, ad eccezione della variante allelica *FokI* che ha un effetto differenziale sul sistema immune, non hanno un effetto funzionale di per se ma potrebbero essere in linkage disequilibrium con il locus direttamente legato allo sviluppo del diabete da ipotesi potrebbe spiegare i risultati discordanti ottenuti per le diverse etnie ^{111 112}.

Deficit di vitamina D

Prevalenza e fattori di rischio

Il deficit di vitamina D è di frequente riscontro in età pediatrica e adulta, in tutti i gruppi etnici e anche alle nostre latitudini.

Le classiche manifestazioni scheletriche di tale deficit (rachitismo, osteomalacia e osteoporosi) sono a oggi considerate solo la punta dell'iceberg di tutti i possibili quadri clinici derivanti da uno stato di carenza di vitamina D.

Il deficit di vitamina D è una condizione ampiamente prevalente nella popolazione mondiale con una prevalenza stimata tra il 30 ed il 50% tra la popolazione giovane in Europa e tra il 30 ed il 60% degli adulti ed è maggiormente prevalente nei paesi mediterranei rispetto ai paesi nordici come la Norvegia (dove gli alimenti sono supplementati con vitamina D). La prevalenza del deficit di vitamina D sale poi fino a 90% tra i paesi in via di sviluppo.

Tale pandemia rimane generalmente passa inosservata, non venendo diagnosticata o, in alcuni casi, non è trattata.

I fattori di rischio per il deficit di vitamina D sono la ridotta esposizione ai raggi solari, la pigmentazione cutanea, abitudini culturali/religiose e l'età avanzata nonché patologie di carattere malassorbitivo, l'obesità severa, epatopatie o malattie renali o l'uso di farmaci che accelerano il metabolismo della vitamina D (ketoconazolo, anticonvulsivi, corticosteroidi)¹¹³.

Sulla base dei livelli di vitamina D si definisce deficit di vitamina D una concentrazione sierica di vitamina D inferiore a 20 ng/mL (< 50 nmol/L), insufficienza vitaminica D valori di vitamina D compresi tra 21–29 ng/mL (50-75 nmol/L). I livelli ottimali di vitamina D sono superiori a 30 ng/mL (75 nmol/L), mentre la tossicità da vitamina D è definita da concentrazioni sieriche di vitamina D superiori a 150 ng/mL (375 nmol/L)¹¹⁴.

Sia la sintesi cutanea di vitamina D che il suo apporto dietetico solitamente avvengono in maniera intermittente.

Un'assunzione irregolare di vitamina D, indipendentemente dalla fonte, può portare all'insufficienza cronica di vitamina D. Tale condizione è stata riportata nei diversi gruppi di età, nelle diverse aree geografiche e nelle diverse stagioni^{115 116}.

Pertanto l'indicazione alla supplementazione con vitamina D è sempre più frequente al fine di raggiungere concentrazioni ottimali di vitamina D.

Il principale problema della supplementazione con vitamina D è la compliance che è molto bassa soprattutto tra gli anziani che rappresentano una categoria a maggior rischio¹¹⁷.

Studio sperimentale

Background e razionale

La steatoepatite non alcolica (NAFLD) ha una prevalenza del 20-30% tra gli adulti occidentali. Tale dato raggiunge il 90% nei pazienti affetti da obesità patologica. la NAFLD è frequentemente associata alla sindrome metabolica e la sua prevalenza raggiunge il 70% tra i pazienti affetti da diabete di tipo 2. Recenti studi hanno dimostrato un incremento della incidenza di NAFLD anche tra i pazienti affetti da diabete di tipo 1 (T1D) in cui la presenza di tale condizione è stimata tra il 20-53% (in base alle fonti) sebbene ancora il meccanismo patogenetico che ne è alla base sia poco chiaro.

Una possibile spiegazione dell'incremento dell'incidenza di NAFLD anche nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 potrebbe essere ricondotta, almeno in parte, al disequilibrio nel metabolismo dei triacilgliceroli ed all'insulinoresistenza, presenti nel diabete di tipo 1 e alla base della patogenesi della NAFLD.

Un interessante dato emerso relativamente alla NAFLD e il diabete di tipo 1 è dato dalla maggiore incidenza di nefropatia diabetica cronica (CKD) e altre malattie microvascolari nei pazienti diabetici di tipo 1 con NAFLD indipendentemente dal controllo metabolico od altri fattori di rischio.

E' stato postulato che possa esistere una correlazione tra le concentrazioni di vitamina D e la presenza di NAFLD , giustificata dalla presenza di recettori per la vitamina D (VDR) anche nel fegato e nel pancreas.

Dati in letteratura indicano che basse concentrazioni di vitamina D si associano alla severità della steatosi, alla necroinfiammazione ed alla fibrosi nella NAFLD.

E' stato anche dimostrato che i livelli serici di vitamina D possono predire la severità della NAFLD indipendentemente da altri fattori come il BMI o l'insulinoresistenza.

L'effetto extrascheletrico della vitamina D è giustificato dalla presenza di recettori per la vitamina D (VDR) anche nel fegato e nel pancreas. In virtù di ciò la vitamina D interviene nel controllo degli acidi grassi liberi, nella regolazione dell'uptake glucidico e nei processi metabolici.

Nell'uomo il VDR epatico, quando attivato, inibisce la sintesi di acidi biliari agendo pertanto indirettamente sul metabolismo di lipidi e glucidi.

Inoltre polimorfismi del gene codificante per il VDR sono stati descritti come fattori di suscettibilità per il diabete. A tal riguardo, particolarmente rilevante è stata l'associazione tra la suscettibilità per il diabete tipo 1 ed il polimorfismo BsmI nonché con FokI e TaqI. Tale dato potrebbe spiegare il deficit di vitamina D riscontrato in pazienti con nuova diagnosi di diabete di tipo 1.

Dai dati in letteratura basse concentrazioni di vitamina D si associano alla severità della steatosi, alla necroinfiammazione ed alla fibrosi nella NAFLD. Inoltre i livelli serici di vitamina D possono predire la severità della NAFLD indipendentemente da altri fattori come il BMI o l'insulinoresistenza.

Benché i dati in letteratura supportino la correlazione tra NAFLD e vitamina D ad oggi, a nostro sapere, non ci sono studi che abbiano analizzato la correlazione tra NAFLD, vitamina D e diabete di tipo 1.

Materiali e metodi

Sono stati reclutati in maniera consecutiva 265 pazienti affetti da diabete di tipo 1 (95 uomini e 170 donne) afferenti presso gli ambulatori del centro antidiabetico dell'azienda ospedaliera di Padova che rispondevano ai criteri di inclusione/esclusione e che esprimevano il proprio consenso a partecipare allo studio. I pazienti che assumevano più di 20 g/die di alcool sono stati esclusi dallo studio. Nessuno dei pazienti inclusi nello studio aveva una storia positiva per epatite C o B o per consumo di sostanze stupefacenti. I criteri di inclusione ed esclusione utilizzati per il reclutamento dei pazienti sono riassunte nella *tabella 2*.

Previa firma del consenso informato i pazienti hanno eseguito una ecografia epatica ed un prelievo ematico per la determinazione della vitamina D (vn 75-250 nmol/l), PTH (vn 0-6 mg/l), Calcio (vn 2.1-2,5 nmol/l), fosforo (vn 0,87-1,45 nmol/l), magnesio (vn 0,7-1,05 nmol/l) e per la determinazione dei Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) del recettore della vitamina D; gli altri parametri metabolici (funzionalità renale, epatica, HbA1c) sono stati ricavati dalle cartelle cliniche dei pazienti. Il prelievo ematico e l'ecografia epatica sono stati eseguiti dopo un digiuno di almeno 8 ore.

Le misure antropometriche di base sono state eseguite in tutti i soggetti che hanno partecipato allo studio. In particolare sono state rilevate l'altezza, il peso, l'indice di massa corporea (BMI)

calcolato dividendo il peso (espresso in kilogrammi) per il quadrato dell'altezza espresso in metri, la circonferenza vita.

La pressione arteriosa è stata misurata due volte in posizione seduta con uno sfignomanometro a mercurio dopo un riposo di almeno 10 minuti.

La misurazione della 25(OH)D3 è stata eseguita con metodo colorimetrico (Laison, DiaSorin) presso il laboratorio centralizzato su sieri centrifugati, separati e conservati per alcuni giorni a -25°C in frigoriferi di precisione dotati di termometro.

Nel corso dell'ecografia epatica sono stati valutati il diametro addominale sagittale, la presenza o meno di steatosi, lo spessore del tessuto adiposo periepatico.

Il diametro addominale sagittale è stato determinato su paziente in posizione supina dal punto più alto della superficie addominale durante una normale respirazione.

La presenza/ assenza di NAFLD è stata valutata mediante sonda ecografia da 3.5 MHz. Nel corso della determinazione sono state ottenute le seguenti immagini: vista sagittale del lobo di destra del fegato e del rene destro; vista trasversale del segmento laterale sinistro del fegato e milza; vista trasversale del fegato e del pancreas; e vista di ogni altra area epatica che presentasse alterazioni ecografiche.

La presenza di steatosi epatica lieve o moderata è stata determinata sulla base dell'iperecogenicità del parenchima epatico rispetto al rene di destra.

La steatosi moderata o severa è stata definita in base all'attenuazione posteriore del segnale ecografico di grado lieve o marcato ed in base alla ridotta visualizzazione delle pareti dei vasi intraepatici e del diaframma. (sensibilità 60-84% e specificità 84-95%).

La sensibilità della tecnica si riduce in caso di pazienti obesi o di infiltrazione epatica di grasso inferiore al 33%).

Per la determinazione dello spessore del tessuto adiposo periepatico (PATT) la sonda ecografica è stata collocata tra le coste lungo la linea ascellare media ed il raggio us è stato indirizzato attraverso il ramo destro della vena portale. La misura del tessuto ecogeno tra la linea iperecogena della superficie profonda dei muscoli addominale e la superficie epatica rappresentava lo spessore del grasso periepatico ^{118 119 120 121}.

A tutti i soggetti è stato illustrato dettagliatamente il consenso informato, che è stato firmato da ogni paziente prima dell'arruolamento nello studio.

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico dell'azienda ospedaliera Università di Padova, e lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

L'arruolamento dei pazienti è durato un anno circa. Abbiamo studiato i più comuni SNPs del recettore della vitamina D: Fok, Bsm, Apa, Taq e, sulla base dei parametri ematochimici e biometrici valutati, abbiamo calcolato il fatty liver index come parametro biochimico di conferma del reperto ecografico di steatosi epatica.

Il calcolo del Fatty Liver Index è stato eseguito sulla base della formula riportata da Bedogni: $FLI = (e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides})} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745) / (1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides})} + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745) \cdot 100$.

Per gli SNPs del VDR, dal momento che il polimorfismo FOK non è in linkage disequilibrium con gli altri tre, che sono vicini tra loro e distanti da FOK, abbiamo studiato l'inferenza senza Fok.

Gli aplotipi ottenuti sono stati analizzati in maniera scouting per vedere se c'era una relazione con le variabili Vitamina D relate.

Tutta l'analisi successiva si basa sull'assunto che ci possa essere una differenza tra i pazienti con almeno un aplotipo 1 verso gli altri aplotipi. Oppure 2 tipi di trend: a) aver almeno 1 aplotipo 1, almeno un aplotipo 2 ma non 1 e avere almeno un aplotipo 3; b) avere 2 copie di aplo1, una copia ovvero nessuna copia.

Criteri di inclusione:	Criteri di esclusione
<ul style="list-style-type: none"> • soggetti affetti da diabete di tipo 1 diagnosticato entro i 40 anni di età 	<ul style="list-style-type: none"> • problemi psichiatrici non controllati
<ul style="list-style-type: none"> • durata di malattia superiore ad 1 anno 	<ul style="list-style-type: none"> • gravidanza in atto o desiderio di gravidanza nell'arco dello studio
<ul style="list-style-type: none"> • età compresa tra i 18-50 aa 	<ul style="list-style-type: none"> • iperparatiroidismo primitivo o secondario
<ul style="list-style-type: none"> • storia negativa per uso di farmaci che interferiscono con il metabolismo glucidico od il metabolismo osseo 	<ul style="list-style-type: none"> • ipoglicemie asintomatiche
<ul style="list-style-type: none"> • affidabilità nell'esecuzione dell'automonitoraggio domiciliare delle glicemie 	<ul style="list-style-type: none"> • assunzione di: amiodarone; metotrexate, tamoxifene; corticosteroidi
<ul style="list-style-type: none"> • Storia negativa per abuso di alcool <20g/die (<21 drink a settimana per gli uomini e 14 drink a settimana per le donne) 	<ul style="list-style-type: none"> • anemia cronica (Hb<10 g/l)
	<ul style="list-style-type: none"> • storia di epatite

TABELLA 2. CRITERI DI INCLUSIONE/ESCLUSIONE

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego di software statistici (SPSS ed R). Le variabili non distribuite normalmente hanno subito una trasformazione logaritmica (\log_{10}) prima di essere inserite nelle analisi. Tutte le variabili sono state inserite nel testo e nelle tabelle con il valore medio \pm deviazione standard.

Il confronto tra le medie di due gruppi indipendenti è stato eseguito con il test T di Student per le variabili continue e il test del χ^2 per le variabili categoriche. Sono state utilizzate le analisi di regressione multivariata logistica e ordinale per valutare la correlazione esistente tra presenza e grado di NAFLD e le variabili predittive, in accordo con le rispettive assunzioni. Il valore di FLI e la concentrazione di 25(OH)D3 sono stati inseriti nelle analisi come variabili continue.

Per indagare la relazione tra FLI e le variabili cliniche e biochimiche di predizione, è stato costruito un modello di regressione lineare multivariata.

Per tutte le analisi, valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi, con un intervallo di confidenza del 95%.

Risultati

Risultati metabolici

Le caratteristiche antropometriche e bioumorali della coorte di pazienti arruolata sono riassunte nelle *tabelle 3 e 4*.

I valori medi di piastrine, colesterolo totale, HDL, trigliceridi, GOT, GPT, GGT, PTH calcio, fosforo e magnesio erano nel range di normalità.

Nella coorte di pazienti studiata il 16% (45 pazienti) aveva ricevuto una supplementazione con vitamina D (colecalfiferolo) nell'ultimo anno.

Dei pazienti supplementati, 23 avevano livelli di vitamina D a target (>75 nmol/l) (in base a quanto previsto dalle linee guida IOM) mentre i restanti avevano livelli di vitamina D compresi tra insufficienza e carenza.

Dei pazienti supplementati con livelli di vitamina D <75 nmol/l solamente 4 presentavano la NAFLD.

	N° pa- zienti	%
supplementazione con vitamina D (cole- calciferolo) nell'ultimo anno	45	16,98
consumo alcool (consumo quotidiano)	62	23,40
steatosi	69	26,04
ipertensione (PA>140/90 mmHg)	62	23,40
complicanze	106	40,00
nefropatia (pz)	13	4,91
RD (pz)	71	26,79
vasculopatia (pz)	28	10,57
neuropatia (pz)	42	15,85
almeno 1 episodio di chetoacidosi nell'ul- timo anno	22	8,30
almeno 1 episodio di ipoglicemicemia se- vera nell'ultimo anno	8	3,02
sindrome metabolica (ATPIII)	75	28,30

**TABELLA 3. CARATTERISTICHE ANTROPOMETRICHE DELLA
POPOLAZIONE STUDIATA**

	media	± SD
età (anni)	42,36	13,07
HbA1c (%)	7,78	0,83
durata di malattia (anni)	21,09	12,01
BMI (Kg/m ²)	25	4,26
circonferenza vita (cm)	85,88	12,4
fabbisogno insulinico IU/kg/die	0,53	0,18
FLI (fatty liver index)	21,37	21,87
eGFR	97,76	20,39
Plts	254,71	65,13
Chol	176,67	29,55
HDL	66,35	16,49
LDL	95,64	22,82
Trigl	72,96	39,96
GOT	21,50	10,58
GPT	23,95	18,43
GGT	19,38	17,96
VitD	55,72	26,10
Ca	2,35	0,09
Phos	0,93	0,17
Mg	0,79	0,06
PCR	3,85	3,74
PTH	23,93	10,40

TABELLA 4. PARAMETRI EMATOCHIMICI

NAFLD e vitamina D

Nella coorte di pazienti studiata il 45% era carente di vitamina D (vitamina D <50 nmol/l), ed il 31% era insufficiente (vitamina D tra 50-75 nmol/l) (grafico 1).

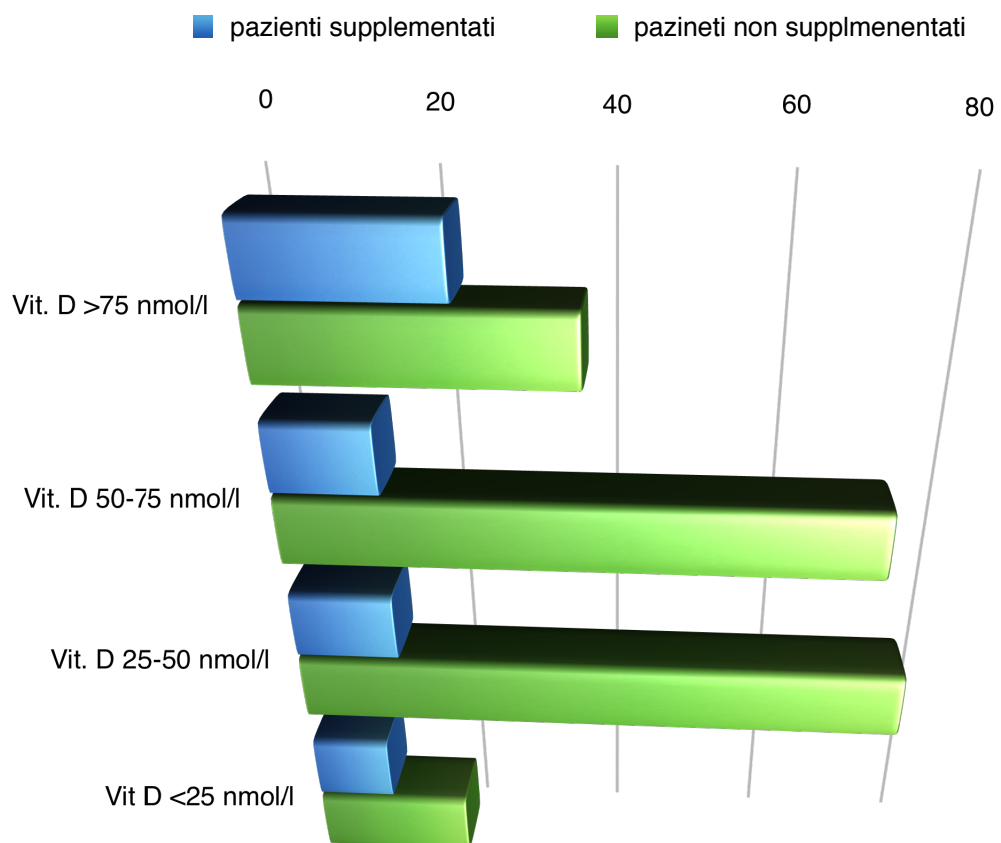


GRAFICO 1. CONCENTRAZIONI DI VITAMINA D NEI GRUPPI SUPPLEMENTATI E NON

La prevalenza di steatosi nel campione esaminato era del 26%; in particolare la steatosi era maggiormente prevalente tra i pa-

zienti i con livelli di vitamina D inferiori a quelli auspicabili (75 nmol/l) rispettivamente nel 27% dei pazienti con carenza vitaminica D e nel 29% dei pazienti con insufficienza vitaminica D (tabella 5).

	NAFLD no (%)	NAFLD si (%)	p value
vitamina D <75 nmol/l	135 (74.59)	46 (25.4)	0.97
pz non supplementati con vitamina D	165 (74.32)	57 (25.68)	0.88
sindrome metabolica	14 (38.89)	22 (61.11)	< 0.0001
nefropatia diabetica p	6 (66.67)	3 (33.33)	0.69
retinopatia diabetica	39 (67.24)	19 (32.76)	0.18
vasculopatia diabetica	13 (68.42)	6 (31.58)	0.58
neuropatia diabetica	21 (65.63)	11 (34.38)	0.42
IMT (>0.9mm)	9 (5.92)	9 (16.36)	0.02

TABELLA 5. CARATTERISTICHE DALLA POPOLAZIONE IN BASE ALLA NAFLD

Non è però emersa alcuna differenza in toto tra i gruppi con e senza steatosi rispetto ai livelli di vitamina D ($p=0.6$) (grafico 2).

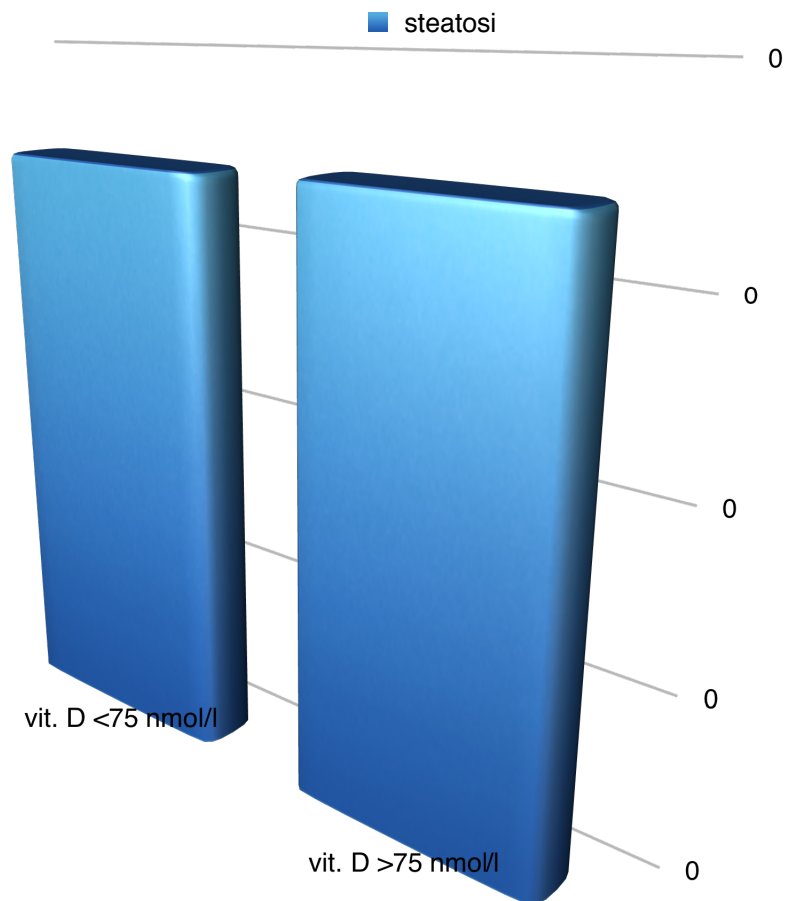


GRAFICO 2. PREVALENZA DELLA STEATOSI NEI GRUPPI IN BASE AI LIVELLI DI VITAMINA D

Anche dopo aver suddiviso i pazienti in sottogruppi rispetto alla supplementazione con vitamina D nell'ultimo anno, non abbiamo notato alcuna differenza tra i gruppi (supplementati e non) con e senza statosi rispetto ai livelli di vitamina D ($p=0.053$) (grafico 3).

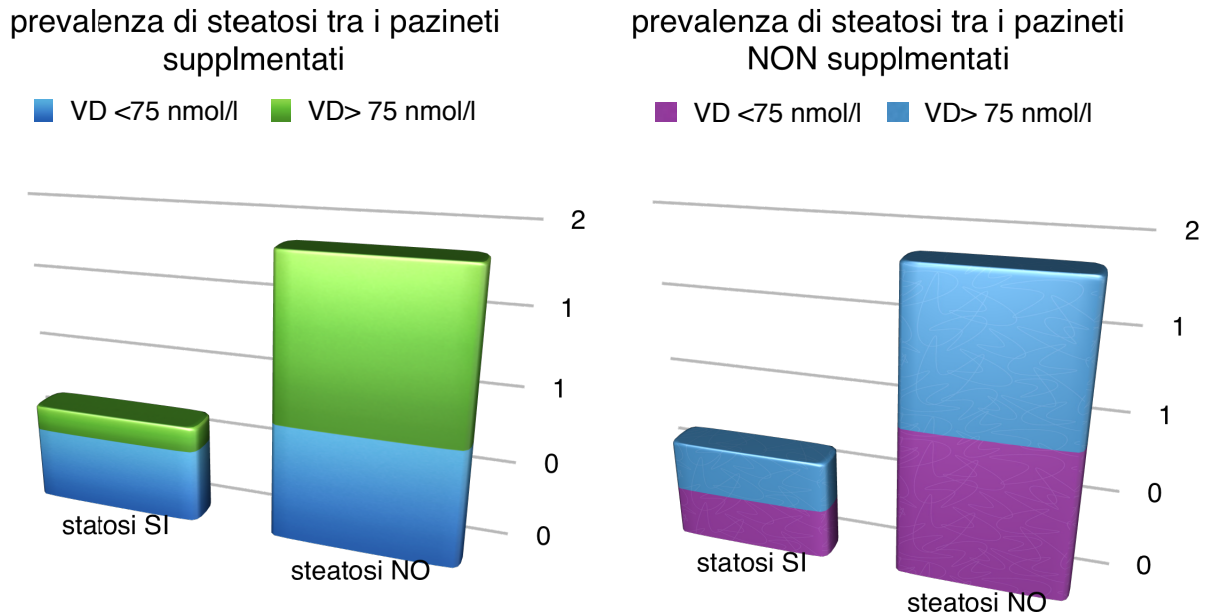


GRAFICO 3. PREVALENZA DELLA NAFLD IN BASE AI LIVELLI DI VITAMINA D NEI SUPPLEMENTARI E NON SUPPLEMENTATI

Nei pazienti che avevano ricevuto la supplementazione con vitamina D nell'ultimo anno le concentrazioni di vitamina D erano statisticamente differenti rispetto ai pazienti che non avevano ricevuto la supplementazione ($p < 0.001$).

In considerazione della esiguità della popolazione supplementata rispetto alla coorte totale di pazienti esaminata, e visto che la supplementazione potrebbe essere un possibile elemento confondente, abbiamo deciso di escludere dalla successive analisi i pazienti che avevano ricevuto la supplementazione con vitamina D nell'ultimo anno.

Sindrome metabolica (SM)

Dal punto di vista metabolico, pazienti con NAFLD presentavano una maggiore prevalenza di sindrome metabolica (definita secondo i criteri ATPIII) rispetto ai pazienti senza NAFLD ($p < 0.0001$) (tabella 6, grafico 4).

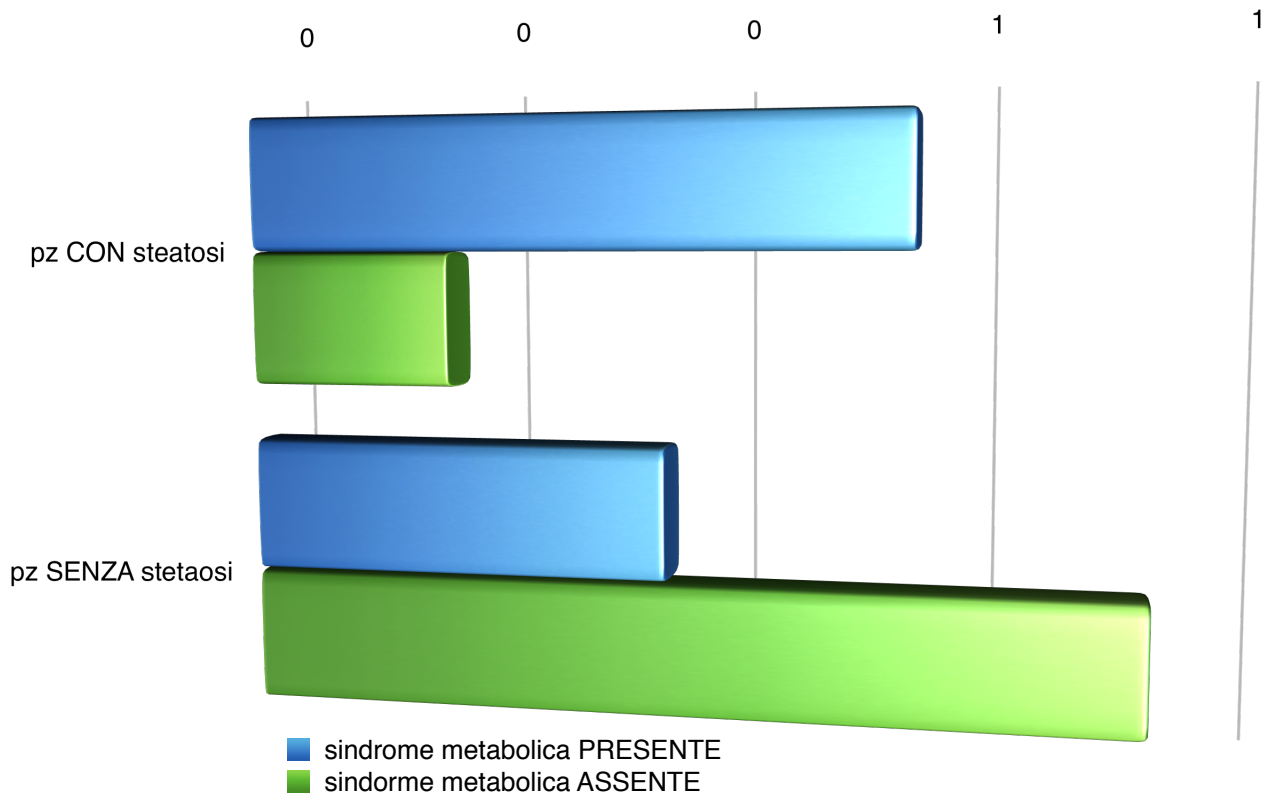


GRAFICO 4. PREVALENZA DI SINDROME METABOLICA IN PAZIENTI CON E SENZA STETAOSI

	sindrome metabolica no n (%)	sindrome metabolica si n (%)	p value
HbA1c >8%	66 (80.49)	16 (19.51)	0.31
nefropatia diabetica presente	5 (55.56)	31 (15.12)	0.04
retinopatia diabetica presente	44 (12.74)	14 (21.14)	0.04
vasculopatia diabetica presente	12 (8.51)	7 (21.88)	0.053
neuropatia diabetica presente	27 (21.95)	5 (15.63)	0.69

TABELLA 6. CARATTERISTICHE DALLA POPOLAZIONE IN BASE ALLA SINDROME METABOLICA

Inoltre i pazienti con sindrome metabolica presentavano un maggior grasso preperitoneale e preperitoneale rispetto ai pazienti senza sindrome metabolica ($p < 0.0001$) (tabella 7).

	Sindrome metabolica presente (36)	Sindrome metabolica assente (187)	p value
	media \pm SD	media \pm SD	
grasso peritoneale (mm)	48.7 \pm 19	37.6 \pm 12.9	<0.0001
grasso preperitoneale (mm)	25.4 \pm 5.5	17.9 \pm 6.5	<0.0001

TABELLA 7. PARAMETRI ECOGRAFICI E SINDROME METABOLICA

Una debole differenza tra i gruppi (con e senza SM) ($p= 0,076$) è stata osservata anche per i livelli di vitamina D (grafico 5).

Rispetto alla presenza di complicanze croniche legate al diabete i pazienti con sindrome metabolica presentavano una maggior prevalenza di nefropatia e retinopatia diabetiche rispetto ai pazienti senza SM ($p=0.004$).

Non è stata osservata alcuna differenza nella prevalenza di sindrome metabolica tra i pazienti in base al compenso metabolico né per la presenza delle altre complicanze croniche legate al diabete.

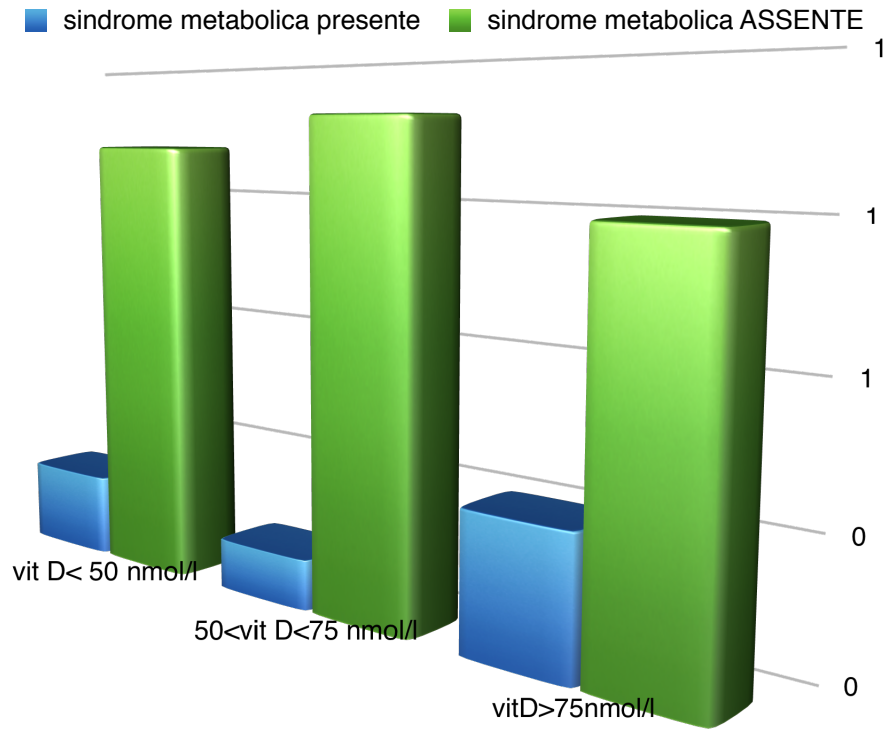


GRAFICO 5. PREVALENZA DI SINDROME METABOLICA IN BASE AI LIVELLI DI VITAMINA D

Complicanze NAFLD e Vitamina D

Nella nostra popolazione di pazienti la NAFLD non rappresenta un fattore predisponente la presenza di retinopatia, vasculopatia e neuropatia diabetiche; bensì i pazienti con NAFLD presentavano maggiore prevalenza di nefropatia diabetica ($p < 0.0001$) e maggiori spessori medio intimali ($p = 0.02$) rispetto ai pazienti senza NAFLD (tabella 8).

Di contro i livelli di vitamina D non sembravano influenzare la presenza di complicanze croniche legate al diabete.

	vitamina D <75nmol/l n° (%)	vitamina D \geq75 nmol/l n° (%)	p value
IMT (>0.9mm)	15 (9)	3 (8)	1
sindrome metabolica	24 (13.19)	10 (25.64)	0.050
nefropatia diabetica	8 (4.6)	1 (2.56)	1
retinopatia diabetica	44 (25)	14 (36.8)	0.13
vasculopatia diabetica	15 (10.87)	4 (11.75)	1
neuropatia diabetica	26 (21.67)	6 (20.69)	0.90

TABELLA 8. CARATTERISTICHE DALLA POPOLAZIONE IN BASE AI LIVELLI DI VITAMINA D

Parametri ecografici

Il grasso peritoneale e preperitoneale ed il fabbisogno insulinico correlavano con il Fatty liver index (FLI) ($p < 0.05$) e con la sindrome metabolica ($p = 0.0001$) (grafico 6).

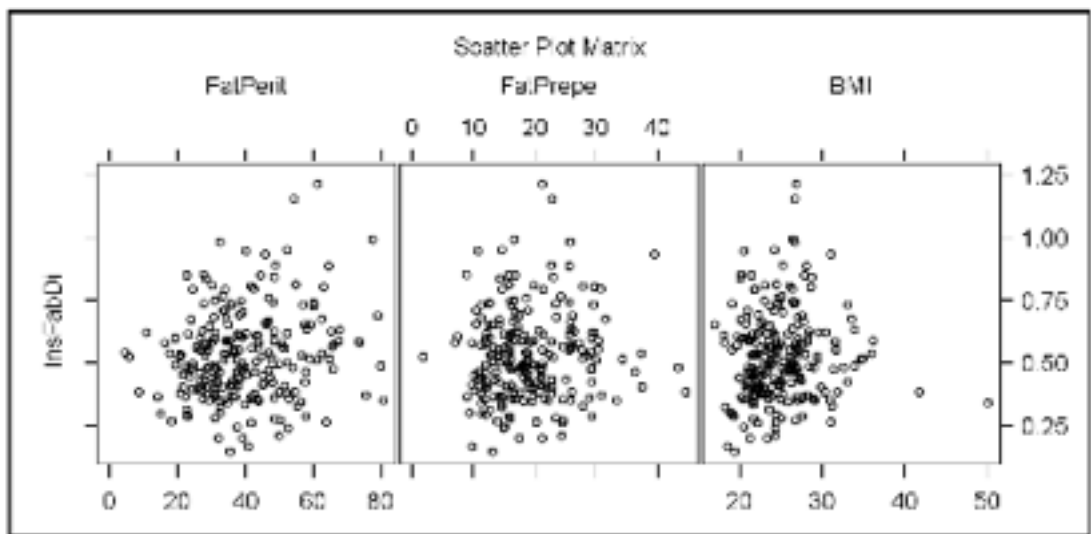


GRAFICO 6. CORRELAZIONE GRASSO PREPERITONEALE, GRASSO PERITONEALE, FABBISOGNO INSULINICO GIORNALIERO CON IL FLI

Rispetto al fabbisogno insulinico solamente il grasso peritoneale ($p = 0,01$) correlava ma non il grasso preperitoneale (grafico 7).

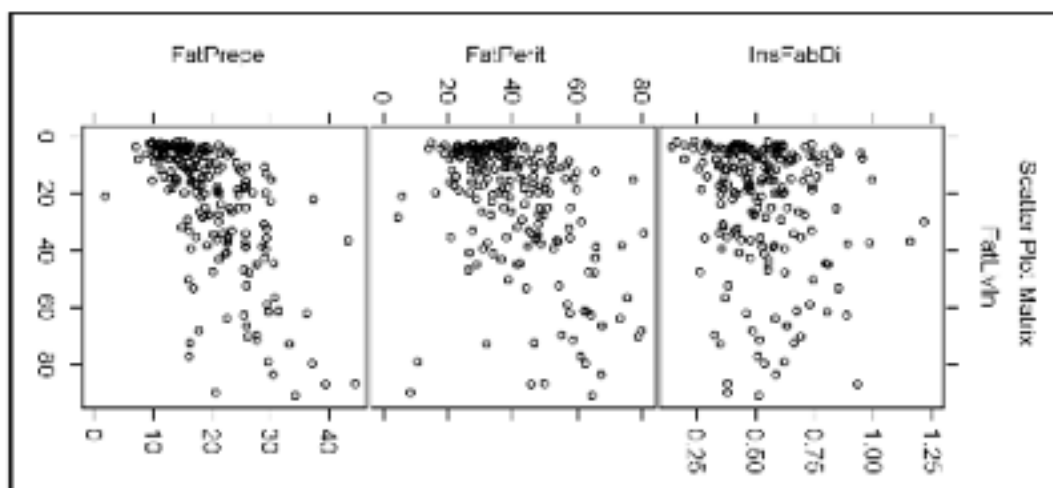


GRAFICO 7. CORRELAZIONE GRASSO PERITONEALE GRASSO PRE-PERITONEALE, BMI E FABBISOGNO INSULINICO GIORNALIERO

Risultati genetici

Dall'analisi della coorte di pazienti esaminata è emerso che 183 pazienti presentavano l'aplotipo 1 ed 85 pazienti gli altri aplotipi (aplotipo 2, aplotipo 3); dei pazienti che presentavano l'aplotipo non 1,

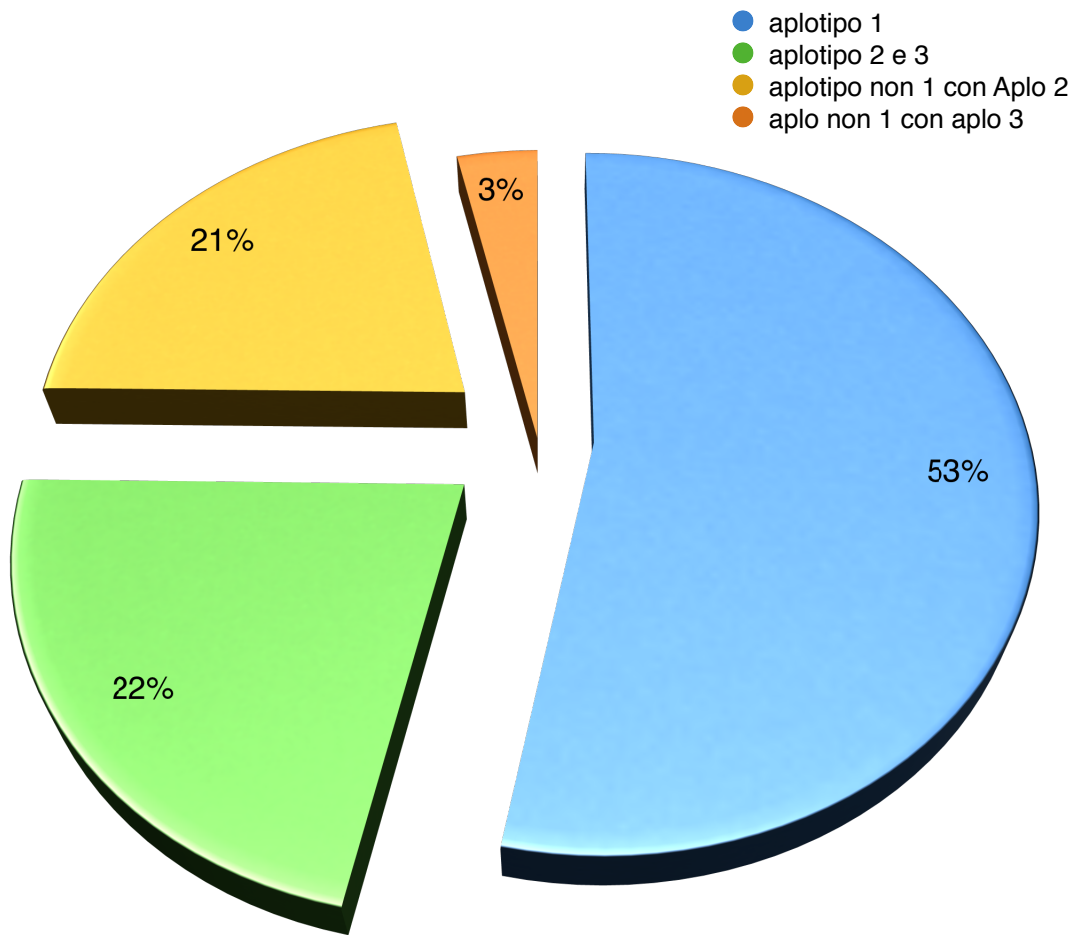


GRAFICO 8. DISTRIBUZIONE DEGLI APLOTIPI DEL VDR NELLA POPOLAZIONE STUDIATA

l'85% (73 pazienti) presentava almeno un aplotipo 2 ed il restante 14% (12 pazienti) presentava almeno un aplotipo 3 (grafico 8). Tra i 2 gruppi (aplo 1 /non 1) non vi era differenza per sesso ($p=0.059$), per età ($p=0.27$), età di malattia ($p=0.43$).

I due gruppi erano diversi per il numero di pazienti con livelli di vitamina D $</>30-50$ nmol/l.

Il dato veniva confermato anche sottraendo i pazienti con supplementazione di vitamin D e dall'analisi per trend b: avere 2 aplotipi 1, 1 o nessun aplotipo 1 (fino a $p=0.0035$ per VitD < 40). Non vi era alcuna differenza per l'esposizione al sole, inetta come esposizione ai raggi solari/ore/die (tabella 9).

	p value
compenso metabolico (HbA1c >7%)	0,042
ipoglicemie severe (numero di episodi ultimo anno)	0,00017
BMI (20-25 KG/M2) (<20 KG/M2)	0,2
presenza di complicanze	0,07
NAFLD	0,5
fatty liver index	0,5
complicanze legate al diabete	0,07
E-GFR	0,4
colesterolo, trigliceridi	>0,05
LDL (>125 MG/DL)	0,009
sindrome metabolica	0,016

TABELLA 9. DIFFERENZE TRA L'APLOTIPO 1 E GLI APLITPI NON 1 NELLE CARATTERISTICHE ANTROPOMETRICHE E BIOCHIMICHE DELLA POPOLAZIONE STUDIATA

Vitamina D/Controllo metabolico

I pazienti con Aplotipo 1 avevano livelli di vitamina D inferiori rispetto ai pazienti con gli aplotipo non 1 ($p=0.003$).

Il compenso metabolico, inteso come media della HbA1c degli ultimi quattro anni, risultava peggiore nei pazienti con l'aplotipo 1 rispetto agli altri aplotipi, e raggiungeva la significatività statistica a partire da valori di glicata superiori a 7.8 % ($p= 0.042$).

Per contro, il gruppo con l'aplotipo non 1, mostrava essere il gruppo che aveva avuto più episodi di ipoglicemie severe nell'anno precedente (8/85 Vs 1/183, $p 0.00017$).

Per ipoglicemia severa si intende un episodio ipoglicemico che ha richiesto intervento di terzi per il trattamento

Il fabbisogno insulinico giornaliero complessivamente non era differente tra gli aplotipi valutati (aplo1= 0.54 vs aplo non 1 0.51) ($X^2 p=0.036$ di 0,75 IU/Kg);

Complicanze

Dall'analisi in trend per diversi aplotipi, è emerso il rischio crescente di sviluppare complicanze passando dall'aplotipo 3 all'aplotipo 1 ($p=0.048$).

NAFLD/sindrome metabolica

La presenza di NAFLD è fortemente in relazione con la sindrome metabolica negli aplotipi non1 ($p=1.9 \times 10^{-5}$) mentre è quasi dissociata negli aplo1 ($p=0.013$).

Parametri ecografici

Per quanto riguarda lo spessore del grasso peritoneale è emerso che la differenza tra l'aplotipo 1 e gli altri è ben evidente per spessori di grasso $< 20-30$ mm (cioè nel 1-2° interquartile): i più magri non hanno l'aplotipo 1 (estremamente evidente per aplotipi 2 contro tutti fino $p=2.6 \times 10^{-10}$). Tale differenza è molto più evidente nelle donne.

Per lo spessore del grasso preperitoneale la differenza tra aplo1 e gli altri è appena evidente per spessori di grasso < 7 mm (cioè nel 1-2° interquartile): i più magri non hanno l'aplotipo 1 (estremamente evidente per aplotipi 2 contro tutti fino $p=1 \times 10^{-4}$). Anche tale reperto è maggiormente evidente quasi esclusivamente nelle donne.

Conclusioni

Nella nostra popolazione di diabetici di tipo 1 la presenza di NAFLD non sembrava essere legata alle concentrazioni di vitamina D.

Quanto emerso, sebbene discordante con la maggior parte dei dati in letteratura a nostra conoscenza, appare confermare i risultati ottenuti in alcuni recenti studi.

Nel primo studio, condotto su una popolazione di pazienti non diabetici non è risultata alcuna correlazione tra i livelli di vitamina D, la resistenza insulina e la steatosi epatica ¹²².

Nel lavoro di Petit ¹²³ del 2015 i risultati ottenuti hanno evidenziato l'assenza di differenze nella prevalenza di steatosi nei pazienti T1DM rispetto ai controlli nonché l'apparente mancanza di correlazione tra la steatosi epatica e l'insorgenza di complicanze croniche legate al diabete. Tale studio è stato condotto su 128 pazienti diabetici di tipo 1 in cui è stata valutata la prevalenza di steatosi epatica, mediante RMN, rispetto ai controlli ed ai pazienti diabetici di tipo 2.

Ed infine, nello studio di Llenardò ¹²⁴ eseguito su 30 pazienti diabetici di tipo 1 obesi, studiati con spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, il diabete di tipo 1 è risultato un elemento protettivo verso la steatosi epatica. La spiegazione di ciò, secondo gli Autori, potrebbe essere riconducibile alla mancanza del gradiente insulinico portale/periferico che quindi diminuirebbe la

stimolazione della lipogenesi epatica da parte dell'insulina proteggendo quindi dalla NAFLD.

Parimenti, anche Perseghin¹²⁵ nel 2005 aveva dimostrato una prevalenza inferiore di steatosi epatica in 19 T1DM rispetto ai controlli non diabetici.

Occorre tuttavia sottolineare che tali studi, benché interessanti nei risultati ottenuti, sono stati condotti su campioni limitati. Inoltre, a nostro sapere, gli studi fino ad ora condotti su NAFLD e vitamina D sono stati eseguiti su popolazioni di pazienti diabetici di tipo 2 o su pazienti non affetti da diabete.

Indipendentemente dalle concentrazioni di vitamina D, la NAFLD, nel nostro studio, si associava ad una maggiore insulinoresistenza, SM ed ad un aumento del grasso peritoneale (indice indiretto di insulinoresistenza) e preperitoneale, nonché ad un maggiore BMI.

Tale risultato confermerebbe, almeno in parte, la definizione, spesso riscontrata in letteratura, della NAFLD come indicatore epatico o conseguenza di sindrome metabolica.

Inoltre, i risultati ottenuti rispetto al fatty liver index confermano quanto già descritto in letteratura sul FLI come indice biochimico di steatosi epatica.

Alla luce di quanto detto la NAFLD potrebbe essere definita un effetto dello scompenso metabolico ed un fattore prognostico negativo per lo sviluppo a lungo termine di complicanze, come già dimostrato in alcuni studi prospettici.

Da quanto riscontrato nello studio degli SNPs del VDR, la NAFLD non è indicatore epatico di sindrome metabolica negli Aplo 1⁺. Tale aplotipo sembrerebbe invece essere un elemento favorente la presenza di complicanze e di sindrome metabolica che, in questi pazienti, si manifesterebbero a prescindere dalla NAFLD (che in questo caso non sarebbe un indicatore epatico di sindrome metabolica) a differenza degli pazienti con aplotipo non 1 in cui, invece esiste una correlazione diretta tra NAFLD e sindrome metabolica.

Ad oggi, a nostro sapere, non sono stati eseguiti ancora degli studi nel diabete di tipo 1 sulla possibile associazione tra complicanze croniche legate al diabete e SNPs del VDR. Al contrario, dati in letteratura dimostrano un' associazione tra gli SNPs del VDR ed un incremento del rischio di coronaropatia nei pazienti diabetici di tipo 2 ¹²⁶.

Tuttavia per confermare i risultati trovati è opportuno sviluppare studi prospettici con gruppi di controllo per valutare la prevalenza e l'effetto degli SNPs del recettore della vitamina D, non solo nei diabetici di tipo 1, ma anche sulla popolazione generale.

Bibliografia

- ¹ Nonalcoholic fatty liver disease. Angulo P. *N Engl J Med*. 2002 Apr 18;346(16):1221-31.
- ² Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. *Hepatology* 2014;59:1174–1197.
- ³ Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. Moore JB. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 211-220
- ⁴ Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Day CP, James OF. *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5.
- ⁵ Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. *Hepatology*. 2007 Nov;46(5):1392-403.
- ⁶ Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. Tilg H, Moschen AR. *Hepatology* 2010; 52: 1836– 46.
- ⁷ Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al.. *Nat Genet* 2008;40:1461–1465.
- ⁸ Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. Anstee QM, Targher G, Day CP. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:330–344.
- ⁹ A population-based study on the prevalence of NASH using scores validated against liver histology. Hyysalo J, Mannisto VT, Zhou Y, Arola J, Karja V, Leivonen M, et al. *J Hepatol* 2013;60:839–846.
- ¹⁰ Circulating triacylglycerol signatures in nonalcoholic fatty liver disease associated with the I148M variant in PNPLA3 and with obesity. Hyysalo J, Gopalacharyulu P, Bian H, Hyotylainen T, Leivonen M, Jaser N, et al. *Diabetes* 2014;63:312–322.
- ¹¹ Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. Byrne CD. *Proc Nutr Soc* 2013;72:412–419.
- ¹² The impact of liver fat vs. visceral fat in determining categories of prediabetes. Kantartzis K, Machann J, Schick F, Fritsche A, Haring HU, Stefan N. *Diabetologia* 2010;53:882–889.

- ¹³ Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. Gao Z, Zhang J, Kheterpal I, Kennedy N, Davis RJ, Ye J. *J Biol Chem* 2011;24:22227–22234.
- ¹⁴ Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. *J Biol Chem* 2004;30:32345–32353.
- ¹⁵ Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. Byrne CD. *Proc Nutr Soc* 2013;72:412–419.
- ¹⁶ The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. Mehal WZ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:637–644.
- ¹⁷ Diacylglycerol activation of protein kinase Cepsilon and hepatic insulin resistance. Jornayvaz FR, Shulman GI. *Cell Metab* 2012;15:574–584.
- ¹⁸ Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. Samuel VT, Shulman GI. *Cell* 2012;148:852–871.
- ¹⁹ Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. Lipina C, Hundal H. *Diabetologia* 2011;1:1596–1607.
- ²⁰ NAFLD: A multisystem disease. C. D. Byrne, G. Targher. *Journal of Hepatology* 2015 vol. 62 J S47–S64
- ²¹ Vitamin D: A new player in non-alcoholic fatty liver disease? M. Eliades, E. Spyrou. *World J Gastroenterol* 2015 February 14; 21(6): 1718-1727
- ²² Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. G. Tagher. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2007) 17, 517e524.
- ²³ The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. Gascon-Barré M, Demers C, Mirshahi A, Néron S, Zalzal S, Nanci A. *Hepatology* 2003; 37: 1034-1042
- ²⁴ A novel bile acid- activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JY. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1151-1164
- ²⁵ Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. *FASEB J* 2003; 17: 509-511

- ²⁶ $1\alpha,25(\text{OH})_2$ - dihydroxyvitamin D₃/VDR protects the skin from UVB-induced tumor formation by interacting with the β -catenin pathway. Jiang YJ, Teichert AE, Fong F, Oda Y, Bikle DD. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 136: 229-232
- ²⁷ Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- ²⁸ The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. Vaidya A, Williams JS, Forman JP. *Obesity* (Silver Spring) 2012; 20: 186-191
- ²⁹ Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Reduced Serum Vitamin D₃ Levels. G. Targher et al. *metabolic syndrome and related disorders* volume 11, number 4, 2013.
- ³⁰ Fatty liver incidence and predictive variables. Tsuneto A, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Ichimaru S, Nakashima E, et al. *Hypertens Res* 2010;33:638–643.
- ³¹ The metabolic syndrome as a predictor of non-alcoholic fatty liver disease. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al. *Ann Intern Med* 2005; 143: 72
- ³² Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. *Hepatology* 2005; 41: 64-71.
- ³³ Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. *Clin Med* 2007; 7: 119-24.
- ³⁴ Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. *Hepatology* 2007; 46: 1387-91
- ³⁵ The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. *Hepatology* 2012; 55: 2005-23
- ³⁶ Non Alcoholic Fatty Liver: Epidemiology and Natural History. M. Masarone et al. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 2014, 9, 126-133.
- ³⁷ Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. Pendino GM, Mariano A, Surace P, et al. Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology* 2005;41:1151-1159.

- ³⁸ Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. *Hepatology* 2005;41:64-71.
- ³⁹ The epidemiology of fatty liver. Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1087-1093.
- ⁴⁰ Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al.. *Hepatology* 2004;40:1387-1395
- ⁴¹ Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC. *Hepatology* 2004;40:1387–1395.
- ⁴² The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. *J Hepatol* 2013;58:593–608.
- ⁴³ Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al.. *Hepatology* 2006;44:865–873.
- ⁴⁴ Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, et al. *Hepatology* 2014.
- ⁴⁵ Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. *Gastroenterology* 2011;141:1249–1253.
- ⁴⁶ Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. Weston SR, Leyden W, Murphy R, et al. *Hepatology* 2005;41:372-379.
- ⁴⁷ Diagnostic and predictive factors of significant liver fibrosis and minimal lesions in patients with persistent unexplained elevated transaminases. A prospective multicenter study. de Ledinghen V, Ratziu V, Causse X, et al. *J Hepatol* 2006;45:592-599
- ⁴⁸ Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity--a 4-year follow-up study. Lee DH, Ha MH, Christiani DC.. *Int J Epidemiol* 2001;30:766-770.
- ⁴⁹ Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Bonora E et al.. *J Hepatol.* 2010 Oct;53(4):713-8.
- ⁵⁰ Nonalcoholic steatohepatitis in children. Rashid, M. & Roberts, E. A. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 30, 48–53

- ⁵¹ Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents. Manton, N. D. *et al. Med. J. Aust.* 2000; 173, 476–479.
- ⁵² Abnormal liver function tests in patients with type 1 diabetes mellitus: prevalence, clinical correlations and underlying pathologies Leeds, J. S. *et al.. Diabet. Med.* 2009; 26, 1235–1241
- ⁵³ Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: “double diabetes” in the Diabetes Control and Complications Trial. Kilpatrick, E. S., Rigby, A. S. & Atkin, S. L. 2007. *Diabetes Care* 30, 707–712
- ⁵⁴ Non - alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and retinopathy in type 1 diabetic patients. Targher G, Bertolini L, Chonchol M, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, Zenari L, Bonora E. *Diabetologia.* 2010 Jul;53(7):1341-8. Epub 2010 Apr 6.
- ⁵⁵ Increased prevalence of cardiovascular disease in Type 1 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease. Targher G, Pichiri I, Zoppini G, Trombetta M, Bonora E. *J Endocrinol Invest.* 2012 May;35(5): 535-40.
- ⁵⁶ Increased prevalence of chronic kidney disease in patients with Type 1 diabetes and non-alcoholic fatty liver. Targher G, Pichiri I, Zoppini G, Trombetta M, Bonora E. *Diabet Med.* 2012 Feb; 29(2):220-6..
- ⁵⁷ Hepatic Steatosis in Type 1 Diabetes. S. E. Regnell and A. Lernmark. 2011 *The Review of DIABETIC STUDIES* 455 Vol . 8 · No. 4 .
- ⁵⁸ ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of hepatic glucose metabolism in normal subjects and subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. Cline GW, Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman GI. *J Clin Invest* 1994. 94(6):2369- 2376.
- ⁵⁹ Effects of short-term improvement of insulin treatment and glycemia on hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes. Bischof MG, Krssak M, Krebs M, Bernroider E, Stingl H, Waldhäusl W, Roden M. *Diabetes* 2001. 50(2):392- 398.
- ⁶⁰ Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. Petersen KF, Laurent D, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. *J Clin Invest* 1998. 101(6):1203-1209. 102.
- ⁶¹ Role of hepatic glycogen breakdown in defective counterregulation of hypoglycemia in intensively treated type 1 diabetes. Kishore P, Gabriely I, Cui MH, Di Vito J, Gajavelli S, Hwang JH, Shamoon H. *Diabetes* 2006. 55(3):659- 666.

- ⁶² Munns CF, McCrossin RB, Thomsett MJ, Batch J. Hepatic glycogenosis: reversible hepatomegaly in type 1 diabetes. *J Paediatr Child Health* 2000. 36(5):449-452.
- ⁶³ Diabetes mellitus-associated glycogen storage hepatomegaly: report of a case and review of the Japanese literature. Nakamuta M, Ohashi M, Goto K, Tanabe Y, Hiroshige K, Nawata H. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1993. 84(7):354-358.
- ⁶⁴ Glycogenic hepatopathy: an underrecognized hepatic complication of diabetes mellitus. Torbenson, M. *et al. Am. J. Surg. Pathol.* 30, 508–513 (2006).
- ⁶⁵ Vitamin D deficiency. Holick MF. *N Engl J Med.* 2007; 357:266-281
- ⁶⁶ Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach to enhance vitamin D nutritional health. Tangpricha V, Koutkia P, Rieke SM, Chen TC, Perez AA, Holick MF. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1478-1483.
- ⁶⁷ The vitamin D content of fortified milk and infant formula. Holick MF, Shao Q, Liu WW, Chen TC. *N Engl J Med.* 1992;326:1178-1181.
- ⁶⁸ Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. *Bone.* 2002;30:771-777.
- ⁶⁹ Vitamin D related disorders. Lips P, Schoor NM, Bravenboer N In: Rosen C (ed) *Primer of metabolic bone diseases.* American Society of Bone and Mineral Research, Washington, (2009 pp 329-334
- ⁷⁰ Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. Holick MF. *J. Clin Invest* 2006;116:2062-2072
- ⁷¹ Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical application. Holick MF (2006) *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* In: Favus MJ (ed). 6th ed, American Society for Bone and Mineral Research, Washington, pp 129-137
- ⁷² Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. *Science.* 1982;216:1001-1003.
- ⁷³ Holick MF, Tian XQ, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3124-3126.

- ⁷⁴Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D₃. *Lancet*. 1982;1:74-76.
- ⁷⁵ Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64:1165-1168.
- ⁷⁶ Vitamin D: role in skin and hair.; Bikle DD. In: Feldman D, ed. *Vitamin D*. Vol 1. 2nd ed. San Diego, Calif: Elsevier Academic Press; 2005:609-630.
- ⁷⁷ Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Holick MF. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6, suppl):1678S-1688S.
- ⁷⁸ Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. *J Am Coll Nutr*. 2003;22:142-14
- ⁷⁹ Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. Li YC. *J Cell Biochem* 2003;88:327-31.
- ⁸⁰ 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. *Circ Res* 2000;87:214-20.
- ⁸¹ Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. *Endocr Rev* 2005;26:662-87.
- ⁸² The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. Marques CD, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte AL. *Rev Bras Reumatol*, 2010; 50:67-80
- ⁸³ Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM (2009). *J Pediatr* 154:132-134
- ⁸⁴ Vitamin D and diabetes. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. *Endocrinol Metab Clin North Am* (2010)39(2):419-446
- ⁸⁵ 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ restores sensitivity to cyclophosphamide-induced apoptosis in non-obese diabetic (NOD) mice and protects against diabetes Casteels K, Waer M, Bouillon R, et al. *Clin Exp Immunol*. 1998; 112:181-187.
- ⁸⁶ Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. Stene LC, Joner G, Norwegian Childhood Diabetes Study Group. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:1128-1134.
- ⁸⁷ Vitamin D and autoimmune diabetes. Zella JB, DeLuca HF. *J Cell Biochem*. 2003;88:216-222.

- ⁸⁸ Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. *Lancet*. 2001; 358:1500-1503.
- ⁸⁹Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of type I diabetes on the offspring Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. [published correction appears in *Diabetologia*. 2000;43;1451]. *Diabetologia*. 2000;43:1093-1098.
- ⁹⁰ Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17: 517-524
- ⁹¹ Improvement of vitamin D status via daily intake of fortified yogurt drink either with or without extra calcium ameliorates systemic inflammatory biomarkers, including adipokines, in the subjects with type 2 diabetes. Neyestani TR, Nikooyeh B, Alavi-Majd H, Shariatzadeh N, Kalayi A, Tayebinejad N, Heravifard S, Salekzamani S, Zahedirad M. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 2005-2011
- ⁹²Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- γ -lyase (CSE) activation and H₂S formation in 3T3L1 adipocytes. Manna P, Jain SK. *J Biol Chem* 2012; 287: 42324-42332
- ⁹³ Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, Reif S. *Gut* 2011; 60: 1728-1737
- ⁹⁴ Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. A R Baker, D P McDonnell, M Hughes, T M Crisp, D J Mangelsdorf, M R Haussler, J W Pike, J Shine, B W O'Malley. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May; 85(10): 3294-3298.
- ⁹⁵ Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. Crofts LA1, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 1;95(18):10529-34.
- ⁹⁶ Where is the vitamin D receptor? Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Jul 1;523(1):123-33
- ⁹⁷ Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. Daniel D. Bikle-*Chem Biol*. Author manuscript.
- ⁹⁸Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms. Pike JW1, Lee SM1, Meyer MB1. *Bonekey Rep*. 2014 Jan 8;3:482. doi: 10.1038/bonekey.2013.216. eCollection 2014.

- ⁹⁹ Molecular mechanisms of vitamin D action. Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Kaneko, I., Haussler, C.A., Hsieh, D., Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., 2013. *Calcif. Tissue Int.* 92, 77–98.
- ¹⁰⁰ A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. Ding, N., Yu, R.T., Subramaniam, N., Sherman, M.H., Wilson, C., Rao, R., Leblanc, M., Coulter, S., He, M., Scott, C., Lau, S.L., Atkins, A.R., Barish, G.D., Gunton, J.E., Liddle, C., Downes, M., Evans, R.M., 2013. *Cell* 153, 601–613.
- ¹⁰¹ Multifunctional enhancers regulate mouse and human vitamin D receptor gene transcription. Zella, L.A., Meyer, M.B., Nerenz, R.D., Lee, S.M., Martowicz, M.L., Pike, J.W., 2010. *Mol. Endocrinol.* 24, 128–147.
- ¹⁰² Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. Murayama, A., Kim, M., Kanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S., 2004. *EMBO J.* 23, 1598–1608.
- ¹⁰³ DNA methylation-related vitamin D receptor insensitivity in breast cancer. Marik, R., Fackler, M., Gabrielson, E., Zeiger, M.A., Sukumar, S., Stearns, V., Umbricht, C.B., 2010. *Cancer Biol. Ther.* 10, 1–10.
- ¹⁰⁴ Multifunctional enhancers regulate mouse and human vitamin D receptor gene transcription. Zella, L.A., Meyer, M.B., Nerenz, R.D., Lee, S.M., Martowicz, M.L., Pike, J.W., 2010. *Mol. Endocrinol.* 24, 128–147.
- ¹⁰⁵ Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. D. Saccone, F. Asani, L. Bornman. *Gene* 561 (2015) 171–180
- ¹⁰⁶ Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. Nejentsev S et al. *Diabetes*. 2004 Oct;53(10):2709-12.
- ¹⁰⁷ Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone turnover, and rates of bone loss in older African-American women. Zmuda JM, Cauley JA, Danielson ME, Wolf RL, Ferrell RE. *J Bone Miner Res.* 1997 Sep;12(9):1446-52.
- ¹⁰⁸ Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, Haussler CA, Galligan MA, Thatcher ML, Encinas Dominguez C, Haussler MR. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 May 25;177(1-2):145-59.
- ¹⁰⁹ Vitamin D receptor genotypes in osteoporosis. Nguyen TV, Kelly PJ, Morrison NA, Sambrook PN, Eisman JA. *Lancet.* 1994 Dec 3;344(8936):1580-1.

- ¹¹⁰ Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis. Zhang J1, Li W, Liu J, Wu W, Ouyang H, Zhang Q, Wang Y, Liu L, Yang R, Liu X, Meng Q, Lu J. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 May 15;355(1):135-42
- ¹¹¹ Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus, B. Györfy, B. Várhelyi, D. Krikovszky et al.. *European Journal of Endocrinology*, vol. 147, no. 6, pp. 803–808, 2002.
- ¹¹² Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. M. Lemos, A. Fagulhab, and E. Coutinhoc, n,” *Human Immunology*, vol. 69, pp. 134–138, 200
- ¹¹³ Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Michael F Holick and Tai C Chen *Am J Clin Nutr* 2008;87(suppl):1080S–6S.
- ¹¹⁴ Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690–3.
- ¹¹⁵ Vitamin D status affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: associations with forearm bone mineral density. Outila TA, Karkkainen MU, Lamberg-Allardt CJ.. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:206-210.
- ¹¹⁶Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. *Osteoporos Int*. 1997;7:439-443.
- ¹¹⁷ High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health . MICHAEL F. HOLICK. *Mayo Clin Proc*. March 2006;81(3):353-373
- ¹¹⁸ The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. *BMC Gastroenterol*. 2006 Nov 2;6:33.
- ¹¹⁹ Sagittal diameter minus subcutaneous thickness. An easy-to-obtain parameter that improves visceral fat prediction. Armellini F, Zamboni M, Harris T, Micciolo R, Bosello O. *Obes Res*. 1997 Jul;5(4):315-20.
- ¹²⁰ Sonographic measurement of the thickness of subcutaneous tissues in nonalcoholic fatty liver disease versus other chronic liver diseases. Riley TR, Bruno MA. *J Clin Ultrasound*. 2005 Dec; 33(9):439-41.
- ¹²¹ Perihepatic adipose tissue thickness: a new non-invasive marker of NAFLD? Lirussi F, Vitturi N, Azzalini L,Orlando S, Orlando R, Plebani M, Realdi G. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2009 Mar; 18(1):61-6.

¹²² Relationship of vitamin D with insulin resistance and disease severity in non-alcoholic steatohepatitis. Bril F, Maximos M, Portillo-Sanchez P, Biernacki D, Lomonaco R, Subbarayan S, Correa M, Lo M, Suman A, Cusi K.. *J Hepatol*. 2015 Feb;62(2):405-11. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.040. Epub 2014 Sep 6.

¹²³ Type 1 diabetes is not associated with an increased prevalence of hepatic steatosis. Petit JM, Pedro L, Guiu B, Duvillard L, Bouillet B, Jooste V, Habchi M, Crevisy E, Fourmont C, Buffier P, Hillon P, Cercueil JP, Verges B. *Diabet Med*. 2015 May 16.

¹²⁴ Liver fat content and hepatic insulin sensitivity in overweight patients with type 1 diabetes. L-lauradó G, Sevastianova K, Sädevirta S, Hakkarainen A, Lundbom N, Orho-Melander M, Groop PH, Forsblom C, Yki-Järvinen H. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Feb;100(2):607-16

¹²⁵ Reduced intrahepatic fat content is associated with increased whole-body lipid oxidation in patients with type 1 diabetes. Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, et al.. *Diabetologia*. 2005;48:2615–2621

¹²⁶ Allelic variations of the vitamin D receptor (VDR) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetics: the DIABHYCAR prospective study. Ferrarezi DA, Bellili-Muñoz N, Dubois-Laforgue D, Cheurfa N, Lamri A, Reis AF, Le Feuvre C, Roussel R, Fumeron F, Timsit J, Marre M, Velho G. *Diabetes Metab*. 2013 May;39(3):263-70