



Rozprawa doktorska

**Wpływ suplementacji witaminą D₃ diety świń na transkryptom i proteom w
wybranych tkankach**

mgr Anna Steg

Praca wykonana pod kierunkiem Promotor
dr hab. Marii Oczkowicz prof. IZ
oraz Promotora pomocniczego
dr Grzegorza Smołuchy

Kraków 2025

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Promotor
dr hab. Marii Oczkowicz prof. IZ za nieocenioną pomoc
na każdym etapie realizacji doktoratu, przekazaną
wiedzę, życzliwość, cierpliwość oraz poświęcony czas.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję również do
Promotora Pomocniczego dr Grzegorza Smołuchy
za cenne rady, motywację oraz nieustające wsparcie.*

*Dziękuję również prof. dr hab. Małgorzacie Świątkiewicz
za pomoc w realizacji badań.*

*Szczere podziękowania kieruję również do
Kierownik Zakładu, Pani prof. Katarzyny Ropki-Molik
oraz Współpracowników z Zakładu Biologii
Molekularnej Zwierząt za okazaną pomoc i przyjazną
atmosferę pracy. Szczególnie dziękuję dr Alicji
Wierzbickiej za cenne wskazówki i wsparcie.*

*Z głębi serca dziękuję moim Najbliższym,
a w szczególności Rodzicom,
za wszystko.*

Badania prezentowane w pracy doktorskiej zrealizowano w ramach projektu finansowanego
przez Narodowe Centrum Nauki:

PRELUDIUM BIS pt.: „Wpływ suplementacji witaminą D₃ diety świń na transkryptom i
proteom w wybranych tkankach”,

numer: 2019/35/O/NZ9/03148,

kierownik projektu: dr hab. Maria Oczkiewicz prof. IZ

Spis treści

Spis prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	6
Wykaz skrótów	7
1 Streszczenie	8
1.1 Wersja polskojęzyczna streszczenia	8
1.2 Wersja anglojęzyczna streszczenia.....	9
2 Wstęp	10
2.1 Metabolizm i mechanizmy działania witaminy D.....	10
2.1.1 Pozagenomowe działanie witaminy D	12
2.2 Rola witaminy D w organizmie.....	12
2.2.1 Wpływ witaminy D na wątrobę	13
2.2.2 Wpływ witaminy D na tkankę mięśniową	14
2.2.3 Wpływ witaminy D na tkankę tłuszczową.....	15
2.3 Suplementacja witaminy D	16
2.3.1 Suplementacja witaminy D u ludzi	17
2.3.2 Suplementacja witaminy D u zwierząt gospodarskich, ze szczególnym uwzględnieniem świń.....	19
2.3.3 Toksyczność witaminy D	20
2.4 Główne założenia eksperymentu i uzasadnienie wyboru metod badawczych	21
2.4.1 Znaczenie technik omicznych w badaniach nad witaminą D	21
2.4.2 Świnia jako zwierzę modelowe w badaniach translacyjnych	22
2.4.3 Założenia pracy doktorskiej	23
3 Cele pracy doktorskiej	25
4 Wykaz i streszczenie prac naukowych	27
5 Metodyka.....	31
5.1 Eksperyment żywieniowy	31
5.2 Oznaczenia poziomu witaminy D, wapnia oraz parametrów biochemicznych i morfologicznych krwi	32
5.3 Izolacja RNA.....	33
5.4 Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS).....	33
5.5 Analiza bioinformatyczna NGS	34

5.6	Analiza funkcjonalna i analiza wzbogacenia zestawów genów (GSEA).....	34
5.7	qPCR	34
5.8	Analizy statystyczne.....	34
5.9	Izolacja białek	35
5.10	Elektroforeza dwuwymiarowa (2D).....	35
5.11	Western blot.....	36
6	Podsumowanie wyników i dyskusja.....	37
6.1	Analiza literaturowa	37
6.2	Dane eksperymentalne	38
6.2.1	Dane biochemiczne i produkcyjne	38
6.2.2	Transkryptom tkanki mięśniowej	40
6.2.3	Transkryptom tkanki tłuszczowej.	42
6.2.4	Transkryptom oraz proteom wątroby	43
7	Wnioski.....	51
8	Ograniczenia pracy oraz przyszłe badania	53
9	Bibliografia	54
10	Oświadczenia współautorów oraz kopie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	63
	Aneks do rozprawy.....	121

Spis prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja 1: A. Steg, M. Oczkowicz, G. Smołucha, Omics as a tool to help determine the effectiveness of supplements, *Nutrients* (2022), 14(24), 5305;

<https://doi.org/10.3390/nu14245305>

Wkład autorski Steg A.: udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, przegląd literatury, przygotowanie oryginalnej wersji tekstu oraz edycja manuskryptu.

Publikacja 2: A. Steg, M. Oczkowicz, M. Świątkiewicz, Effects of high-dose vitamin D₃ supplementation on pig performance, vitamin D content in meat, and muscle transcriptome in pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (2024), 109(2), 560-573;

<https://doi.org/10.1111/jpn.14066>

Wkład autorski Steg A.: udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii, pobraniu materiału badawczego, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analiza statystyczna i zarządzanie otrzymanymi danymi, wizualizacja wyników, przygotowanie oryginalnej wersji tekstu oraz edycja manuskryptu.

Publikacja 3: A. Steg, G. Smołucha, M. Świątkiewicz, M. Oczkowicz, Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (2025),

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2025.106835>

Wkład autorski Steg A.: udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analiza statystyczna i zarządzanie danymi, wizualizacja wyników, przygotowanie oryginalnej wersji tekstu oraz edycja manuskryptu.

Wykaz skrótów

ALT – alaninowa aminotransferaza

BMI – wskaźnik masy ciała (ang. Body Mass Index)

CYP – cytochrom P450 (np. CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1)

DBP – białko wiążące witaminę D (ang. Vitamin D-Binding Protein)

DEG – geny o zróżnicowanej ekspresji (ang. Differentially Expressed Genes)

FAO – β -oksydacja kwasów tłuszczowych (ang. Fatty Acid Oxidation)

FDR – skorygowany poziom istotności (ang. False Discovery Rate)

GSEA – analiza wzbogacenia zestawów genów (ang. Gene Set Enrichment Analysis)

IU – jednostki międzynarodowe (ang. International Units)

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

LC-MS – spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową (ang. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)

MARRS – (ang. membrane-associated rapid response steroid-binding protein).

NAFLD – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. Next Generation Sequencing)

NMR – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. Nuclear Magnetic Resonance)

PTH – parathormon

RCT – randomizowane badania kliniczne (ang. Randomized Controlled Trials)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. Reactive Oxygen Species)

RXR – receptor retinoidowy X (ang. Retinoid X Receptor)

TCA – cykl kwasu cytrynowego (ang. Tricarboxylic Acid Cycle)

VDR – receptor witaminy D (ang. Vitamin D Receptor)

VDRm – błonowy receptor witaminy D (ang. Membrane Vitamin D Receptor)

VDRE – elementy odpowiedzi na witaminę D (ang. Vitamin D Response Elements)

1 Streszczenie

1.1 Wersja polskojęzyczna streszczenia

Witamina D odgrywa kluczową rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz w utrzymaniu homeostazy metabolicznej w wielu tkankach. Coraz więcej dowodów wskazuje na jej pleiotropowe działanie, wykraczające poza układ szkieletowy, obejmujące m.in. układ immunologiczny, nerwowy, mięśniowy czy rozrodczy. W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie stosowaniem wysokich dawek witaminy D, zarówno w kontekście leczenia, jak i profilaktyki, a także w biofortyfikacji produktów pochodzenia zwierzęcego. Jednocześnie brakuje danych dotyczących bezpieczeństwa i molekularnych skutków długotrwałego stosowania wysokich dawek witaminy D u osobników zdrowych, bez wyjściowego niedoboru.

Celem pracy była ocena wpływu długotrwałej suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ (5000 i 10 000 IU/kg paszy) na zdrowe świny w kontekście: parametrów produkcyjnych i biochemicznych, zawartości witaminy D w tkankach, ekspresji genów w wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej, oraz poziomu białek w wątrobie z wykorzystaniem narzędzi omicznych. Suplementacja nie wpłynęła istotnie na przyrosty zwierząt ani pobór paszy, ale skutkowała wzrostem poziomu wapnia w nerkach oraz zmianami w wybranych wskaźnikach biochemicznych (ALT, LDH, glukoza). Zaobserwowano zależny od dawki wzrost zawartości witaminy D w mięśniach i tłuszczu, jednak końcowe stężenia były zbyt niskie, by uznać mięso za znaczące źródło tej witaminy w diecie. Analizy molekularne wykazały wyraźne zmiany w transkryptomie i proteomie wątroby, obejmujące represję szlaku β -oksydacji, zmiany w metabolizmie aminokwasów i lipidów oraz obniżenie poziomu białek antyoksydacyjnych. W mięśniach i tkance tłuszczowej wpływ na transkryptom był niewielki.

Uzyskane wyniki wskazują, że witamina D₃ w wysokich dawkach może wpływać na metabolizm wątroby zdrowych osobników, a jej działanie przy braku niedoboru może prowadzić do subtelnych, niekorzystnych zmian metabolicznych, niezwiązanych z klasycznie opisywaną toksycznością (hiperkalcemią). Praca podkreśla konieczność ostrożnego podejścia do wysokodawkowej suplementacji i potrzebę dalszych badań uwzględniających ocenę funkcjonalną tkanek i analizę markerów stresu oksydacyjnego.

1.2 Wersja anglojęzyczna streszczenia

Vitamin D plays a key role in regulating calcium-phosphate homeostasis and maintaining metabolic balance in various tissues. An increasing body of evidence highlights its pleiotropic effects beyond the skeletal system, including modulation of the immune, nervous, muscular, and reproductive systems. In recent years, there has been growing interest in the use of high doses of vitamin D, both in therapeutic and preventive contexts, as well as in the biofortification of animal-derived food products. However, data on the safety and molecular consequences of long-term high-dose vitamin D supplementation in healthy individuals without baseline deficiency remain limited.

The aim of this study was to evaluate the effects of long-term dietary supplementation with high doses of vitamin D₃ (5000 and 10,000 IU/kg feed) in healthy pigs, focusing on: production and biochemical parameters, vitamin D content in tissues, gene expression in liver, muscle, and adipose tissue, and liver protein levels using omics technologies.

Supplementation did not significantly affect body weight gain of animals or feed intake but led to an increase in kidney calcium levels and changes in selected biochemical markers (ALT, LDH, glucose). A dose-dependent increase in vitamin D content was observed in muscle and fat; however, the final concentrations were too low to consider the meat a meaningful dietary source of vitamin D. Molecular analyses revealed pronounced changes in the hepatic transcriptome and proteome, including repression of the β -oxidation pathway, alterations in amino acid and lipid metabolism, and reduced levels of antioxidant proteins. In contrast, the response in muscle and adipose tissue was minimal.

These findings suggest that high doses of vitamin D₃ can affect hepatic metabolism in healthy individuals and that, in the absence of deficiency, high-dose supplementation may induce subtle adverse metabolic changes not associated with classical toxicity manifestations such as hypercalcemia. This study underscores the need for cautious use of high-dose supplementation and highlights the importance of further research, including functional tissue assessment and oxidative stress marker analysis.

2 Wstęp

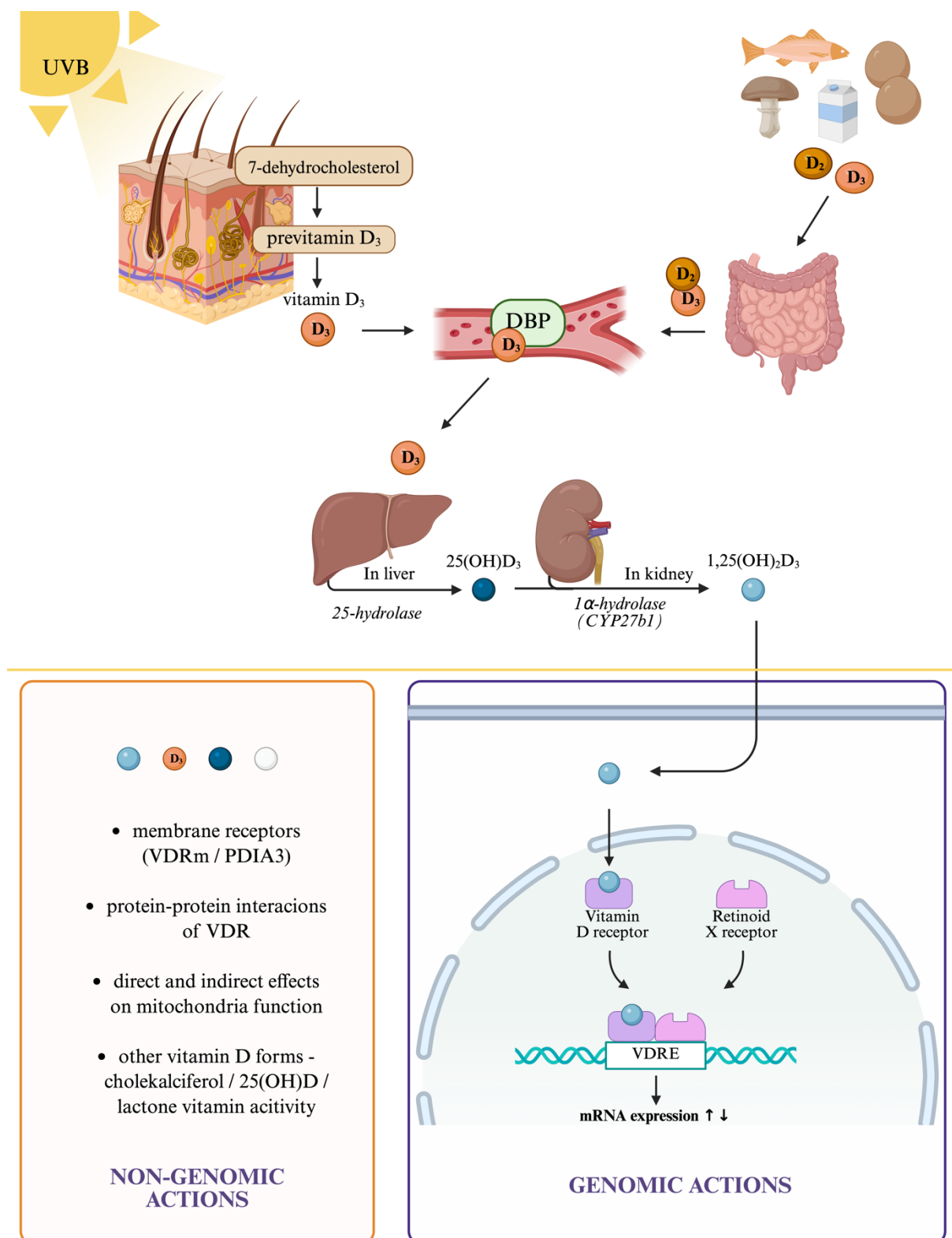
Witamina D jest jednym z najczęściej rekomendowanych i stosowanych suplementów diety (*Office of Dietary Supplements - Vitamin D*, n.d.; Pludowski et al., 2022). Głównymi powodami są powszechne niedobory tego związku oraz liczne informacje o jej potencjalnym dobroczynnym wpływie prewencyjnym, a nawet leczniczym w stosunku do wielu schorzeń, w tym chorób cywilizacyjnych.

2.1 Metabolizm i mechanizmy działania witaminy D

Witamina D to grupa rozpuszczalnych w tłuszczach prohormonów, z których biologicznie najważniejsze formy to witamina D₂ (ergokalcyferol) oraz D₃ (cholekalcyferol). Głównym źródłem witaminy D w organizmach ssaków jest jej synteza skórna indukowana promieniowaniem ultrafioletowym typu B (UVB, 290-315 nm). W keratynocytach naskórka znajduje się 7-dehydrocholesterol – pochodna cholesterolu – który ulega fotokonwersji do prewitaminy D₃, a następnie izomeryzuje pod wpływem ciepła ciała do cholekalcyferolu (witamina D₃).

Powstała witamina D₃ trafia do krwioobiegu, gdzie w większości wiąże się z białkiem transportującym witaminę D (DBP, ang. vitamin D-binding protein). Następnie transportowana jest do wątroby, gdzie zachodzi pierwszy etap aktywacji: hydroksylacja przez enzymy CYP2R1 i CYP27A1 prowadzi do powstania 25-hydroksywitaminy D₃ [25(OH)D₃], zwanej kalcydiolem – głównej formy magazynowej witaminy D w organizmie. Kolejna hydroksylacja, przeprowadzana w nerkach przez enzym CYP27B1, prowadzi do powstania aktywnej hormonalnie postaci witaminy D – 1,25-dihydroksywitaminy D₃ [1,25(OH)₂D₃], znanej jako kalcytriol (Holick, 2011).

Kalcytriol działa jak hormon steroidowy – po wnikięciu do komórki wiąże się z receptorem witaminy D (VDR, ang. vitamin D receptor). Kompleks kalcytriol–VDR tworzy heterodimer z receptorem retinoidowym (RXR, ang. retinoid X receptor), który ulega translokacji do jądra komórkowego i wiąże się z tzw. elementami odpowiedzi na witaminę D (VDRE, ang. vitamin D response elements) w promotorowych regionach genów docelowych, modulując ich transkrypcję (Haussler et al., 2011). Szacuje się, że VDR reguluje ekspresję nawet do 5 % ssaczego genomu (Pasing et al., 2017). Choć klasycznie VDR uznawany jest za receptor jądrowy, jego obecność stwierdzono również w cytoplazmie oraz w błonie komórkowej, co sugeruje możliwość działania także poprzez mechanizmy pozajądrowe (Capiati et al., 2002; Dursun & Gezen-Ak, 2017).



Rys. 1. Główna ścieżka biologicznej aktywacji i działania endogennej oraz egzogennej witaminy D wraz z podziałem na klasyczne (genomowe) oraz pozagenomowe działanie witaminy D.

2.1.1 Pozagenomowe działanie witaminy D

Coraz więcej badań potwierdza, że aktywność biologiczna witaminy D nie ogranicza się wyłącznie do klasycznego, genomowego działania kalcytriolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) za pośrednictwem jądrowego receptora VDR. Obserwowane efekty fizjologiczne niejednokrotnie zachodzą zbyt szybko, aby mogły wynikać z regulacji transkrypcji genów, co sugeruje istnienie tzw. mechanizmów niegenomicznych, czyli pozagenomowych. Cechują się one błyskawiczną odpowiedzią komórkową, występującą w ciągu sekund do minut po stymulacji witaminą D, i nie wymagają bezpośredniego udziału aparatu transkrypcyjnego.

Mechanizmy te mogą być inicjowane przez receptory zlokalizowane w błonie komórkowej, takie jak błonowy wariant receptora VDR (VDRm) oraz białko PDIA3 (znane również jako MARRS - membrane-associated rapid response steroid-binding protein). Receptory te pośredniczą w regulacji szybkiego napływu wapnia i fosforanów do komórek, szczególnie nabłonka jelitowego, a także uczestniczą w aktywacji licznych szlaków sygnałowych (Haussler et al., 2011; Zmijewski & Carlberg, 2020).

Poza tym, receptor VDR może uczestniczyć w bezpośrednich interakcjach białko-białko, niezależnych od wiązania do DNA. Udokumentowano m.in. jego oddziaływanie z $\text{IKK}\beta$ (szlak $\text{NF-}\kappa\text{B}$), Stat1, RunX1, c-Jun czy β -kateniną (Hii & Ferrante, 2016; Żmijewski, 2022).

Również inne formy witaminy D – takie jak cholekalcyferol i $25(\text{OH})\text{D}$ – mogą wykazywać aktywność biologiczną niezależnie od klasycznego mechanizmu z udziałem receptora VDR. Ponadto w organizmach ssaków wykryto alternatywne metabolity, w tym formy laktonowe powstające z udziałem CYP24A1, które prawdopodobnie oddziałują poprzez odrębne, słabo poznane szlaki sygnałowe (Iijima et al., 2024). Złożoność tych mechanizmów podkreśla pleiotropowy charakter witaminy D i wskazuje na potrzebę dalszych badań z wykorzystaniem nowoczesnych technik, pozwalających na pełniejsze zrozumienie jej działania biologicznego.

2.2 Rola witaminy D w organizmie

Choć główną, dobrze udokumentowaną funkcją witaminy D jest utrzymanie homeostazy wapniowo-fosforanowej oraz zapewnienie prawidłowego funkcjonowania układu kostnego, jej biologiczne działanie znacznie wykracza poza te aspekty. Obecność receptora VDR potwierdzono w subpopulacjach komórek wielu tkanek i narządów, w tym układu odpornościowego, pokarmowego, sercowo-naczyniowego, rozrodczego oraz wydzielniczego,

co wskazuje na szeroki zakres potencjalnego działania witaminy D na fizjologię organizmu (Y. Wang et al., 2012).

Coraz więcej badań – zarówno *in vitro*, jak i obserwacyjnych – wskazuje, że suplementacja witaminy D może korzystnie modulować funkcjonowanie wymienionych układów, a także wspomagać terapię wielu chorób przewlekłych, takich jak cukrzyca typu 2, nadciśnienie, choroby autoimmunologiczne, depresja czy niektóre typy nowotworów. Jednocześnie jednak wyniki metaanaliz pozostają niespójne – część z nich wskazuje na istotne korzyści zdrowotne, inne zaś nie potwierdzają efektów istotnych klinicznie. Możliwymi przyczynami niespójnych rezultatów są niejasne wytyczne dotyczące suplementacji, różne dawki, formy, czasy trwania. Ponadto należy zwrócić uwagę, że niedobory witaminy D często występują w przebiegu wielu chorób przewlekłych, takich jak otyłość czy cukrzyca typu 2, a także w przypadku różnych nowotworów (Turer et al., 2013; H. Wang et al., 2017). Dodatkowo, po wystąpieniu ostrej infekcji poziom witaminy D we krwi gwałtownie spada, co może wydłużać czas powrotu do zdrowia i zwiększać ryzyko powikłań (Grant et al., 2025). Jednak trudno jednoznacznie określić, czy obniżony poziom witaminy pełni rolę czynnika etiologicznego, stanowi jedynie czynnik ryzyka, czy też jest wtórnym efektem przebiegu choroby.

Choć suplementacja witaminy D często wiąże się z obserwowalnymi efektami fenotypowymi i poprawą parametrów fizjologicznych, wciąż brak szczegółowej charakterystyki jej molekularnych mechanizmów działania. Co więcej, większość danych *in vivo* dotyczących ekspresji genów pochodzi z analiz komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (Pasing et al., 2017), a wiedza o wpływie suplementacji na poszczególne tkanki i narządy pozostaje ograniczona. Dodatkowo, większość badań ocenia działanie witaminy D w kontekście leczenia lub łagodzenia już istniejących schorzeń, co wskazuje na potrzebę prowadzenia badań pozwalających ocenić wpływ suplementacji witaminy D na osoby zdrowe.

2.2.1 Wpływ witaminy D na wątrobę

Wątroba odgrywa kluczową rolę w metabolizmie witaminy D, ponieważ to właśnie w tym narządzie zachodzi pierwszy etap jej aktywacji – hydroksylacja cholekalcyferolu do 25- hydroksywitaminy D, będącej główną formą krążącą we krwi i uznawanym markerem statusu witaminy D w organizmie. Coraz więcej dowodów wskazuje jednak, że witamina D może odgrywać istotną funkcję nie tylko jako substrat metaboliczny w wątrobie, ale także jako aktywny regulator jej procesów fizjologicznych i metabolicznych. Ponadto, niedobór witaminy

D występuje u ponad 90 % pacjentów z przewlekłą niewydolnością wątroby (Grant et al., 2025; Holick, 2007; Pludowski et al., 2022).

Choć ekspresja receptora witaminy D w dojrzałych hepatocytach jest stosunkowo niska, jego obecność potwierdzono także w komórkach nieparenchymalnych wątroby – takich jak komórki Kupffera, komórki gwiaździste i śródbłonkowe (Gascon-Barré et al., 2003; Li et al., 2021). Dodatkowo, polimorfizmy genu *VDR* wiązano z nasileniem niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD), a poziom ekspresji *VDR* korelował z zaawansowaniem przewlekłych chorób wątroby (Tourkochristou et al., 2023, 2023).

Zależność między niedoborem witaminy D a ryzykiem chorób wątroby – takich jak NAFLD, alkoholowa choroba wątroby czy wirusowe zapalenie wątroby – podkreśla jej potencjalne znaczenie terapeutyczne. W badaniach *in vitro* wykazano działanie przeciwzapalne i przeciwzwłóknieniowe witaminy D, obejmujące m.in. hamowanie szlaku NF-κB i syntezy kolagenu (Artaza & Norris, 2009; Barchetta et al., 2017; Potter et al., 2013). Suplementacja *in vivo* prowadziła do redukcji stłuszczenia wątroby, poprawy wrażliwości na insulinę i spadku poziomu cytokin prozapalnych (Du et al., 2023; Yin et al., 2012). Kliniczne badania wskazują, że niskie stężenia 25(OH)D korelują z cięższym przebiegiem chorób wątroby, a suplementacja może przynosić korzyści, takie jak poprawa wskaźnika Childa-Pugha, zwiększona odpowiedź wirusologiczna w WZW typu C, czy modulacja mikrobioty jelitowej w NAFLD (Bitetto et al., 2011; Savić et al., 2018; T. Zhang et al., 2023).

Niemniej jednak, należy podkreślić, że wyniki wielu metaanaliz są często niespójne, m.in. z powodu różnic w zaawansowaniu choroby, początkowym statusie witaminy D oraz stosowanych dawkach i formach suplementacji (Guo et al., 2020; Hariri & Zohdi, 2019; Tabrizi et al., 2017). Pomimo rosnącego zainteresowania witaminą D jako regulatorem szlaków metabolicznych i zapalnych w wątrobie, nadal brakuje kompleksowych analiz molekularnych, szczególnie dotyczących wpływu wysokich dawek suplementacji w warunkach braku niedoboru.

2.2.2 Wpływ witaminy D na tkankę mięśniową

Witaminy, w tym witamina D, odgrywają coraz istotniejszą rolę w dietetyce sportowej, a ich potencjalny wpływ na funkcjonowanie tkanki mięśniowej wzbudza rosnące zainteresowanie. Obecność receptorów witaminy D w ludzkiej tkance mięśni szkieletowych sugeruje, że jej aktywna forma może bezpośrednio oddziaływać na funkcje mięśni (Montenegro et al., 2019). Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że wysokie (suprafizjologiczne) dawki witaminy

D₃ mogą wywoływać efekt ergogeniczny, prowadząc do szeregu korzystnych zmian fizjologicznych, takich jak poprawa wydolności tlenowej, zwiększenie masy i siły mięśni, poprawa produkcji mocy oraz skrócenie czasu regeneracji po wysiłku (Dahlquist et al., 2015; Yoon et al., 2021). Potencjalne działanie witaminy D w obrębie mięśni szkieletowych jest również badane w kontekście profilaktyki upadków oraz zapobiegania sarkopenii u osób starszych. Na podstawie dostępnych badań można stwierdzić, że w przypadku zwierząt gospodarskich suplementacja paszy witaminą D może pozytywnie wpływać na niektóre właściwości tkanki mięśniowej, a tym samym na jakość głównych produktów pochodzenia zwierzęcego (Duffy et al., 2017).

Wyniki dotychczasowych badań są jednak niejednoznaczne i niespójne, a wpływ witaminy D na tkankę mięśniową nie został dotąd dobrze poznany na poziomie molekularnym (Autier et al., 2017; Beaudart et al., 2014; Hassan-Smith et al., 2017). Konieczne są dalsze, pogłębione badania w celu dokładnego zrozumienia mechanizmów działania witaminy D w układzie szkieletowym.

2.2.3 Wpływ witaminy D na tkankę tłuszczową

Dane literaturowe wskazują także na istotny wpływ witaminy D na tkankę tłuszczową, która stanowi jej główny rezerwuuar w organizmie – może magazynować nawet do 65 % jej zasobów (Schmid & Walther, 2013; Szymczak-Pajor et al., 2022). W adipocytach obecne są enzymy zaangażowane w metabolizm witaminy D (CYP27B1, CYP24A1) oraz receptor VDR, co umożliwia jej lokalną aktywację i działanie parakryne (Park & Han, 2021; Szymczak-Pajor et al., 2022). Wykazano, że witamina D może wpływać na proces adipogenezy – w zależności od modelu komórkowego, promując go lub hamując – a także indukować apoptozę dojrzałych komórek tłuszczowych, ograniczając tym samym nadmierne magazynowanie lipidów (Mutt et al., 2014; Nimitphong et al., 2020). Witamina D reguluje ekspresję genów związanych z lipolizą, β -oksydacją i termogenezą, wspierając proces brązowienia białej tkanki tłuszczowej i zwiększając wydatek energetyczny (Lee, 2025; Park & Han, 2021). Jednocześnie wykazuje działanie przeciwzapalne – obniża poziom cytokin prozapalnych (m.in. TNF- α , IL-6) oraz zwiększa produkcję adiponektyny (Szymczak-Pajor et al., 2022). Należy jednak podkreślić, że większość tych danych pochodzi z badań *in vitro*, co ogranicza możliwość ich bezpośredniego odniesienia do warunków fizjologicznych i wymaga dalszej weryfikacji w badaniach *in vivo* oraz klinicznych.

Otyłość, która wiąże się z szeregiem powikłań metabolicznych, często współistnieje z niedoborem witaminy D. Badania populacyjne wskazują, że wraz ze wzrostem BMI rośnie ryzyko niedoboru tej witaminy, a skuteczność jej suplementacji spada (Daniel et al., 2015). Zjawisko to może wynikać ze zmniejszonej ekspresji *VDR* oraz obniżonej aktywności enzymów hydroksylujących witaminę D w przerośniętych adipocytach, co może prowadzić do jej ograniczonej biodostępności i nasilenia insulinooporności. Chociaż liczne badania sugerują, że suplementacja witaminy D może wspierać funkcję tkanki tłuszczowej i przeciwdziałać jej dysfunkcjom, wyniki dotychczasowych analiz pozostają niespójne. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy działania witaminy D w kontekście otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych (Hengist et al., 2019; Lee, 2025).

2.3 Suplementacja witaminy D

Głównym źródłem witaminy D₃ jest jej synteza skórna. Jednak ze względu na ograniczony dostęp do światła słonecznego w niektórych szerokościach geograficznych – zwłaszcza w okresie jesienno-zimowym – a także współczesny styl życia, charakteryzujący się ograniczoną ekspozycją na promieniowanie UVB, niedobory witaminy D są powszechnym problemem. Dotyczy to również zwierząt hodowlanych, które w systemach intensywnej produkcji przebywają w zamkniętych pomieszczeniach, bez dostępu do światła słonecznego. Efektywność skórnej syntezy witaminy D może być ograniczona przez czynniki osobnicze, takie jak pigmentacja skóry, wiek czy obecność niektórych wariantów genetycznych (Bhattarai et al., 2020). Szacuje się, że globalna częstość niedoboru witaminy D w latach 2000-2022 wynosiła około 45 %, przy czym wartości te wykazują istotne zróżnicowanie geograficzne (Cui et al., 2023).

U ludzi niedobór witaminy D prowadzi do zaburzeń mineralizacji kości, takich jak krzywica u dzieci i osteomalacja u dorosłych. Może także zwiększać ryzyko osteoporozy, osłabienia mięśni, zaburzeń odporności, chorób autoimmunologicznych, cukrzycy typu 2 oraz infekcji (De Martinis et al., 2021). U zwierząt gospodarskich (w tym świń) niedobór skutkuje zaburzeniami wzrostu, krzywicą, osteomalacją oraz osłabieniem układu immunologicznego (Babazadeh et al., 2022).

Witamina D może być również dostarczana z dietą – głównie poprzez produkty pochodzenia zwierzęcego, takie jak tłuste ryby, tran, żółtka jaj, a w mniejszym stopniu grzyby. W żywności pochodzenia zwierzęcego występuje głównie witamina D₃ (cholekalcyferol), natomiast

w produktach roślinnych obecna jest witamina D₂ (ergokalcyferol). Obie formy, po spożyciu, ulegają w organizmie dwóm etapom hydroksylacji, prowadzącym do powstania aktywnej biologicznie postaci – kalcytriolu. W praktyce jednak trudno osiągnąć optymalne stężenie witaminy D wyłącznie poprzez dietę, dlatego powszechnie zaleca się jej suplementację – zarówno u ludzi, jak i w żywieniu zwierząt gospodarskich.

2.3.1 Suplementacja witaminy D u ludzi

W ostatnich dwóch dekadach obserwuje się gwałtowny wzrost zainteresowania suplementami diety – zarówno wśród konsumentów, jak i środowisk naukowych. Obecna wartość globalnego rynku suplementów szacowana jest na ok. 179 miliardów dolarów (dane na 2024 rok, MarketsandMarketsTM (*Dietary Supplements Market*, n.d.)). Mimo tej popularności, sektor ten wciąż należy do najmniej uregulowanych i najslabiej przebadanych spośród produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi. Różnice w przepisach i wytycznych pomiędzy krajami powodują, że dostępnych jest wiele preparatów o niepotwierdzonej skuteczności i niezwyfikowanym składzie.

Niejasności dotyczące suplementacji witaminy D obejmują również ustalenie optymalnej dawki. Obecnie większość zaleceń koncentruje się na wpływie witaminy D na układ kostny, podczas gdy coraz więcej badań wskazuje na jej szersze działanie. Czynniki takie jak wiek, masa ciała, styl życia, polimorfizmy genetyczne, obecność chorób przewlekłych oraz stosowane leki wpływają na efektywność suplementacji. Przykładowo, u osób starszych obserwuje się spowolniony metabolizm, ograniczoną syntezę skórną, zmniejszone wchłanianie witamin w przewodzie pokarmowym oraz obniżoną ekspresję receptorów VDR (Bischoff-Ferrari et al., 2004). Kobiety wykazują statystycznie niższe stężenia witaminy D, a zapotrzebowanie zmienia się w zależności od etapu życia (ciąża, menopauza). Dodatkowo, niektóre badania sugerują, że odpowiedź organizmu na suplementację zależy od poziomu parathormonu (PTH) lub dostępności chromatyny w obrębie specyficznych loci, a także od wariantów genetycznych (Carlberg, 2022; Seuter et al., 2017; Zumaraga et al., 2017).

Za optymalne uznaje się stężenie 25(OH)D przekraczające 30 ng/mL, a jego ocena w surowicy pozostaje złotym standardem diagnostycznym. Stężenie poniżej 20 ng/mL uznawane jest za niedobór, natomiast wartości powyżej 100 ng/mL mogą wskazywać na toksyczność, szczególnie w przypadku długotrwałego stosowania wysokich dawek.

Najczęściej stosowaną formą suplementacji jest cholekalcyferol (D₃), jednak zalecane dzienne dawki różnią się między krajami, przykładowo EFSA rekomenduje 600 IU dziennie dla

dorosłych i górny limit 4000 IU, zaś SACN w Wielkiej Brytanii stałą dawkę 400 IU, (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2016; *SACN Vitamin D and Health Report*, 2023).

Warto jednak zaznaczyć, że większość rekomendacji opiera się na badaniach RCT, które często obejmują osoby bez niedoboru i stosują zbyt niskie dawki w grupach interwencyjnych. Badania obserwacyjne wskazują na szersze korzyści suplementacji, ale również mają ograniczenia. Obecne wytyczne, skoncentrowane na utrzymaniu zdrowia układu szkieletowego, pomijają potencjalne działanie witaminy D na inne układy.

W praktyce, popularne suplementy zawierają 2000 IU (50 µg) witaminy D₃ w jednej porcji. Coraz częściej jednak sugeruje się, że wyższe dawki mogą wspierać odporność i profilaktykę chorób przewlekłych. Holick, powołując się na wyniki 20 badań, wskazuje na zależność między wyższym stężeniem 25(OH)D w surowicy a zmniejszonym ryzykiem wielu problemów zdrowotnych: poziom powyżej 60 ng/ml wiązał się z niższym ryzykiem stanu przedrzucawkowego; stężenia powyżej 50 ng/ml – z mniejszym ryzykiem przejścia stanu przedcukrzycowego w cukrzycę typu 2 oraz zachorowalności na raka piersi; poziom powyżej 40 ng/ml – z redukcją ryzyka chorób autoimmunologicznych, porodów przez cesarskie cięcie, próchnicy zębów mlecznych u niemowląt, nawrotów i zgonów z powodu nowotworów układu pokarmowego, stwardnienia rozsianego oraz wcześniactwa. Z kolei poziom powyżej 30 ng/ml – ze spadkiem śmiertelności z powodu nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych i COVID-19, a także z mniejszym ryzykiem raka jelita grubego, zespołu ostrej niewydolności oddechowej, osteomalacji i infekcji górnych dróg oddechowych (Holick, 2024).

W badaniu klinicznym przeprowadzonym przez grupę Shirvani zdrowym dorosłym podawano przez sześć miesięcy witaminę D₃ w dawkach 600, 4000 oraz 10 000 IU dziennie (Shirvani et al., 2019). Liczba genów, których ekspresja uległa zmianie w leukocytach, wynosiła odpowiednio 162, 320 i 1289, co potwierdza, że wyższe dawki mogą prowadzić do bardziej złożonych i potencjalnie korzystnych efektów molekularnych.

Przykładowo, wysokie dawki witaminy D₃ znajdują zastosowanie w leczeniu chorób autoimmunologicznych, jak pokazuje tzw. protokół Coimbrzy, oparty na podawaniu dawek przekraczających 35 000 IU dziennie. Wykazano, że takie dawki mają działanie immunomodulujące: tłumią odpowiedzi limfocytów Th1 i Th17, jednocześnie wzmacniając aktywność komórek Treg i tym samym ograniczając przewlekły stan zapalny (Amon et al., 2022).

Aby osiągnąć terapeutyczne stężenie 25(OH)D w surowicy (~50 ng/mL, czyli 125 nmol/L), konieczne jest stosowanie co najmniej 4000 IU witaminy D₃ dziennie. Należy jednak

podkreślić, że odpowiedź organizmu na suplementację może być bardzo zróżnicowana i zależy od wielu czynników indywidualnych, takich jak masa ciała (BMI), wyjściowe stężenie 25(OH)D czy polimorfizmy genetyczne w obrębie szlaków metabolicznych, które mogą powodować różnice w odpowiedzi nawet do $\pm 20\%$.

Najnowsze badania wskazują na systematyczny wzrost stosowania suplementów witaminy D – zarówno w wyniku decyzji podejmowanych samodzielnie przez pacjentów, jak i na podstawie zaleceń lekarskich. Jak pokazują analizy, w ciągu ostatniej dekady odsetek osób z poziomem 25(OH)D przekraczającym 150 nmol/L zwiększył się aż o 200 % (Kimball et al., 2017). Za bezpieczną dawkę dzienną witaminy D₃ dla dorosłych uznaje się nawet 10 000 IU, choć dla dzieci i kobiet w ciąży przyjmuje się raczej limit 4000 IU. Według McCullough, długotrwała suplementacja witaminy D w dawce 5000–10 000 IU, badana u ponad 4700 pacjentów, była dobrze tolerowana (McCullough et al., 2019). Mimo to należy zachować ostrożność – wiedza na temat długofalowej toksyczności i efektów tkankowych pozostaje ograniczona.

2.3.2 Suplementacja witaminy D u zwierząt gospodarskich, ze szczególnym uwzględnieniem świń

W przypadku zwierząt gospodarskich, w tym świń, zalecenia dotyczące suplementacji witaminy D pozostają niejednoznaczne i wymagają dalszego doprecyzowania. W warunkach nowoczesnej hodowli, gdzie zwierzęta mają ograniczony dostęp do światła słonecznego, całość zapotrzebowania na witaminę D musi być pokryta wraz z dietą.

Zgodnie z zaleceniami National Research Council (NRC, 2012):

- o młode świny powinny otrzymywać 150 – 220 IU witaminy D₃ na kg paszy,
- o a lochy w ciąży i laktacji – 800 IU/kg paszy.

Tymczasem Unia Europejska określa maksymalną dopuszczalną dawkę suplementacyjną dla świń na poziomie 50 µg witaminy D₃/kg paszy (co odpowiada 2000 IU/kg paszy). To właśnie ta wartość jest najczęściej stosowana w hodowli trzody chlewnej (L. Zhang et al., 2022).

Wysokie dawki witaminy D₃ w diecie świń mogą potencjalnie przynosić szereg korzyści zarówno z punktu widzenia zdrowia zwierząt, jak i jakości końcowego produktu. Jednym z celów takiej suplementacji jest biofortyfikacja mięsa wieprzowego, czyli zwiększenie zawartości witaminy D w mięsniu, co ma szczególne znaczenie w przypadku zwierząt utrzymywanych w systemach bez dostępu do światła słonecznego. Choć naturalna zawartość witaminy D w wieprzowinie jest niska, a znacznie większe jej ilości znajdują się w podrobach, suplementacja może podnieść poziom tej witaminy w mięsie (Duffy et al., 2018; Larson-Meyer

et al., 2017; Schmid & Walther, 2013). Dodatkowo, stosowanie witaminy D₃ lub jej metabolitu 25(OH)D₃ może korzystnie wpływać na cechy jakościowe mięsa, takie jak zdolność zatrzymywania wody, barwa, pH, czy parametry tekstury (Upadhaya et al., 2022; Wierzbicka et al., 2023). W badaniach wykazano m.in. poprawę kruchości mięsa u bydła i świń przy zastosowaniu wysokich dawek, choć przy bardzo wysokich poziomach (np. 80 000 IU/kg) odnotowano również zahamowanie przyrostu masy ciała (Wilborn et al., 2004). Ponadto, suplementacja witaminy D może wspierać zdrowie i funkcje fizjologiczne zwierząt, poprawiając odporność i wydajność rozrodczą (Smołucha et al., 2024). Witamina D uznawana jest za bezpieczną w szerokim zakresie dawek, jednak przy bardzo wysokim spożyciu mogą wystąpić efekty niepożądane, takie jak hiperkalcemia czy potencjalne ryzyko miażdżycy (Lauridsen, 2014; Toda et al., 1985).

Warto jednak zaznaczyć, że dotychczasowe wyniki badań są niejednoznaczne, a liczba dostępnych prac naukowych w tym obszarze pozostaje ograniczona, co utrudnia ocenę skuteczności i bezpieczeństwa takich interwencji. Zróżnicowanie stosowanych dawek, form witaminy D oraz warunków hodowlanych dodatkowo wpływa na trudności w porównywaniu wyników. Wszystko to wskazuje na potrzebę przeprowadzenia dalszych, dobrze kontrolowanych badań, które pozwolą określić optymalne strategie suplementacji, zapewniające zwiększenie wartości odżywczej mięsa i poprawę jakości produkcji, przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa zwierząt i efektywności ekonomicznej hodowli (Burild et al., 2016).

2.3.3 Toksyczność witaminy D

Witamina D jest generalnie uznawana za substancję bezpieczną, zwłaszcza gdy jej źródłem jest naturalna synteza skórna pod wpływem promieniowania UVB. W takich warunkach organizm samodzielnie reguluje jej produkcję, a nadmiar przekształcany jest w nieaktywne metabolity (lumisterol, tachysterol), które nie wykazują działania biologicznego i są szybko usuwane (Holick, 2007). Dodatkowo, aktywacja witaminy D do jej hormonalnej formy podlega ścisłej kontroli homeostatycznej przez stężenie wapnia, parathormonu (PTH) oraz FGF23 (Bouillon et al., 2008; Christakos et al., 2010). Istotną rolę odgrywa tu także aktywność enzymu 1 α -hydroksylazy (CYP27B1), który katalizuje przekształcenie 25(OH)D do kalcytriolu. Ekspresja tego enzymu jest regulowana przez stężenie witaminy D we krwi – przy jej wysokim poziomie aktywność CYP27B1 ulega obniżeniu, co stanowi dodatkowy mechanizm zabezpieczający przed nadmierną aktywacją osi witaminy D (Oczkowicz et al., 2021). Wysoki

poziom kalcytriolu oraz wapnia działa hamująco na dalszą konwersję, a enzym 24- hydroksylaza (CYP24A1) odpowiada za inaktywację nadmiaru metabolitów witaminy D (Jones, 2008). Jednak przy długotrwałym stosowaniu dużych dawek może dojść do kumulacji 25(OH)D, co przekracza możliwości regulacyjne organizmu i może prowadzić do toksyczności. Objawia się ona głównie hiperkalcemią lub hyperkalciurią, której symptomy obejmują nudności, osłabienie, wielomocz, zaburzenia rytmu serca, a w ciężkich przypadkach – uszkodzenie nerek (Marcinowska-Suchowierska et al., 2018; Vieth, 2007). Toksyczność witaminy D najczęściej obserwowano u osób, które przez kilka miesięcy lub nawet lat przyjmowały bardzo wysokie dawki cholekalcyferolu – od 50 000 do 100 000 IU dziennie – bez nadzoru lekarskiego, przy czym ryzyko to zależało m.in. od wieku, masy ciała oraz innych czynników wpływających na metabolizm witaminy D (Marcinowska-Suchowierska et al., 2018).

Powszechnie przyjmuje się, iż jedynym istotnym efektem ubocznym nadmiernej podaży witaminy D jest hiperkalcemia i jej następstwa, dlatego w badaniach bezpieczeństwa rzadko analizuje się szczegółowo wpływ wysokich dawek witaminy D na funkcjonowanie poszczególnych narządów i układów. W konsekwencji większość ocen bezpieczeństwa koncentruje się wyłącznie na stężeniu wapnia w surowicy oraz ewentualnych zwapnieniach tkanek miękkich, takich jak nerki, pomijając inne możliwe aspekty długoterminowego wpływu wysokich dawek witaminy D na zdrowie. Skutkuje to brakiem danych dotyczących potencjalnych, subtelniejszych efektów ubocznych – zwłaszcza tkankowo specyficznych – które mogłyby występować nawet przy braku zaburzeń gospodarki wapniowej.

2.4 Główne założenia eksperymentu i uzasadnienie wyboru metod badawczych

2.4.1 Znaczenie technik omicznych w badaniach nad witaminą D

W świetle złożonych i wielowymiarowych efektów działania witaminy D, coraz większego znaczenia nabierają nowoczesne techniki analityczne umożliwiające ocenę odpowiedzi biologicznej na poziomie molekularnym. Szczególne miejsce zajmują tutaj tzw. techniki omiczne, czyli podejścia badawcze skupione na globalnej analizie dużych zbiorów cząsteczek biologicznych, takich jak DNA, RNA, białka czy metabolity (Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials et al., 2012). W kontekście badań nad składnikami odżywczymi – w tym witaminą D – zastosowanie znajdują szczególnie trzy podejścia:

- transkryptomika, umożliwiająca ocenę zmian w poziomie ekspresji RNA,

- proteomika, pozwalająca na analizę ilościową i jakościową białek oraz ich modyfikacji i interakcji,
- metabolomika, badająca zmiany w profilu metabolitów obecnych w komórkach i tkankach.

Zintegrowanie tych danych w ramach tzw. podejścia multiomicznego pozwala na uzyskanie pełniejszego obrazu odpowiedzi komórek lub tkanek na określone czynniki środowiskowe. Choć istnieje sporo badań nad wpływem witaminy D na ekspresję genów, to nadal brakuje badań łączących różne poziomy regulacji molekularnej. Zastosowanie technik omicznych umożliwia nie tylko potwierdzenie znanych mechanizmów działania witaminy D, ale również odkrywanie nowych szlaków molekularnych oraz identyfikację potencjalnych, dotąd nieopisanych efektów ubocznych, które mogą pozostać niezauważone przy użyciu tradycyjnych metod biologii molekularnej. W związku z tym nowoczesne podejścia multiomiczne stanowią niezwykle cenne narzędzie w badaniach nad witaminą D, umożliwiając dokładniejsze zrozumienie jej działania na poziomie molekularnym. Co istotne, mogą one odegrać kluczową rolę w opracowywaniu bardziej precyzyjnych i zindywidualizowanych zaleceń suplementacji – uwzględniających stan zdrowia, fizjologiczny kontekst oraz specyfikę tkanki docelowej.

2.4.2 Świnia jako zwierzę modelowe w badaniach translacyjnych

Wybór odpowiedniego modelu badawczego ma kluczowe znaczenie dla trafności wniosków i możliwości ich translacji na organizm ludzki. W tym kontekście, model świński odgrywa coraz większą rolę, ze względu na wysoki stopień podobieństwa anatomicznego, fizjologicznego i metabolicznego do człowieka. Świnie wykazują zbliżoną budowę i funkcję przewodu pokarmowego, układu sercowo-naczyniowego oraz metabolizmu tłuszczu, co czyni je bardziej odpowiednimi niż tradycyjne modele gryzoni w wielu dziedzinach nauk biomedycznych (Dawson et al., 2009; Swindle et al., 2012). Podobna masa ciała, skład tkanek oraz tempo wzrostu umożliwiają prowadzenie doświadczeń żywieniowych i farmakologicznych w warunkach zbliżonych do klinicznych. Ekspresja receptorów i enzymów związanych z metabolizmem witaminy D – takich jak VDR, CYP27B1 i CYP24A1 – została potwierdzona u świń w wielu tkankach docelowych, w tym w wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej, co czyni ten model szczególnie przydatnym w badaniach nad suplementacją i zaburzeniami metabolicznymi (Hasan et al., 2024). Dzięki tym cechom, świnie

stanowią wartościowy model translacyjny do oceny wpływu suplementacji witamin i innych interwencji żywieniowych.

2.4.3 Założenia pracy doktorskiej

Jak wykazano, witamina D pełni liczne, wielokierunkowe funkcje fizjologiczne, wykraczające poza klasyczną rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej. Coraz powszechniej stosuje się suplementację witaminą D w dawkach wyższych niż rekomendowane, co dotyczy zarówno ludzi, jak i zwierząt gospodarskich. W świetle niejednoznacznych danych literaturowych dotyczących bezpieczeństwa i skutków metabolicznych takich interwencji, konieczne staje się pogłębione zbadanie ich długofalowego wpływu na organizm.

Szczególnie istotne wydaje się zastosowanie nowoczesnych narzędzi biologii molekularnej – takich jak techniki omiczne – w celu kompleksowej oceny skutków suplementacji witaminy D₃ na poziomie transkryptomu, proteomu oraz parametrów fizjologicznych. Dotychczas brakuje badań, które łączyłyby ocenę efektów suplementacji witaminy D z taką szczegółowością i w odniesieniu do zdrowych organizmów nieobjętych niedoborem. Dodatkowo, wybrany model eksperymentalny, jakim są świny, ze względu na swoje podobieństwo do człowieka, stanowi optymalne narzędzie do badań translacyjnych w tym zakresie.

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie stosowaniem wysokich dawek witaminy D, zarówno w medycynie człowieka, jak i w żywieniu zwierząt, co wynika z doniesień o jej potencjalnych efektach plejotropowych. W związku z tym w niniejszym badaniu zdecydowano się na zastosowanie dwóch poziomów suplementacji: jednej dawki umiarkowanie podwyższonej (5000 IU/kg paszy), stanowiącej około 2,5-krotność najczęściej stosowanego poziomu w żywieniu świń, oraz drugiej, bardzo wysokiej (10 000 IU/kg paszy), przekraczającej pięciokrotnie wartość standardową. Celem takiego podejścia było nie tylko określenie bezpieczeństwa i skutków metabolicznych długotrwałego podawania wysokich dawek witaminy D₃ u zdrowych osobników, ale również ocena, czy obserwowane efekty nasilają się proporcjonalnie wraz ze wzrostem dawki, czy też osiągają plateau, co mogłoby sugerować istnienie punktu progowego odpowiedzi biologicznej. Wybrane dawki oparto na wcześniejszych badaniach przedklinicznych i klinicznych, które wskazywały na ich względne bezpieczeństwo oraz zdolność do wywoływania istotnych zmian fizjologicznych i molekularnych, mimo że ich wpływ – zwłaszcza poza układem kostnym – pozostaje wciąż nie w pełni poznany. Celem eksperymentu było zatem zbadanie konsekwencji stosowania

takich dawek w warunkach braku niedoboru witaminy D, co dotychczas było analizowane jedynie sporadycznie.

W związku z powyższym, niniejsza praca doktorska miała na celu ocenę skutków długotrwałej suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ u świń, ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na metabolizm wątroby, mięśni i tkanki tłuszczowej, zarówno na poziomie fizjologicznym, jak i molekularnym. Wątroba została uwzględniona jako główne miejsce przemian metabolicznych i pierwszy etap aktywacji witaminy D (hydroksylacja do 25(OH)D), a także jako kluczowy narząd biosyntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Coraz więcej danych wskazuje również na powiązania między statusem witaminy D a ryzykiem chorób wątroby, takich jak NAFLD. Mięśnie wybrano z uwagi na ich istotny udział w masie ciała oraz potencjał biofortyfikacyjny – oczekiwano wzrostu w parametrach produkcyjnych oraz zawartości witaminy D w mięsie po suplementacji, co mogłoby mieć odzwierciedlenie również w poziomie ekspresji genów. Witamina D jest też szeroko badana w kontekście poprawy funkcji mięśniowej, zwłaszcza u osób starszych i sportowców. Zaś tkanka tłuszczowa została uwzględniona ze względu na funkcje endokrynne i magazynujące, a także liczne doniesienia łączące suplementację witaminy D z otyłością i zaburzeniami metabolicznymi (Schmitt et al., 2018). Witamina D jest magazynowana w tłuszczu, co wpływa na jej biodostępność i może modulować odpowiedź organizmu na suplementację. Dodatkowo, słonina – jako częsty produkt spożywczy – została włączona do analizy także z uwagi na jej potencjalne znaczenie biofortyfikacyjne.

3 Cele pracy doktorskiej

Mimo znaczącego postępu badań dotyczących witaminy D, jej mechanizm działania na poziomie molekularnym i tkankowym, zwłaszcza u zdrowych organizmów, wciąż nie został w pełni scharakteryzowany. Coraz częściej zaleca się stosowanie wysokich dawek suplementacji witaminy D zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, jednak nadal niewiele wiadomo o skutkach długotrwałej suplementacji i akumulacji jej metabolitów w organizmie. Zastosowanie nowoczesnych narzędzi biologii molekularnej, takich jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) czy analizy proteomiczne, otwiera możliwość głębszego zrozumienia molekularnych podstaw działania witaminy D.

Planowane cele badawcze obejmują:

- Ocenę wpływu długotrwałej suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ na parametry zdrowotne i cechy produkcyjne świń, takie jak przyrost masy ciała, wykorzystanie paszy i parametry krwi;
- Sprawdzenie, czy produkty pochodzenia świńskiego – mięso (schab) oraz tłuszcz (słonina) – mogą być skutecznie wzbogacane w witaminę D poprzez suplementację paszy;
- Określenie wpływu wysokich dawek witaminy D₃ w diecie świń na transkryptom wybranych tkanek – wątroby, mięśni i tkanki tłuszczowej;
- Zbadanie, czy zmiany w ekspresji genów wywołane suplementacją witaminą D₃ znajdują odzwierciedlenie na poziomie proteomu;
- Identyfikację potencjalnych mechanizmów działania witaminy D na poziomie tkankowym.

Hipoteza badawcza:

Długotrwała suplementacja diety świń wysokimi dawkami witaminy D₃ (5000 i 10 000 IU/kg paszy) prowadzi do zmian w parametrach fizjologicznych, poziomie witaminy D w tkankach oraz profilu ekspresji genów i białek w wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej, a efekty te można zidentyfikować i scharakteryzować za pomocą technik transkryptomicznych i proteomicznych. Zakłada się ponadto, że suplementacja pozwala na efektywne biofortyfikowanie produktów z wieprzowiny w witaminę D, a obserwowane zmiany

molekularne mogą wskazywać na nowe, potencjalne mechanizmy działania tej witaminy u zdrowych organizmów bez wyjściowego niedoboru.

4 Wykaz i streszczenie prac naukowych

Wyniki uzyskane w ramach realizacji powyższych celów badawczych zostały zawarte w następujących publikacjach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

Publikacja 1:

A. Steg, M. Oczkowicz, G. Smołucha, Omics as a tool to help determine the effectiveness of supplements, *Nutrients* (2022), 14(24), 5305;
<https://doi.org/10.3390/nu14245305>

W pracy przeglądowej opisano zastosowanie nowoczesnych technik omicznych – takich jak transkryptomika, proteomika i metabolomika – w ocenie składu i wpływu suplementów diety, ze szczególnym uwzględnieniem witamin (D, E, A) oraz ekstraktów roślinnych. Praca wprowadza w podstawowe pojęcia związane z omiką oraz omawia najważniejsze dyscypliny, takie jak genomika, nutrigenomika, czy foodomika. Szczególną uwagę poświęcono także problemom związanym z rynkiem suplementów diety, takim jak brak jednolitych regulacji, trudności w ocenie składu preparatów oraz zróżnicowana jakość produktów dostępnych na rynku. Przedstawiono możliwości wykorzystania metod wysokoprzepustowych, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), w badaniach nad wpływem suplementów na ekspresję genów, zmiany w proteomie i profilu metabolitów. Szczególną uwagę poświęcono witaminie D, wskazując na istotne zróżnicowanie odpowiedzi organizmu w zależności od dawki, wskaźnika masy ciała (BMI), indywidualnych cech genetycznych oraz modyfikacji epigenetycznych. Praca stanowi punkt wyjścia do bardziej zintegrowanych badań nad rzeczywistym efektem suplementów na funkcjonowanie organizmu, z uwzględnieniem różnych poziomów regulacji biologicznej.

Publikacja 2:

A. Steg, M. Oczkowicz, M. Świątkiewicz, Effects of high-dose vitamin D₃ supplementation on pig performance, vitamin D content in meat, and muscle transcriptome in pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (2024), 109(2), 560-573; <https://doi.org/10.1111/jpn.14066>

W drugiej publikacji zebrano dane dotyczące wpływu wysokich dawek witaminy D₃ na organizm świń, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w transkryptomie mięśnia *longissimus dorsi*, zawartości witaminy D w tkankach oraz wybranych parametrów fizjologicznych i biochemicznych. Eksperyment przeprowadzono z zastosowaniem dwóch poziomów suplementacji (5000 i 10 000 IU witaminy D₃/kg paszy) w porównaniu do grupy kontrolnej. Przedstawiono szczegółowy opis eksperymentu żywieniowego, obejmujący skład pasz, schemat dawkowania oraz warunki utrzymania zwierząt. Oceniono stężenie witaminy D₃ w surowicy i mięsie, zawartość wapnia w nerkach oraz wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi. Analiza transkryptomu mięśnia za pomocą RNA-seq, potwierdzona metodą qPCR, wykazała ograniczony wpływ suplementacji na ekspresję genów. Dodatkowo wykonano analizę wzbogacenia zbiorów genów (GSEA), która ujawniła zmiany w aktywności szlaków biologicznych związanych z metabolizmem energetycznym, funkcjami układu odpornościowego oraz metabolizmem lipidów.

Praca wskazuje, że wysokie dawki witaminy D₃ powodują jedynie niewielkie zmiany w parametrach produkcyjnych i fizjologicznych u świń oraz wywierają ograniczony wpływ na transkryptom tkanki mięśniowej. Uzyskane wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad bezpieczeństwem i celowością stosowania wysokich dawek witaminy D w żywieniu zwierząt gospodarskich.

Publikacja 3:

A. Steg, G. Smołucha, M. Świątkiewicz, M. Oczkiewicz, Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (2025), <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2025.106835>

W trzeciej publikacji zebrano dane dotyczące wpływu wysokich dawek witaminy D₃ na ekspresję genów i białek w wątrobie zdrowych świń, koncentrując się na molekularnych skutkach suplementacji. W badaniu zastosowano metody RNA-seq, RT-PCR, elektroforezę dwuwymiarową oraz western blot, umożliwiające kompleksową analizę zmian w transkrypcji i proteomie.

Wykazano, że suplementacja witaminy D₃ w dawkach 5000 i 10 000 IU/kg paszy prowadziła do obniżenia ekspresji genów i poziomu białek uczestniczących w mitochondrialnej i peroksysomalnej β -oksydacji kwasów tłuszczowych, takich jak *ACSL5*, *ACADVL*, *HADHA*, *ACADM* czy *ECHDC1*, *ECHDC2*. Analiza funkcjonalna ujawniła również zmiany w szlakach związanych z metabolizmem lipidów, sygnalizacją PPAR i stresem oksydacyjnym.

W pracy podkreślono, że stosowanie wysokich dawek witaminy D u zdrowych osobników może prowadzić do potencjalnie niekorzystnych skutków metabolicznych, wynikających najprawdopodobniej z nagromadzenia metabolitów. Zaobserwowane zmiany wskazują na potrzebę dalszych, pogłębionych badań nad bezpieczeństwem oraz długoterminowymi konsekwencjami suplementacji dużymi dawkami. Szczególną uwagę należy zwrócić na słabo poznane działania niepożądane niezwiązane z hiperkalcemią.

Materiały uzupełniające cykl publikacji

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej została przedstawiona w doniesieniu konferencyjnym (Aneks do rozprawy):

A. Steg, A. Wierzbicka, M. Świątkiewicz, M. Oczkowicz. Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D₃ alter transcriptome of adipose tissue? Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, str. 268, 2022, ISBN: 978-90-8686-937-4

W pracy zaprezentowano wyniki dotyczące tkanki tłuszczowej, dla której nie stwierdzono istotnych zmian w transkryptomie (brak genów o zróżnicowanej ekspresji), niezależnie od zastosowanej dawki witaminy D₃ ($p\text{-adj} > 0,05$).

W celu dokładniejszego sprawdzenia, czy suplementacja wysokimi dawkami witaminy D₃ wpływa w jakimś stopniu na określone szlaki sygnałowe, przeprowadzono analizę wzbogacenia zestawów genów (GSEA) z wykorzystaniem oprogramowania STRING. Z całego zbioru danych usunięto geny o wartości baseMean mniejszej niż 10, a następnie, na podstawie wartości p , uporządkowano geny i utworzono listę zawierającą odpowiadające im wartości $\log_2\text{FoldChange}$. Analiza wykazała wzbogacenie dwóch szlaków sygnalizacyjnych KEGG: szlaku fosforylacji oksydacyjnej oraz niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby.

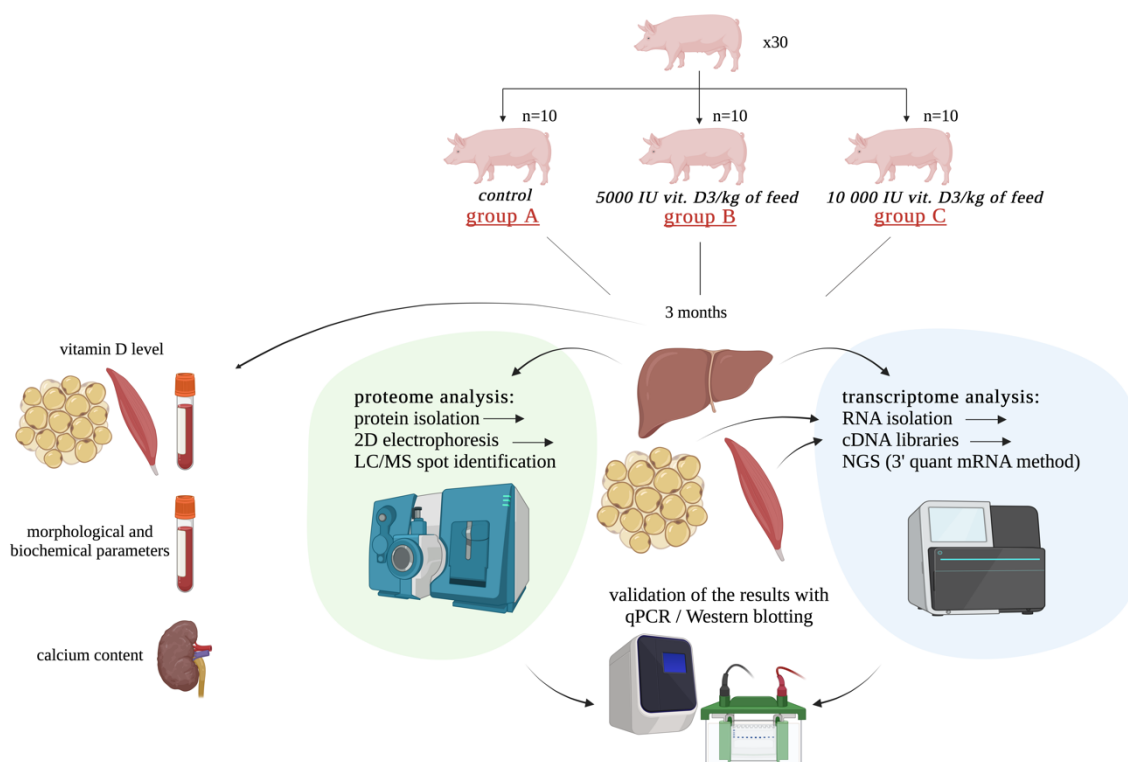
Wyniki te sugerują, że mimo braku istotnych zmian na poziomie pojedynczych genów, suplementacja witaminy D₃ może w niewielkim stopniu modulować aktywność wybranych szlaków biologicznych w tłuszczu, w szczególności związanych z metabolizmem energetycznym.

5 Metodyka

5.1 Eksperyment żywieniowy

Wszystkie procedury w niniejszym badaniu z udziałem żywych zwierząt zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (uchwała nr 427/2020 z dnia 22.07.2020). W trakcie całego okresu doświadczalnego stan zdrowia prosiąt po odsadzeniu był regularnie monitorowany przez lekarza weterynarii. Eksperyment żywieniowy oraz ubój przeprowadzono w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym (Zakład Doświadczalny w Pawłowicach). Materiał zwierzęcy stanowiło 30 wykastrowanych samców (wieprzków) rasy Wielka Biała Polska. Świnie były utrzymywane w indywidualnych klatkach, miały nieograniczony dostęp do paszy i swobodny dostęp do wody. W 84. dniu życia losowo przypisano je (przy zastosowaniu randomizacji) do jednej z trzech równolicznych grup doświadczalnych (A, B lub C). Próbkę krwi pobrano na początku eksperymentu żywieniowego z żyły szyjnej do probówek zawierających EDTA jako antykoagulant. Próbkę krwi odwirowano w celu oddzielenia osocza i przechowywano w temperaturze -20°C .

Przez kolejne 90 dni zwierzęta karmiono izoproteinowymi i izokalorycznymi mieszankami paszowymi różniącymi się jedynie dodatkiem witaminy D_3 (A – 0 / B – 5000 / C – 10 000 IU/kg paszy). Poziom witaminy D w mieszankach paszowych kontrolowano poprzez użycie premiksów zawierających odpowiednią ilość witaminy D (DSM Nutritional Products Sp. z o.o., Mszczonów, Polska). Skład surowcowy i wartość pokarmowa mieszanki paszowej przedstawione są w Tabeli 1 Publikacji 2. Na początku i na końcu eksperymentu indywidualnie mierzono masę ciała oraz pobranie paszy. Obliczono przyrost dzienny (ADG) oraz wykorzystanie paszy. Po zakończeniu doświadczenia świnie przetransportowano do rzeźni i poddano ubojowi. Próbkę krwi, wątroby, mięśni, tłuszczu oraz nerek pobierano natychmiast po uboju. Próbkę krwi pobierano do probówek z EDTA, odwirowywano i osocze przechowywano w temperaturze -20°C . Do analiz molekularnych próbki tkanek umieszczono w probówkach z RNAlater i przechowywano w -20°C . Próbkę mięśni do analizy zawartości witaminy D_3 oraz próbki nerek do analizy wapnia przechowywano w -20°C .



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie metodologii pracy.

5.2 Oznaczenia poziomu witaminy D, wapnia oraz parametrów biochemicznych i morfologicznych krwi

Oznaczenie zawartości witaminy D we krwi przeprowadzono metodą chemiluminescencyjną z wykorzystaniem zestawu MAGLUMI 25-OH Vitamin D (CLIA) na aparacie MAGLUMI 1000 przez firmę zewnętrzną (Laboratorium ANCHEM, ul. Fredry 20, Katowice, Polska). Całkowity poziom 25-OH witaminy D uzyskano w jednostkach ng/mL, a zakres pomiarowy metody wynosił 3 – 150 ng/mL.

Oznaczenie zawartości witaminy D w próbkach mięśniowych oraz tłuszczu przeprowadzono w firmie zewnętrznej (Laboratorium J. S. Hamilton Poland, ul. Chwaszczyńska 180, Gdynia, Polska) metodą pół-preparatywnej chromatografii cieczej w układzie fazy normalnej (HPLC), a następnie metodą analityczną w układzie odwróconej fazy (zgodnie z normą PN-EN 12821:2009). Wynik zawartości witaminy D₃ wyrażono w µg/100 g, a minimalny poziom wykrywalności wynosił 0,25 µg/100 g.

Zawartość wapnia w nerkach oznaczono metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (zgodnie z procedurą SOP M.008b, wyd. 6) w Centralnym Laboratorium

Badawczym Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Aleksandrowicach. Całkowite stężenie wapnia wyrażono w jednostkach g/kg.

Parametry morfologiczne oceniano w pełnej krwi za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego Vet Mythic 18 (Orphée C2 Diagnostics, Francja), zgodnie z wcześniej opisanym protokołem (Szczepanik i in., 2023). Parametry biochemiczne oceniano w próbkach surowicy metodą kolorymetryczną, z wykorzystaniem zestawów diagnostycznych firmy Cormay (Lublin, Polska) oraz automatycznego analizatora biochemicznego BS-180 (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co. Ltd., Chiny). Analizowane parametry biochemiczne obejmowały: całkowity cholesterol (CHOL), lipoproteiny o dużej gęstości (HDL), lipoproteiny o małej gęstości (LDL), triacyloglicerole, dehydrogenazę mleczanową (LDH), aminotransferazę alaninową (ALT), glukozę (GLU), albuminę, kreatyninę, mocznik, białko całkowite, wapń (Ca), fosfor (P) oraz magnez (Mg).

5.3 Izolacja RNA

RNA z mięśnia (*Longissimus dorsi*) oraz wątroby izolowano za pomocą zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology), natomiast z tłuszczu za pomocą zestawu RNeasy KIT (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta. Ilościową ocenę wyizolowanego RNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Wartość RIN (RNA Integrity Number) określano przy użyciu systemu TapeStation2200 (RNA tape, Agilent Technologies) zgodnie z protokołem producenta.

5.4 Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)

Biblioteki cDNA przygotowano przy użyciu zestawu QuantSeq. 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD (Lexogen) zgodnie z protokołem producenta, zaczynając od 300 ng całkowitego RNA. Każda próbka miała unikalny kod kreskowy (barcode). Jakość i ilość bibliotek cDNA oceniano za pomocą fluorometru Qubit (Thermo Scientific, USA) i systemu TapeStation2200 (D1000 tape, Agilent Technologies, USA). Końcowe stężenia bibliotek cDNA znormalizowano do 2 nM, po czym próbki dla każdej z analizowanych tkanek połączono w jedną pulę. Biblioteki rozcieńczono zgodnie z protokołem generowania klastrów, a sekwencjonowanie przeprowadzono na urządzeniu Illumina NextSeq 550 (Illumina, USA) z wykorzystaniem zestawu High-Output v2.5 w trybie pojedynczego odczytu.

5.5 Analiza bioinformatyczna NGS

Pliki NGS przetworzono za pomocą QuantSeq Data Analysis Pipeline na platformie BlueBee Genomics. Pipeline przetwarzał pliki FASTQ poprzez przycinanie (trimming) za pomocą BBDuk, dopasowanie odczytów (read alignment) z użyciem STAR do genomu świni (Sscrofa11.1), oraz kroki kontroli jakości generujące liczbę odczytów genów za pomocą FastQC oraz HTSeq. Próbkę z niskiej jakości odczytami zostały odfiltrowane. Następnie przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów za pomocą pipeline'u DESeq2. Za geny o zróżnicowanej ekspresji (DEG) uznano te o $p < 0,05$, bez dodatkowych kryteriów filtracji.

5.6 Analiza funkcjonalna i analiza wzbogacenia zestawów genów (GSEA)

Analiza funkcjonalna i analiza wzbogacenia zestawów genów (GSEA) zostały przeprowadzone przy użyciu oprogramowania STRING (<http://string-db.org>, wersja 12.0). Z całego zestawu danych usunięto geny o wartości średniej (base mean) poniżej 10, a następnie posortowano je według wartości p i utworzono listę genów z odpowiadającymi im wartościami $\log_2\text{FoldChange}$.

5.7 qPCR

Weryfikację wyników RNA-seq przeprowadzono za pomocą analizy qPCR. Próbkę RNA (300 ng całkowitego RNA) poddano odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu High-Capacity RNA to cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Dla wybranych genów przeprowadzono analizę qPCR z użyciem mieszaniny reakcyjnej TagMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Litwa) oraz sond genowych TagMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) lub z wykorzystaniem mieszaniny RT PCR Mix EvaGreen (A&A Biotechnology, Polska) na aparacie QuantStudio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific, USA), zgodnie z protokołem producenta. Dane zostały znormalizowane względem genu referencyjnego. Poziomy względnej ekspresji obliczono przy użyciu metody delta-delta CT (Livak i Schmittgen, 2001). Szczegóły przedstawione w Publikacji 2 oraz 3.

5.8 Analizy statystyczne

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania SAS Enterprise Guide (SAS Institute Inc., wersja 7.1). Analizy statystyczne dotyczące oznaczeń

parametrów krwi, stężenia 25(OH)D oraz witaminy D₃ w tkankach, zawartości wapnia oraz wyników qPCR przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), jeśli dane miały rozkład normalny. W przypadku braku spełnienia tego kryterium zastosowano nieparametryczną analizę wariancji. Porównanie średnich pomiędzy grupami doświadczalnymi wykonano przy użyciu testu Duncana przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie.

5.9 Izolacja białek

Z uwagi na to, że istotne zmiany na poziomie transkryptomu zaobserwowano wyłącznie w tkance wątroby, analizy proteomiczne przeprowadzono jedynie dla tej tkanki, w celu oceny, czy różnice w ekspresji genów znajdują odzwierciedlenie również na poziomie białek.

Z każdej z 30 próbek pobrano 50 mg tkanki wątroby, którą zhomogenizowano przy użyciu homogenizatora w zimnym buforze RIPA (Pierce™ RIPA buffer, Thermo Scientific, USA) zawierającym koktajl inhibitorów proteaz (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, USA). Homogenat inkubowano na lodzie przez 30 minut, mieszając krótko co 10 minut na wortexie. Następnie próbki odwirowano przy 14 000 g, w temperaturze 4 °C przez 15 minut, a supernatant zebrano. Zawartość białka oznaczono metodą BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA), zgodnie z protokołem producenta.

5.10 Elektroforeza dwuwymiarowa (2D)

Do analizy elektroforetycznej 2D (2DE) oczyszczono 500 µg białek dla każdej próbki przy użyciu zestawu ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, USA). Elektroforezę przeprowadzono w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki ($n = 30$). Do rehidratacji pasków IPG (11 cm, nieliniowy zakres pH 3–10, ReadyStrip™ IPG, Bio-Rad) użyto 185 µl buforu zawierającego 250 µg oczyszczonych białek dla każdej próbki. Rozdział w pierwszym wymiarze przeprowadzono metodą ogniskowania izoelektrycznego (IEF) przy 26 000 V-h, z użyciem systemu Protean® i12 IEF Cell (Bio-Rad, USA). Następnie paski IPG poddano dwóm etapom równoważenia – pierwszy w buforze zawierającym 6 M mocznika, 0,05 M Tris-HCl, 2 % SDS, 20 % glicerolu i 2 % (w/v) DTT, a drugi w buforze o tym samym składzie z dodatkiem 2,5 % (w/v) jodoacetamidu, pH 8,8.

Paski umieszczono na gradientowych żelach poliakrylamidowych SDS (4-20 %, barwione wstępnie; Criterion, Bio-Rad, USA), a drugi wymiar rozdziału wykonano w systemie Criterion Cell (Bio-Rad, USA). Po rozdziale białka uwidoczniło w systemie obrazowania (ChemiDoc™ MP, Bio-Rad, USA) oraz wybarwiono przy użyciu Coomassie Brilliant Blue G- 250 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Analizę żeli przeprowadzono z użyciem oprogramowania SameSpot v5.1.0.0. Spoty o powierzchni < 200 zostały usunięte, a za białka o zróżnicowanej ekspresji (DEP) uznano te, dla których $p < 0,05$.

Wybrane spoty wycięto ręcznie z żeli barwionych błękitem Coomassie i przesłano do analizy spektrometrii masowej w Laboratorium Proteomiki i Spektrometrii Mas, Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN. Próbkę poddano trawieniu trypsyną w żelu, a dane uzyskano z wykorzystaniem spektrometru nLC-MS/MS (timsTOF Pro2, Bruker). Porównanie mas peptydów oraz ich fragmentów z sekwencjami białek przeprowadzono przy użyciu bazy danych MASCOT oraz bazy sekwencji SwissProt.

5.11 Western blot

Do analizy western blot wykorzystano 10 g próbek białka, które rozdzielono na 12 % żelu SDS/PAGE, a następnie przeniesiono na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) używając metody półsuchego transferu (Trans-Blot Turbo System, Bio-Rad, USA). Membranę blokowano w roztworze TBS z 0,1 % Tween-20 (TBS-T) zawierającym 3 % BSA (Serva, Niemcy) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membranę inkubowano przez noc w 4 °C z przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko: LDHB, HADHA, CRP, RGN, IDH1, ASL, ACSL5, ACADM, TPI1, β -tubulinie (Proteintech, Niemcy) lub β -aktynie (Invitrogen, USA), rozpuszczonymi w buforze do blokowania. Po trzykrotnym przemyciu w TBS-T, membranę inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z HRP (Thermo Scientific, USA) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po kolejnym trzykrotnym przemyciu, analizę chemiluminescencyjną przeprowadzono przy użyciu substratu Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, USA) i wizualizacji w systemie ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, USA). Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania ImageLab (Bio-Rad, USA).

6 Podsumowanie wyników i dyskusja

6.1 Analiza literaturowa

Analiza danych literaturowych wykazała, że techniki omiczne stanowią niezwykle cenne narzędzie w badaniach nad suplementami diety, umożliwiając ich kompleksową ocenę na poziomie molekularnym. W obliczu dynamicznego rozwoju rynku suplementów oraz niedostatecznych regulacji i standaryzacji, metody takie jak sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową (LC-MS) oraz spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) pozwalają zarówno na dokładną analizę składu produktów i wykrycie ewentualnych zanieczyszczeń, jak i na ocenę ich wpływu na organizm. Techniki NGS umożliwiają identyfikację zmian w ekspresji genów oraz aktywowanych szlaków metabolicznych w odpowiedzi na suplementację. Z kolei LC-MS pozwala precyzyjnie oznaczyć poziomy suplementowanych związków i ich metabolitów w surowicy, co jest kluczowe dla ustalania relacji dawka – efekt. Metoda ta wykazała m.in., że stężenie witaminy D₃ we krwi rośnie proporcjonalnie do podanej dawki, osiągając efekt plateau po miesiącu, co może być pomocne w definiowaniu biomarkerów ekspozycji. Natomiast metoda NMR umożliwia analizę profilu metabolomicznego, ocenę toksyczności oraz porównanie składu suplementów w zależności od odmiany surowca czy technologii przetwarzania.

Zastosowanie technik omicznych pozwala również na personalizację suplementacji z uwzględnieniem czynników genetycznych i metabolicznych, takich jak polimorfizmy genów wpływających na poziom witaminy D, BMI, czy poziom fruktozy. Jest to szczególnie istotne w przypadku substancji roślinnych, których działanie opiera się głównie na tradycyjnych przesłankach, a omiki umożliwiają ich naukową weryfikację. Przykłady takich badań obejmują suplementację resweratrole, zieloną herbata, żeń-szeniem czy kurkuminą – ocenianą zarówno na poziomie ekspresji genów, jak i metabolomu.

Podsumowując, wykorzystanie technik omicznych w badaniach nad suplementami diety pozwala nie tylko ocenić ich jakość i skuteczność, ale także zidentyfikować grupy populacyjne, które mogą odnieść z suplementacji największe korzyści lub u których może ona być nieskuteczna bądź niewskazana. Stanowi to fundament dla rozwoju spersonalizowanej suplementacji oraz racjonalnego i bezpiecznego wykorzystania suplementów w profilaktyce i terapii wspomagającej.

6.2 Dane eksperymentalne

6.2.1 Dane biochemiczne i produkcyjne

Dodatkowa suplementacja witaminą D mieszanki paszowej u świń spowodowała spadek kilku parametrów krwi, takich jak anizocytoza płytek krwi (PDW) ($p = 0,0042$) oraz wskaźnik rozkładu objętości krwinek czerwonych (RDWC) w grupie suplementowanej 5000 IU/kg paszy ($p = 0,035$). Zaobserwowano również zmiany w parametrach biochemicznych, takie jak spadek poziomu glukozy (GLU) ($p = 0,022$), a w przypadku suplementacji witaminą D w ilości 5000 IU/kg paszy także wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej (ALT) ($p = 0,028$) oraz dehydrogenazy mleczanowej (LDH) ($p = 0,049$). Szczegóły przedstawiono w Tabelach 3 i 4 publikacji 2.

Suplementacja paszy witaminą D₃ w dawce 5000 IU/kg spowodowała ponad trzykrotny wzrost poziomu 25(OH)D we krwi, natomiast suplementacja dawką 10 000 IU/kg skutkowała czterokrotnym wzrostem w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,0001$).

Suplementacja diety świń witaminą D₃ w dawce 5000 IU/kg paszy spowodowała wzrost zawartości witaminy D w próbkach mięśnia (schab) o 35 %, natomiast dawka 10 000 IU/kg paszy spowodowała wzrost o 162 %.

Szczegółowe dane liczbowe przedstawiono w Tabelach 6 i 7 oraz na Rysunku 2 w Publikacji nr 2 oraz w Tabeli 1 niniejszej pracy.

Suplementacja diety świń witaminą D₃ w dawce 5000 IU/kg paszy spowodowała wzrost zawartości witaminy D₃ w tłuszczu o około 67 % w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei suplementacja dawką 10 000 IU/kg paszy skutkowała ponad 120 % wzrostem poziomu witaminy D₃ w słoninie względem grupy kontrolnej (Tabela 1).

Tabela 1 Zawartość witaminy D₃ w schabie i słoninie w różnych grupach badawczych.

	schab		słonina	
	śr. wit. D ₃ [ug/100g]	SD	śr. wit. D ₃ [ug/100g]	SD
grupa A	0,186	0,029	0,681	0,274
grupa B	0,252	0,101	1,140	0,410
grupa C	0,488	0,199	1,504	0,641

(średnia zawartość [ug/100g] ± odchylenie standardowe)

Suplementacja diety świń witaminą D₃ spowodowała wzrost zawartości wapnia w nerkach przy obu poziomach suplementacji ($p = 0,033$). Stwierdzono jej podwyższony poziom o 2,5 % w grupie B oraz 6 % w grupie C w porównaniu do grupy kontrolnej. Szczegóły przedstawiono na Rysunku 2 w Publikacji nr 2.

Powyższe wyniki potwierdzają skuteczność suplementacji witaminy D w eksperymencie żywieniowym. Suplementacja skutkowała istotnym, zależnym od dawki wzrostem stężenia 25- hydroksywitaminy D [25(OH)D] we krwi. Warto zaznaczyć, że obserwowany wzrost nie był proporcjonalny do podawanej dawki, co sugeruje występowanie zjawiska wysycenia – powyżej pewnego poziomu stężenia 25(OH)D dalsze zwiększanie dawki suplementu nie prowadzi do proporcjonalnego wzrostu jego stężenia we krwi, a krzywa odpowiedzi osiąga plateau (Steg et al., 2024).

Zaobserwowano istotny statystycznie spadek wartości wskaźników takich jak PDW oraz RDWC. Zmniejszenie tych parametrów może sugerować ogólną poprawę jednorodności składu komórkowego krwi, co może być przejawem korzystnego wpływu witaminy D na procesy hematopoezy i stabilność morfologiczną elementów morfotycznych. Trudno jednak jednoznacznie interpretować te zmiany. Równocześnie stwierdzono spadek poziomu glukozy we krwi, co może wskazywać na wpływ witaminy D na gospodarkę węglowodanową, prawdopodobnie poprzez poprawę wrażliwości tkanek na insulinę lub zmiany w metabolizmie energetycznym. Z kolei wzrost aktywności enzymów takich jak aminotransferaza alaninowa (ALT) i dehydrogenaza mleczanowa (LDH) przy dawce suplementacyjnej 5000 IU/kg może sugerować zwiększoną aktywność metaboliczną wątroby i mięśni lub potencjalne obciążenie tych narządów, choć wartości te pozostają w granicach fizjologicznych. Co ciekawe, przy wyższej dawce (10 000 IU/kg) nie odnotowano wyraźnego wzrostu tych parametrów. Może to wynikać z mechanizmów adaptacyjnych, kompensacyjnych lub różnic w czasie odpowiedzi fizjologicznej.

Suplementacja diety świń witaminą D₃ wpływała na zawartość tej witaminy w tkankach – zarówno w mięśniu (schabie), jak i w tkance tłuszczowej (słoninie) – w sposób zależny od dawki suplementacyjnej. Świadczy to o skutecznym wzbogaceniu tkanek zwierząt w witaminę D, co może mieć istotne znaczenie żywieniowe i technologiczne, zwłaszcza w kontekście produkcji mięsa. Niemniej jednak, uzyskana zawartość witaminy D w biofortyfikowanym mięsie wciąż nie jest na tyle wysoka, aby można było uznać je za dobre źródło tej witaminy w kontekście dziennego zapotrzebowania. Biorąc pod uwagę zalecaną dawkę witaminy D, przeciętne spożycie wieprzowiny (ok. 63 g/dzień) oraz obserwowany trend ograniczania

konsumpcji czerwonego mięsa, udział tak wzbogaconej wieprzowiny w pokryciu zapotrzebowania pozostaje niewielki – na poziomie zaledwie 1,1–2 %. Jak potwierdzają inne badania (np. (Duffy et al., 2018; Wilborn et al., 2004)), nawet przy zastosowaniu bardzo wysokich dawek suplementacyjnych, zawartość witaminy D w mięsie pozostaje ograniczona, co potwierdza, że mięso wieprzowe nie powinno być traktowane jako główne źródło tej witaminy w diecie.

Dodatkowo, suplementacja diety świń witaminą D prowadziła do zwiększenia zawartości wapnia w nerkach. Nadmiar wapnia w tkankach, może być objawem hiperkalcemii i prowadzić do ich uszkodzenia. Brakuje jednak jednoznacznych, dobrze udokumentowanych danych referencyjnych dotyczących fizjologicznej zawartości wapnia w tkance nerek u świń. W przypadku stężenia wapnia w osoczu dostępne są różne wartości referencyjne, niektóre źródła podają zakres 7,12-11,6 mg/dL (“Appendix 3,” 2002). Oznacza to, że w naszym eksperymencie stężenie wapnia w osoczu mieściło się w granicach normy we wszystkich grupach badawczych, jednak było bliskie górnej granicy dla grup z dodatkową suplementacją. Podsumowując, wyniki badania potwierdzają możliwość biofortyfikacji tkanek świń witaminą D₃ oraz jej wpływ na wybrane parametry metaboliczne i hematologiczne, jednak jednocześnie wskazują na konieczność ostrożności przy stosowaniu wysokich dawek suplementacji. Zaobserwowane zmiany, zarówno na poziomie stężenia 25(OH)D, jak i zawartości wapnia w tkankach, sugerują możliwość występowania efektów granicznych oraz potencjalnych konsekwencji metabolicznych, wymagających dalszych badań w celu pełnej oceny bezpieczeństwa i zasadności długoterminowej suplementacji wysokimi dawkami.

6.2.2 Transkryptom tkanki mięśniowej

Analiza profilu transkryptomicznego mięśni świń nie wykazała istotnych różnic w ekspresji genów pomiędzy grupą kontrolną a grupą otrzymującą 5000 IU/kg paszy przy poziomie istotności statystycznej $p_{adj} < 0.05$. Jedynie w grupie otrzymującej najwyższą dawkę witaminy D zidentyfikowano pojedynczy gen o zróżnicowanej ekspresji – *IFNGR2* (interferon gamma receptor 2) ($p_{adj} = 0,002$; $\log_2FC = 1,388$). Choć wynik ten może sugerować immunomodulacyjny efekt witaminy D, jego znaczenie osłabia brak potwierdzenia w analizie qPCR. Metoda qPCR wykazała również wzrost ekspresji genu *VDR* ($p = 0,02$), co potwierdza obecność receptora witaminy D w mięśniach oraz wskazuje na ich potencjalną rolę jako tkanki

wrażliwej na witaminę D. Warto jednak zaznaczyć, że niski poziom ekspresji *VDR* (CT 32–35) wskazuje na jego ograniczoną znaczenie w analizowanych warunkach.

Aby ocenić potencjalny wpływ suplementacji witaminą D₃ na aktywność szlaków biologicznych w tkance mięśniowej, przeprowadzono analizę wzbogacenia zestawów genów (GSEA).

W grupie suplementowanej 5000 IU/kg zidentyfikowane procesy dotyczyły głównie:

- funkcjonowania układu odpornościowego (np. aktywacja odpowiedzi immunologicznej (FDR = 0,0073, ES = 1,19), odpowiedź ostrej fazy (FDR = 0,0048, ES = 2,97), czy aktywacja układu dopełniacza (FDR = 5,18e⁻⁵, ES = 2,48),
- metabolizmu kwasów tłuszczowych (FDR = 0,003, ES = 1,01),
- metabolizmu steroidów (FDR = 0,0001, ES = 1,58), w tym biosyntezy cholesterolu (FDR = 0,003, ES = 2,51).

Z kolei w grupie otrzymującej 10 000 IU/kg, wykazano wpływ na procesy związane z funkcją energetyczną mitochondriów jak:

- procesami metabolicznymi związanymi z ATP (FDR = 0,00022, ES = 1,50),
- oddechowym łańcuchem transportu elektronów (FDR = 0,00098, ES = 2,08),
- fosforylacją oksydacyjną (FDR = 3,83e⁻⁶, ES = 2,78).

Metodą qPCR sprawdzono również poziom ekspresji wybranych genów, których ekspresja w mięśniach według danych literaturowych może być modulowana przez witaminę D, takich jak *MYH2* (łańcuch ciężki miozyny 2), *CRYAB* (krystalina alfa B), *FND5* (białko zawierające domenę fibryonektyny typu III 5) oraz *CS* (syntaza cytrynianowa). Jednak w naszym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie ich ekspresji pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolną.

Szczegółowe dane dotyczące transkryptomu tkanki mięśniowej znajdują się na Rysunkach 3-5 w Publikacji nr 2.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że mimo zastosowania wysokich dawek suplementacji witaminą D₃, wpływ na ekspresję genów w mięśniu szkieletowym świń jest ograniczony. Wykrycie pojedynczego genu różnicowanego sugeruje, że efekty transkrypcyjne witaminy D w tej tkance są niewielkie lub zależne od dodatkowych czynników.

Wzbogacenie procesów związanych z układem odpornościowym i metabolizmem lipidów (w tym cholesterolu) w grupie 5000 IU/kg potwierdza pleiotropowe działanie witaminy D, wykraczające poza jej klasyczne funkcje związane z gospodarką wapniowo-fosforanową. Witamina D może wpływać na ekspresję genów zaangażowanych w syntezę i transport lipidów, a także na regulację odpowiedzi zapalnej, co zostało wcześniej opisane w literaturze (Fatehi-Hassanabad & Chan, 2005; Miao et al., 2020; Warren et al., 2021).

Z kolei zidentyfikowane wzbogacenia w grupie 10 000 IU/kg dotyczyły głównie procesów mitochondrialnych, takich jak fosforylacja oksydacyjna i synteza ATP, co może świadczyć o roli witaminy D w regulacji metabolizmu energetycznego poprzez wpływ na funkcjonowanie mitochondriów. Wynika to prawdopodobnie z pośredniego działania witaminy D na homeostazę wapniową, która odgrywa kluczową rolę w aktywności enzymów łańcucha oddechowego.

Brak istotnych zmian w ekspresji klasycznych markerów miogenezy (takich jak *MYH2*, *MSTN*, *MYOD*) oraz brak wpływu na geny metaboliczne (np. *CRYAB*, *CS*, *FNDC5*) sugeruje, że suplementacja witaminą D w warunkach naszego doświadczenia nie wywiera bezpośredniego efektu anabolicznego na mięśnie. Podobne obserwacje poczyniono w badaniach klinicznych z udziałem ludzi, w których suplementacja nie wpływała znacząco na transkryptom mięśniowy (Hangelbroek et al., 2019; Mølmen et al., 2021).

Podsumowując, nasze wyniki wskazują, że choć wysokie dawki witaminy D mogą modulować wybrane procesy biologiczne w mięśniach – takie jak metabolizm energetyczny i odpowiedź immunologiczna – ich wpływ na globalny profil ekspresji genów w tej tkance pozostaje ograniczony. Należy przy tym podkreślić, że celem badania nie była ocena skutków niedoboru witaminy D ani efektu jej wyrównania, lecz analiza konsekwencji stosowania wysokich dawek suplementacji u osobników z prawidłowym poziomem tej witaminy.

6.2.3 Transkryptom tkanki tłuszczowej.

Analiza RNA-seq wykazała, że w przypadku tkanki tłuszczowej brak jest istotnych zmian w transkryptomie tkanki tłuszczowej, niezależnie od zastosowanej dawki witaminy D₃ ($p\text{-adj} > 0,05$).

Dla uzyskania szerszego obrazu potencjalnych zmian w szlakach biologicznych wywołanych suplementacją witaminy D₃, przeprowadzono analizę GSEA z użyciem pełnego zestawu genów.

W porównaniu grupy kontrolnej z grupą suplementowaną 5000 IU/kg paszy zidentyfikowano wzbogacenie w dwa istotne szlaki KEGG:

- fosforylacja oksydacyjna (FDR = 0,00052, ES = 1,96),
- niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD) (FDR = 0,00052, ES = 1,53).

W zestawieniu grupy kontrolnej z grupą suplementowaną 10 000 IU/kg paszy, nie wykryto istotnie zmienionych szlaków.

Szczegółowe dane dotyczące transkryptomu tkanki tłuszczowej, znajdują się w doniesieniu na konferencję EAAP 2022 (Aneks do rozprawy).

Fosforylacja oksydacyjna, której wzbogacenie wykryto w tkance tłuszczowej przy dawce 5000 IU/kg, pozostaje zgodna z obserwacjami uzyskanymi w mięśniach, gdzie również odnotowano zmiany w szlakach mitochondrialnych związanych z produkcją energii. Z kolei wzbogacenie szlaku niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) może wskazywać na funkcjonalne powiązania pomiędzy metabolizmem lipidowym adipocytów a procesami zachodzącymi w wątrobie – co sugeruje subtelną, choć istotną interakcję pomiędzy tymi tkankami w regulacji gospodarki lipidowej. Brak wzbogaconych szlaków w grupie otrzymującej wyższą dawkę (10 000 IU/kg) może odzwierciedlać zjawisko adaptacyjne lub kompensacyjne. Wyniki te sugerują, że w warunkach braku niedoboru tkanka tłuszczowa wykazuje ograniczoną wrażliwość na suplementację witaminą D, a wykryte zmiany mogą odzwierciedlać pośrednie adaptacje funkcji mitochondrialnych, które nie przekładają się na istotne zmiany transkryptomu.

6.2.4 Transkryptom oraz proteom wątroby

6.2.4.1 Transkryptom wątroby

W przypadku wątroby zaobserwowano istotnie więcej genów o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy grupami. W porównaniu grupy kontrolnej z grupą suplementowaną 5000 IU/kg paszy zidentyfikowano 12 DEG, z których wszystkie wykazywały obniżoną ekspresję w grupie suplementowanej. W porównaniu grupy kontrolnej z grupą suplementowaną 10 000 IU/kg paszy wykryto 109 DEG, w tym 101 o obniżonej i 8 o podwyższonej ekspresji w grupie

suplementowanej. W porównaniu pomiędzy grupami suplementowanymi nie stwierdzono genów o zróżnicowanej ekspresji.

Dla dalszej interpretacji zmian funkcjonalnych, przeprowadzono analizę wzbogacenia zestawów genów o zróżnicowanej ekspresji przy użyciu oprogramowania STRING. W porównaniu grupy kontrolnej z grupą suplementowaną 5000 IU/kg paszy, wzbogacenie dotyczyło szlaków biologicznych związanych z m.in.:

- metabolizmem kwasów tłuszczowych (FDR = 0,0317, strength = 1,89),
- degradacją kwasów tłuszczowych (FDR = 0,0317, strength = 2,01),
- degradacją aminokwasów rozgałęzionych (FDR = 0,0317, strength = 1,93),
- oraz szlakiem sygnalizacji PPAR (FDR = 0,0392, strength = 1,75).

W porównaniu grupy kontrolnej z grupą suplementowaną 10 000 IU/kg paszy analiza genów o obniżonej ekspresji wykazała istotne zmiany w m.in. następujących procesach biologicznych:

- metabolizm kwasów tłuszczowych (FDR = 0,0013, strength = 1,37),
- degradacja kwasów tłuszczowych (FDR = 0,0032, strength = 1,39),
- funkcjonowanie peroksysomów (FDR = 0,0032, strength = 1,17),
- degradacja aminokwasów rozgałęzionych (FDR = 0,0490, strength = 1,19),
- oraz szlak sygnalizacji PPAR (FDR = 0,0162, strength = 1,14).

Analiza ekspresji genów metodą qPCR wykazała, że w porównaniu do grupy kontrolnej, w grupach suplementowanych obserwowano istotne obniżenie ekspresji dla kilku genów: *HADHA* ($p = 0,003$), *APOA4* ($p = 0,006$), *ACSL5* ($p = 0,019$) oraz *CRAT* ($p = 0,028$). W przypadku genu *LDHB* również odnotowano obniżenie ekspresji względem grupy kontrolnej, przy granicznej istotności statystycznej ($p = 0,050$).

Dla pozostałych genów – *HMGCS2*, *TMLHE*, *AKR1D1*, *GC*, *VDR* oraz *ACADM* – nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie ekspresji pomiędzy grupami ($p > 0,05$), choć w przypadku *HMGCS2* ($p = 0,072$) i *TMLHE* ($p = 0,075$) zaobserwowano trend w kierunku obniżonej ekspresji w grupach suplementowanych względem grupy kontrolnej.

6.2.4.2 Proteom wątroby

Analiza żeli 2D dla próbek wątroby pozwoliła na wykrycie 662 spotów białkowych. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotne statystycznie różnice

w intensywności 26 spotów pomiędzy grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi ($p < 0,05$). Z wykorzystaniem spektrometrii masowej LC-MS zidentyfikowano 13 spotów białkowych. W przypadku trzech spotów stwierdzono obecność dwóch współmigrujących białek.

Dla zidentyfikowanych białek przeprowadzono analizę funkcjonalną z użyciem oprogramowania STRING, a wzbogacone procesy dotyczyły m.in.:

- β -oksydacji kwasów tłuszczowych (FDR = 0,018, strength = 1,76),
- metabolizmu kwasów karboksylowych (FDR = $2,17 \times 10^{-5}$; strength = 1,19),
- katabolizmu małych cząsteczek (FDR = $9,2 \times 10^{-4}$; strength = 1,28),
- metabolizmu glutationu (FDR = 0,018, strength = 1,76),
- detoksykacji oksydacyjnej (FDR = 0,041, strength = 1,58),

co sugeruje zarówno zmiany w metabolizmie energetycznym jak i aktywację mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym.

Za pomocą analizy Western blot potwierdzono obniżony poziom dwóch kluczowych białek zaangażowanych w szlak β -oksydacji u zwierząt z grup suplementowanych w porównaniu do grupy kontrolnej - HADHA – zidentyfikowanego wcześniej w analizie transkryptomicznej (NGS), oraz ACADM – zidentyfikowanego w analizie proteomicznej (2D-gel).

Dodatkowo przeanalizowano poziom białka CRP, dla którego zaobserwowano trend wzrostowy wraz ze wzrostem dawki suplementacji, jednak bez osiągnięcia istotności statystycznej ($p = 0,09$).

Szczegółowe dane dotyczące analiz transkryptomicznych oraz proteomicznych dostępne są w Publikacji 3.

6.2.4.3 Wpływ wysokich dawek witaminy D₃ na metabolizm wątroby – interpretacja wyników omicznych

Nasze badanie wykazało, że wysokie dawki witaminy D₃ prowadzą do istotnych zmian w metabolizmie wątroby, szczególnie w zakresie degradacji kwasów tłuszczowych, procesów oksydacyjnych oraz potencjalnie regulacji stresu oksydacyjnego.

Dotychczasowe prace sugerują, że witamina D może wpływać na szereg procesów biologicznych w wątrobie. Na przykład badania *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich organoidów wątrobowych wykazały, że kalcytriol (1,25(OH)₂D) aktywuje szlaki zależne od

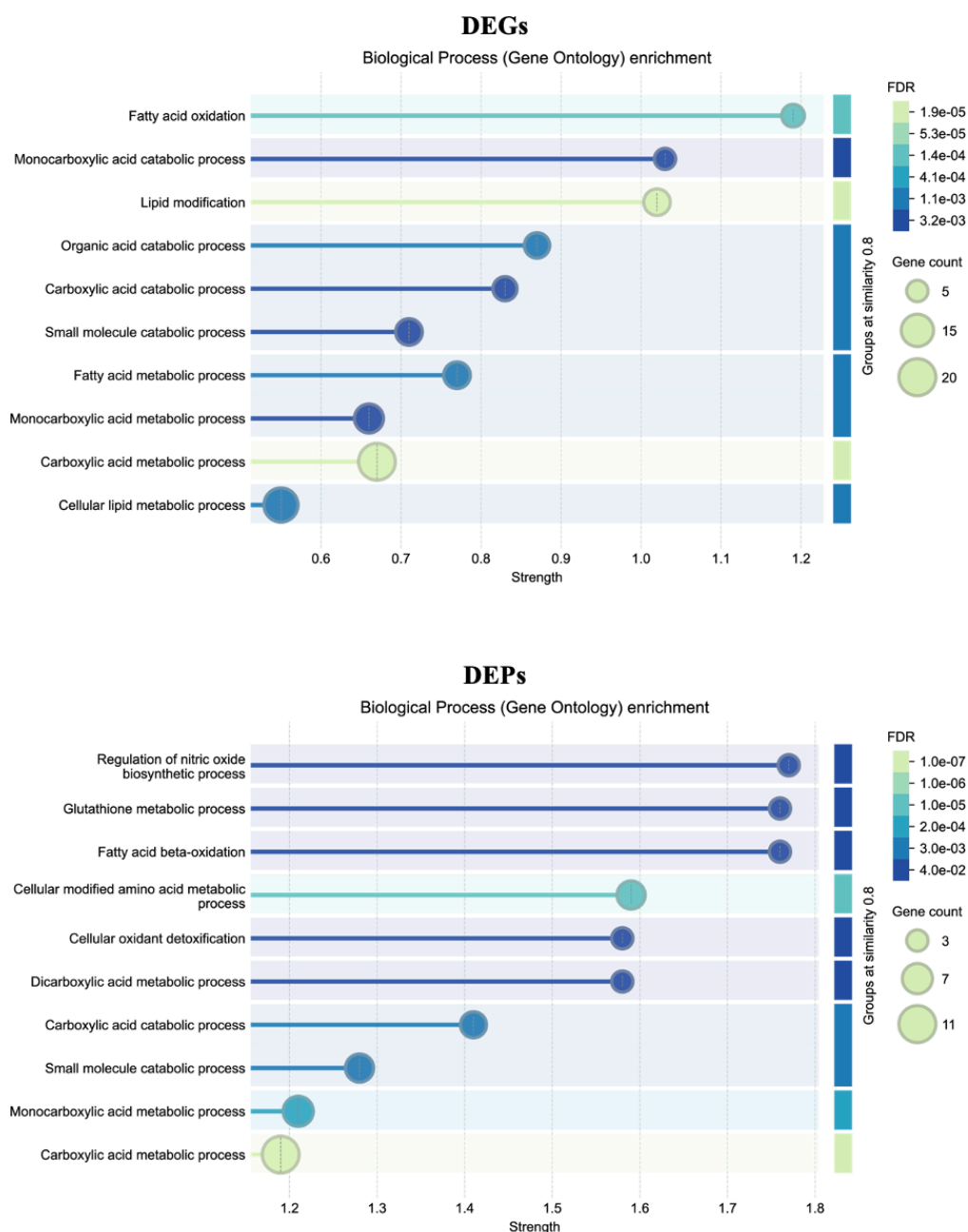
receptora VDR, promując różnicowanie hepatoblastów oraz przesuwając metabolizm w kierunku glikolizy poprzez aktywację HIF-1 i szlaku PI3K-AKT (L. Zhang et al., 2024). U świń ekspozycja na promieniowanie UVB, prowadząca do endogennej syntezy witaminy D, skutkowała zmianą ekspresji genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych, biosyntezą cholesterolu oraz steroidów (Hasan et al., 2024). Natomiast u szczurów, długoterminowa suplementacja witaminy D₃ (do 5000 IU/kg) wykazywała jedynie niewielkie zmiany transkrypcyjne, choć analiza GSEA wskazywała na istotną modulację szlaków związanych ze stresem oksydacyjnym, metalotioneinami i stanem zapalnym (Oczkowicz et al., 2024). Z kolei nieliczne dostępne dane proteomiczne, m.in. praca Walkera, wykazały wpływ witaminy D na ekspresję fetuiny B (FETUB) – hepatokiny powiązanej z zaburzeniami metabolicznymi (Walker et al., 2018).

Nasze wyniki poszerzają ten obraz, ukazując wyraźny wpływ wysokich dawek witaminy D₃ na metabolizm lipidów w wątrobie. Chociaż liczba genów o istotnie zmienionej ekspresji była stosunkowo mała (12 dla 5000 IU/kg i 109 dla 10 000 IU/kg), wartości log₂FC były wysokie, co sugeruje silny, kierunkowy wpływ na metabolizm. Obie dawki oddziaływały na zbliżone procesy biologiczne, obejmujące katabolizm aminokwasów, metabolizm kwasów tłuszczowych, butanianu i propanianu, a także szlaki sygnałowe z udziałem receptorów PPAR. Wszystkie te ścieżki zbiegają się w cyklu TCA, wykorzystując jako substraty acetylo-CoA i propionilo-CoA, pochodzące z rozkładu aminokwasów rozgałęzionych i kwasów tłuszczowych (Kersten et al., 2001; Reddy & Sambasiva Rao, 2006).

Dane proteomiczne częściowo potwierdziły wyniki transkryptomiczne. Zidentyfikowano białka związane z m.in. z β -oksydacją kwasów tłuszczowych, metabolizmem kwasów karboksylowych i kwasów tłuszczowych czy detoksykacją oksydacyjną. Podczas gdy na poziomie mRNA dominowała tendencja do obniżenia ekspresji, odpowiedź proteomiczna była bardziej zrównoważona, co może wynikać z różnic w stabilności cząsteczek i czasowym charakterze regulacji transkrypcyjnej i translacyjnej. Dodatkowo, efekt ten może być częściowo związany z modyfikacjami potranslacyjnymi, jak wykazano np. dla enzymu HADHA w warunkach nadmiaru składników odżywczych (Y. Zhang et al., 2019).

Szczególnie istotnym wynikiem naszego badania była spójna obniżona ekspresja kluczowych genów i poziomu białek uczestniczących w szlaku β -oksydacji kwasów tłuszczowych (FAO), takich jak *ACSL5*, *ACADVL*, *HADHA*, *ACAA1* (geny) oraz *ACADM*, *ECHDC1* i *ECHDC2* (białka). FAO jest podstawowym szlakiem katabolicznym, odpowiedzialnym za rozkład kwasów tłuszczowych do acetylo-CoA, który następnie zasila cykl kwasu cytrynowego (TCA), prowadząc do produkcji energii w postaci ATP. Proces ten odgrywa kluczową rolę

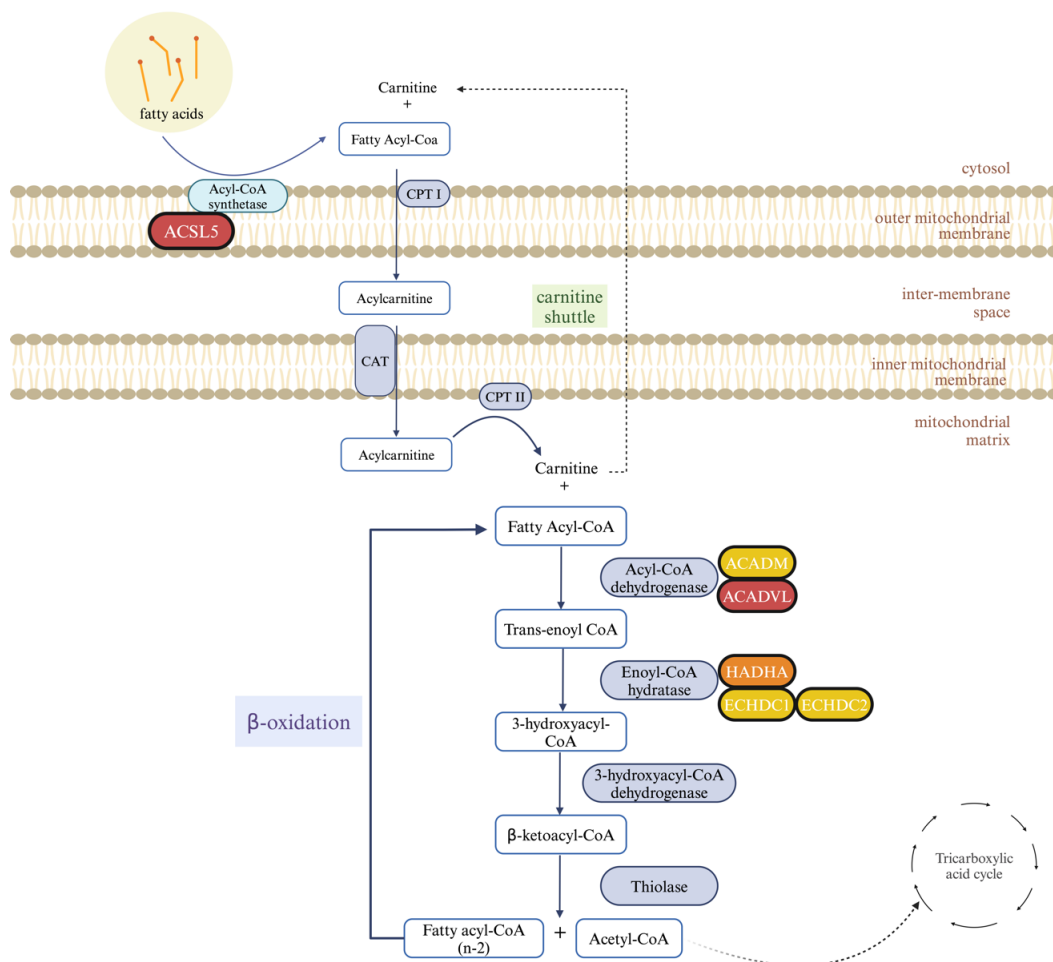
w homeostazie energetycznej wątroby, zwłaszcza w stanach postu, kiedy to kwasy tłuszczowe stają się głównym źródłem energii (Houten et al., 2016).



Rys. 3. Analiza funkcjonalna białek różnicowo ekspresowanych (DEP) uzyskanych z eksperymentu 2D-gel oraz genów różnicowo ekspresowanych (DEG) z analizy NGS. Analiza została przeprowadzona za pomocą oprogramowania STRING.

Obniżona ekspresja *ACSL5* może świadczyć o zaburzonej aktywacji długocuchowych kwasów tłuszczowych do estrów acylo-CoA, natomiast spadek poziomu *ACADVL* sugeruje ograniczenie w początkowym etapie ich utleniania. Warto podkreślić, że jest stałe obniżenie ekspresji *HADHA* – kodującego podjednostkę α mitochondrialnego białka trifunkcyjnego,

kluczowego dla β -oksydacji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych – zaobserwowane zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Dodatkowo, zmniejszenie poziomu białka ACADM wskazuje na zaburzenia w utlenianiu średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych.



Rys. 4. Uproszczony schemat szlaku β -oksydacji w mitochondrium. Kwasy tłuszczowe są najpierw aktywowane w cytoplazmie przez syntetazę acylo-CoA, a następnie transportowane do macierzy mitochondrialnej za pomocą układu karnitynowego. Po wejściu do macierzy, β -oksydacja przebiega poprzez serię reakcji enzymatycznych, prowadząc ostatecznie do powstania acetylo-CoA, który wchodzi do cyklu kwasu cytrynowego (TCA) w celu dalszej produkcji energii.

(CPT I) – karnityno-palmitoilotransferaza I; (CAT) – translokaza karnityna–acylo–karnityna; (CPT II) – karnityno-palmitoilotransferaza II.

Geny lub białka, których ekspresja różniła się pomiędzy grupami suplementowanymi różnymi dawkami witaminy D, zostały zaznaczone kolorem czerwonym (zmiany na poziomie genu), pomarańczowym (zmiany na poziomie genu i białka) lub żółtym (zmiany na poziomie białka). Związki te należą do rodzin białkowych o wskazanych po lewej stronie funkcjach enzymatycznych i są specyficzne dla szlaku β -oksydacji.

Łącznie, te zmiany sugerują ograniczoną zdolność wątroby do utleniania kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha, co może negatywnie wpływać na produkcję energii i homeostazę metaboliczną (Reddy & Sambasiva Rao, 2006). Wspomniane geny pełnią swoją funkcję przede wszystkim w mitochondriach, natomiast jednym z DEGs był gen *ACAA1*, kodujący enzym

uczestniczący w końcowym etapie peroksysomalnej β -oksydacji, istotnym szczególnie w metabolizmie bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (VLCFA, z ang. very long chain fatty acids). W procesie peroksysomalnej β -oksydacji dochodzi do skrócenia łańcuchów tych kwasów tłuszczowych, umożliwiając ich dalsze utlenianie w mitochondriach.

Ostatnie badania *in vitro* dostarczają dodatkowych dowodów na to, że witamina D może modulować ekspresję genów związanych z β -oksydacją kwasów tłuszczowych. Na przykład, Mendoza i wsp. Wykazali *in vitro*, że laktonowy metabolit witaminy D₃ wiąże się specyficznie z białkiem HADHA (Mendoza et al., 2022). Co istotne, interakcja ta nie wpływa bezpośrednio na aktywność enzymatyczną HADHA, lecz ogranicza biosyntezę karnityny – kluczowego składnika niezbędnego do transportu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do mitochondriów, gdzie zachodzi ich β -oksydacja. Podobnie, nasze doświadczenie *in vivo* sugeruje, że akumulacja metabolitów witaminy D może zaburzać funkcje HADHA, prowadząc do osłabienia zdolności do β -oksydacji. Jednak o ile wcześniejsze dane wskazywały, że efekt ten wynika głównie ze zmniejszonej dostępności karnityny, nasze wyniki sugerują również możliwość bezpośredniego wpływu metabolitów witaminy D na poziom ekspresji genów i białek kluczowych enzymów tego szlaku. Warto dodać, że obserwowane efekty, mogą nie być zależne od klasycznego szlaku sygnalizacji receptora witaminy D, jako że nie zaobserwowaliśmy istotnych statystycznie zmian w ekspresji *VDR* pod wpływem suplementacji.

Zauważone zaburzenia w szlaku β -oksydacji wskazują na osłabienie zdolności wątroby do utleniania kwasów tłuszczowych, co może skutkować akumulacją lipidów i zaburzeniem równowagi energetycznej (Amaral & Wajner, 2020; Houten et al., 2016). W przypadku wątroby może sprzyjać to rozwojowi stłuszczenia oraz niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD) (Amaral & Wajner, 2020; Heeren & Scheja, 2021; T. Zhang et al., 2023).

W naszym badaniu wykazano również wzbogacenie szlaku sygnalizacji przez receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR). PPAR to jądrowe czynniki transkrypcyjne odgrywające kluczową rolę w regulacji metabolizmu wątroby i utrzymaniu równowagi energetycznej. Ponadto, obserwowane obniżenie ekspresji genów takich jak *ACSL5* (aktywacja kwasów tłuszczowych), *ACAA1* (peroksysomalna β -oksydacja), *HMGCS2* (ketogeneza) oraz *PLIN5* (regulacja kropli lipidowych) może wskazywać na zaburzoną transkrypcyjną kontrolę szlaku receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów. Osłabienie sygnalizacji PPAR może dodatkowo sprzyjać nadmiernemu gromadzeniu lipidów i uszkodzeniom oksydacyjnym (Kersten et al., 2001; Reddy & Sambasiva Rao, 2006). Warte podkreślenia jest również obniżenie poziomu białek antyoksydacyjnych, takich jak *PRDX2*

i GSTA1, co może świadczyć o nasilonym stresie oksydacyjnym. Oba procesy – zaburzenia degradacji lipidów i stres oksydacyjny – mogą wzajemnie się nasilać, tworząc mechanizm błędnego koła pogłębiającego zaburzenia metaboliczne w warunkach nadmiernej suplementacji witaminą D₃. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami, stres oksydacyjny może hamować ekspresję genów FAO i prowadzić do akumulacji kwasów tłuszczowych (Sun et al., 2020). Zaś niewykorzystane kwasy tłuszczowe mogą być przekierowywane do szlaku ω -oksydacji, w wyniku czego powstają dikarboksylowe kwasy tłuszczowe, które zaburzają funkcjonowanie mitochondriów, zwiększają produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) i nasilają peroksydację lipidów (Ding et al., 2013). Należy jednak zaznaczyć, że w niniejszym badaniu nie analizowano bezpośrednich markerów stresu oksydacyjnego, takich jak poziom ROS, produkty peroksydacji lipidów czy aktywność enzymów antyoksydacyjnych. W związku z tym, na podstawie samych zmian w poziomie wybranych białek nie można jednoznacznie stwierdzić, że w warunkach eksperymentu doszło do stresu oksydacyjnego.

Podsumowując, wyniki uzyskane w analizach transkryptomicznych i proteomicznych wskazują na konsekwentną represję procesu β -oksydacji w wątrobie, a więc upośledzenie katabolizmu lipidów oraz wystąpienie stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na wysoką suplementację witaminą D₃. Taki fenotyp przypomina wzorce obserwowane w modelach nadmiaru składników odżywczych oraz w analizach acetylomu, m.in. u bydła mlecznego, gdzie szlaki, które były zmienione również w naszym badaniu jak FAO, cykl kwasu cytrynowego (TCA), metabolizm propionianu, fosforylacja oksydacyjna oraz sygnalizacja PPAR – były powiązane z rozwojem zaburzeń gospodarki lipidowej w wątrobie (Le-tian et al., 2020).

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że suplementacja witaminy D zazwyczaj wykazywała działanie ochronne w kontekście chorób wątroby, jednak efekty te najczęściej obserwowano u pacjentów z wyjściowym niedoborem tej witaminy i w kontekście łagodzenia istniejących już zaburzeń wątrobowych (Rizzo et al., 2023). W świetle tego, nasze dane – uzyskane na zdrowych świniach, bez niedoboru witaminy D – stawiają istotne pytania o bezpieczeństwo stosowania wysokich dawek suplementacji i wskazują na potrzebę dalszych badań nad ich wpływem na metabolizm wątroby. Co istotne, wyniki te wskazują, że wysokie dawki witaminy D mogą prowadzić do słabo poznanych zaburzeń metabolicznych, niezwiązanych z klasycznie rozumianą toksycznością, która zwykle utożsamiana jest z hiperkalcemią.

7 Wnioski

Celem badania było określenie wpływu wysokich dawek witaminy D w diecie świń na parametry produkcyjne, zdrowotne oraz na poziomie molekularnym na tkanki wątroby, mięśnia oraz tłuszczu. Wyniki sugerują, że:

- Długotrwała suplementacja diety świń wysokimi dawkami witaminy D nie miała wpływu na podstawowe parametry produkcyjne, takie jak przyrost masy ciała czy pobór paszy.
- Zaobserwowano zmiany w parametrach biochemicznych krwi, w tym podwyższenie poziomu ALT i LDH w grupie otrzymującej 5000 IU/kg paszy, a także zwiększone stężenie wapnia w nerkach, co może świadczyć o potencjalnie niekorzystnym wpływie wysokich dawek witaminy D na wybrane narządy i funkcje metaboliczne.
- Istnieje możliwość biofortyfikacji produktów odzwierzęcych, takich jak schab czy słonina, w witaminę D poprzez suplementację diety świń tym związkiem. Jednak uzyskane stężenia są niewystarczające, aby uznać wzbogaconą wieprzowinę za efektywne źródło tej witaminy w kontekście zapobiegania niedoborom.
- Długotrwała suplementacja diety świń witaminą D₃ w dawkach 5000 IU/kg oraz 10 000 IU/kg paszy wywiera niewielki wpływ na profil transkryptomiczny mięśni i tkanki tłuszczowej.
- Zjawisko plateau, obserwowane w poziomach 25(OH)D w surowicy, sugeruje istnienie limitu efektywności suplementacji przy bardzo wysokich dawkach.
- Długotrwała suplementacja diety świń witaminą D₃ w dawkach 5000 IU/kg oraz 10 000 IU/kg paszy wpływa na transkryptom wątroby, przede wszystkim poprzez modulację szlaków związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych.
- Zmiany zaobserwowane na poziomie transkryptomu w wątrobie znajdują swoje odzwierciedlenie w zmianach w proteomie, co potwierdza spójność między regulacją ekspresji genów a produkcją białek.

- Suplementacja wysokimi dawkami witaminy D₃ u zdrowych zwierząt, bez wyjściowego niedoboru, może prowadzić do zaburzeń w metabolizmie lipidów w wątrobie, objawiających się represją szlaku β -oksydacji kwasów tłuszczowych, osłabieniem sygnalizacji PPAR oraz nasileniem stresu oksydacyjnego.
- Suplementacja wysokimi dawkami witaminy D₃ może wywoływać nieoczywiste, potencjalnie niekorzystne efekty metaboliczne, które nie są związane z klasycznie opisywaną hiperkalcemią, co skłania do ostrożnego podejścia do takich interwencji żywieniowych i wskazują na potrzebę dalszych badań nad bezpieczeństwem suplementacji.

8 Ograniczenia pracy oraz przyszłe badania

Niniejsze badanie dostarcza nowych danych dotyczących wpływu wysokich dawek witaminy D₃ na organizm zdrowych świń, jednak interpretacja uzyskanych wyników powinna uwzględniać pewne ograniczenia badań. Przede wszystkim, nie przeprowadzono oceny funkcjonalnej ani histologicznej tkanek, co ogranicza możliwość jednoznacznego powiązania obserwowanych zmian molekularnych z rzeczywistymi uszkodzeniami lub dysfunkcjami narządów takich jak wątroba, nerki czy mięśnie. Również brak oznaczeń klasycznych markerów stresu oksydacyjnego, takich jak poziom reaktywnych form tlenu (ROS), produkty peroksydacji lipidów czy aktywność enzymów antyoksydacyjnych, nie pozwala jednoznacznie potwierdzić sugerowanego na podstawie danych proteomicznych nasilenia stresu oksydacyjnego. Dodatkowo, badanie nie obejmowało analizy metabolomicznej, która mogłaby dostarczyć bezpośrednich informacji o skutkach metabolicznych zaobserwowanych zmian transkryptomicznych i proteomicznych, w tym dotyczących przemian lipidowych czy bilansu energetycznego.

Warto również zaznaczyć, że zastosowane w eksperymencie dawki witaminy D₃ (5000 i 10 000 IU/kg paszy) przekładają się na dzienne spożycie rzędu 11 400 – 24 000 IU, co skutkuje stężeniami 25(OH)D w surowicy sięgającymi 110 – 140 ng/mL. Wartości te istotnie przekraczają zakres uznawany za fizjologiczny i mieszczą się w przedziale, w którym w literaturze opisywano potencjalną toksyczność witaminy D. Choć istnieją badania wskazujące, że tak wysokie dawki a nawet wyższe, nie skutkowały objawami toksyczności. Należy jednak podkreślić, że obserwowane odpowiedzi mogą odzwierciedlać raczej farmakologiczne lub toksyczne efekty nadmiaru witaminy D niż jej działanie fizjologiczne.

W związku z powyższym, wyniki tego badania nie powinny być traktowane jako argument przeciwko stosowaniu standardowych dawek witaminy D.

Konieczne są dalsze badania, które pozwolą określić próg, przy którym suplementacja witaminą D₃ zaczyna wywierać niekorzystne skutki metaboliczne w warunkach braku niedoboru, a także dokładniej zrozumieć mechanizmy molekularne tych efektów oraz ich znaczenie kliniczne i fizjologiczne.

9 Bibliografia

Amaral, A. U., & Wajner, M. (2020). Recent Advances in the Pathophysiology of Fatty Acid Oxidation Defects: Secondary Alterations of Bioenergetics and Mitochondrial Calcium Homeostasis Caused by the Accumulating Fatty Acids. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.598976>

Amon, U., Yaguboglu, R., Ennis, M., Holick, M. F., & Amon, J. (2022). Safety Data in Patients with Autoimmune Diseases during Treatment with High Doses of Vitamin D3 According to the “Coimbra Protocol.” *Nutrients*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/nu14081575>

Appendix 3: Laboratory Reference Values: Biochemistry. (2002). In *Clinical Examination of Farm Animals* (pp. 303–305). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470752425.app3>

Artaza, J. N., & Norris, K. C. (2009). Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *The Journal of Endocrinology*, 200(2), 207–221. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0241>

Autier, P., Mullie, P., Macacu, A., Dragomir, M., Boniol, M., Coppens, K., Pizot, C., & Boniol, M. (2017). Effect of vitamin D supplementation on non-skeletal disorders: A systematic review of meta-analyses and randomised trials. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 5(12), 986–1004. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30357-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30357-1)

Babazadeh, D., Razavi, S. A., El-Ghany, W. A. A., & Cotter, P. F. (2022). Vitamin D Deficiency in Farm Animals: A Review. *Farm Animal Health and Nutrition*, 1(1), 10–16. <https://doi.org/10.58803/fahn.v1i1.7>

Barchetta, I., Cimini, F. A., & Cavallo, M. G. (2017). Vitamin D Supplementation and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Present and Future. *Nutrients*, 9(9), 1015. <https://doi.org/10.3390/nu9091015>

Beaudart, C., Buckinx, F., Rabenda, V., Gillain, S., Cavalier, E., Slomian, J., Petermans, J., Reginster, J.-Y., & Bruyère, O. (2014). The Effects of Vitamin D on Skeletal Muscle Strength, Muscle Mass, and Muscle Power: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(11), 4336–4345. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1742>

Bhattarai, H. K., Shrestha, S., Rokka, K., & Shakya, R. (2020). Vitamin D, Calcium, Parathyroid Hormone, and Sex Steroids in Bone Health and Effects of Aging. *Journal of Osteoporosis*, 2020, 9324505. <https://doi.org/10.1155/2020/9324505>

Bischoff-Ferrari, H. A., Dawson-Hughes, B., Willett, W. C., Staehelin, H. B., Bazemore, M. G., Zee, R. Y., & Wong, J. B. (2004). Effect of Vitamin D on falls: A meta-analysis. *JAMA*, 291(16), Article 16. <https://doi.org/10.1001/jama.291.16.1999>

Bitetto, D., Fabris, C., Fornasiere, E., Pipan, C., Fumolo, E., Cussigh, A., Bignulin, S., Cmet, S., Fontanini, E., Falletti, E., Martinella, R., Pirisi, M., & Toniutto, P. (2011). Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transplant*

International, 24(1), 43–50. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01141.x>

Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C., & Demay, M. (2008). Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), 726–776. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>

Burild, A., Lauridsen, C., Faqir, N., Sommer, H. M., & Jakobsen, J. (2016). Vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in pork and their relationship to vitamin D status in pigs. *Journal of Nutritional Science*, 5, e3. <https://doi.org/10.1017/jns.2015.28>

Capiati, D., Benassati, S., & Boland, R. L. (2002). 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86(1), 128–135. <https://doi.org/10.1002/jcb.10191>

Carlberg, C. (2022). Vitamin D and Its Target Genes. *Nutrients*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/nu14071354>

Christakos, S., Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A. J., & Mady, L. J. (2010). Vitamin D: Metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(2), 243–253, table of contents. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.02.002>

Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials, Board on Health Care Services, Board on Health Sciences Policy, & Institute of Medicine. (2012). *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward* (C. M. Micheel, S. J. Nass, & G. S. Omenn, Eds.). National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK202168/>

Cui, A., Zhang, T., Xiao, P., Fan, Z., Wang, H., & Zhuang, Y. (2023). Global and regional prevalence of vitamin D deficiency in population-based studies from 2000 to 2022: A pooled analysis of 7.9 million participants. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1070808>

Dahlquist, D. T., Dieter, B. P., & Koehle, M. S. (2015). Plausible ergogenic effects of vitamin D on athletic performance and recovery. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0093-8>

Daniel, D., Hardigan, Patrick, Bray, Natasha, Penzell, Dennis, & and Savu, C. (2015). The incidence of vitamin D deficiency in the obese: A retrospective chart review. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 5(1), 26069. <https://doi.org/10.3402/jchimp.v5.26069>

Dawson, H. D., Reece, J. J., & Urban, J. F. (2009). A comparative analysis of the porcine, murine, and human immune systems. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1), 309. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.211>

De Martinis, M., Allegra, A., Sirufo, M. M., Tonacci, A., Pioggia, G., Raggiunti, M., Ginaldi, L., & Gangemi, S. (2021). Vitamin D Deficiency, Osteoporosis and Effect on Autoimmune Diseases and Hematopoiesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8855. <https://doi.org/10.3390/ijms22168855>

Dietary Supplements Market: Trends, Opportunities, Challenges. MarketsandMarkets. Retrieved May 20, 2025, from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/dietary-supplements-market-973.html>

Ding, J., Loizides-Mangold, U., Rando, G., Zoete, V., Michielin, O., Reddy, J. K., Wahli, W., Riezman, H., & Thorens, B. (2013). The Peroxisomal Enzyme L-PBE Is Required to Prevent the Dietary Toxicity of Medium-Chain Fatty Acids. *Cell Reports*, 5(1), 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.032>

Du, T., Xiang, L., Zhang, J., Yang, C., Zhao, W., Li, J., Zhou, Y., & Ma, L. (2023). Vitamin D improves hepatic steatosis in NAFLD via regulation of fatty acid uptake and β -oxidation. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1138078. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1138078>

Duffy, S. K., O'Doherty, J. V., Rajauria, G., Clarke, L. C., Cashman, K. D., Hayes, A., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., & Kelly, A. K. (2017). Cholecalciferol supplementation of heifer diets increases beef vitamin D concentration and improves beef tenderness. *Meat Science*, 134, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.024>

Duffy, S. K., O'Doherty, J. V., Rajauria, G., Clarke, L. C., Hayes, A., Dowling, K. G., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., Jakobsen, J., Cashman, K. D., & Kelly, A. K. (2018). Vitamin D-biofortified beef: A comparison of cholecalciferol with synthetic versus UVB-mushroom-derived ergosterol as feed source. *Food Chemistry*, 256, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.099>

Dursun, E., & Gezen-Ak, D. (2017). Vitamin D receptor is present on the neuronal plasma membrane and is co-localized with amyloid precursor protein, ADAM10 or Nicastrin. *PLoS ONE*, 12(11), e0188605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188605>

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2016). Dietary reference values for vitamin D. *EFSA Journal*, 14(10), e04547. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4547>
Fatehi-Hassanabad, Z., & Chan, C. B. (2005). Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: A key determinant of pancreatic β -cell function. *Nutrition & Metabolism*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-1>

Gascon-Barré, M., Demers, C., Mirshahi, A., Néron, S., Zalzal, S., & Nanci, A. (2003). The Normal Liver Harbors the Vitamin D Nuclear Receptor in Nonparenchymal and Biliary Epithelial Cells. *Hepatology*, 37(5), 1034. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50176>
Grant, W. B., Wimalawansa, S. J., Pludowski, P., & Cheng, R. Z. (2025). Vitamin D: Evidence-Based Health Benefits and Recommendations for Population Guidelines. *Nutrients*, 17(2), 277. <https://doi.org/10.3390/nu17020277>

Guo, X., Wang, C., Yang, T., Li, S., Li, K., & Li, D. (2020). Vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & Function*, 11(9), 7389–7399. <https://doi.org/10.1039/D0FO01095B>

Hangelbroek, R. W. J., Vaes, A. M. M., Boekschoten, M. V., Verdijk, L. B., Hooiveld, G. J. E. J., van Loon, L. J. C., de Groot, L. C. P. G. M., & Kersten, S. (2019). No effect of 25-hydroxyvitamin D supplementation on the skeletal muscle transcriptome in vitamin D deficient frail older adults. *BMC Geriatrics*, 19(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12877-019->

- Hariri, M., & Zohdi, S. (2019). Effect of Vitamin D on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. *International Journal of Preventive Medicine*, 10(1), 14. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_499_17
- Hasan, M., Reyer, H., Oster, M., Trakooljul, N., Ponsuksilli, S., Magowan, E., Fischer, D.-C., & Wimmers, K. (2024). Exposure to artificial ultraviolet-B light mediates alterations on the hepatic transcriptome and vitamin D metabolism in pigs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 236, 106428. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106428>
- Hassan-Smith, Z. K., Hewison, M., & Gittoes, N. J. (2017). Effect of vitamin D deficiency in developed countries. *British Medical Bulletin*, 122(1), 79–89. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx005>
- Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., & Norman, A. W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 543–559. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.010>
- Heeren, J., & Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Molecular Metabolism*, 50, 101238. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>
- Hengist, A., Perkin, O., Gonzalez, J. T., Betts, J. A., Hewison, M., Manolopoulos, K. N., Jones, K. S., Koulman, A., & Thompson, D. (2019). Mobilising vitamin D from adipose tissue: The potential impact of exercise. *Nutrition Bulletin*, 44(1), 25–35. <https://doi.org/10.1111/nbu.12369>
- Hii, C. S., & Ferrante, A. (2016). The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*, 8(3), 135. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 357(3), 266–281. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
- Holick, M. F. (2011). Vitamin D: A d-lightful solution for health. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 59(6), 872–880. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e318214ea2d>
- Holick, M. F. (2024). Revisiting Vitamin D Guidelines: A Critical Appraisal of the Literature. *Endocrine Practice*, 30(12), 1227–1241. <https://doi.org/10.1016/j.eprac.2024.10.011>
- Houten, S. M., Violante, S., Ventura, F. V., & Wanders, R. J. A. (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 23–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
- Iijima, K., Sakamoto, R., Tsutsumi, R., Nakaya, N., Hirokawa, T., Odagi, M., Sakaki, T., Yasuda, K., & Nagasawa, K. (2024). Discovery and Structural Analysis of Metabolites of Vitamin D $_3$ Lactones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 72(10), 899–908. <https://doi.org/10.1248/cpb.c24-00495>

- Jones, G. (2008). Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2), 582S-586S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.582S>
- Kersten, S., Mandard, S., Escher, P., Gonzalez, F. J., Tafuri, S., Desvergne, B., & Wahli, W. (2001). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(11), 1971–1978. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0147com>
- Kimball, S. M., Mirhosseini, N., & Holick, M. F. (2017). Evaluation of vitamin D3 intakes up to 15,000 international units/day and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations up to 300 nmol/L on calcium metabolism in a community setting. *Dermato-Endocrinology*, 9(1), e1300213. <https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1300213>
- Larson-Meyer, D. E., Ingold, B. C., Fensterseifer, S. R., Austin, K. J., Wechsler, P. J., Hollis, B. W., Makowski, A. J., & Alexander, B. M. (2017). Sun exposure in pigs increases the vitamin D nutritional quality of pork. *PLOS ONE*, 12(11), e0187877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187877>
- Lauridsen, C. (2014). TRIENNIAL GROWTH SYMPOSIUM— Establishment of the 2012 vitamin D requirements in swine with focus on dietary forms and levels of vitamin D1. *Journal of Animal Science*, 92(3), 910–916. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7201>
- Lee, M.-J. (2025). Vitamin D Enhancement of Adipose Biology: Implications on Obesity-Associated Cardiometabolic Diseases. *Nutrients*, 17(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu17030586>
- Le-tian, Z., Cheng-zhang, H., Xuan, Z., Zhang, Q., Zhen-gui, Y., Qing-qing, W., Sheng-xuan, W., Zhong-jin, X., Ran-ran, L., Ting-jun, L., Zhong-qu, S., Zhong-hua, W., & Ke-rong, S. (2020). Protein acetylation in mitochondria plays critical functions in the pathogenesis of fatty liver disease. *BMC Genomics*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06837-y>
- Li, B., Cai, S.-Y., & Boyer, J. L. (2021). The role of the retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166085>
- Marcinowska-Suchowierska, E., Kupisz-Urbańska, M., Łukaszkiwicz, J., Płudowski, P., & Jones, G. (2018). Vitamin D Toxicity—A Clinical Perspective. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00550>
- McCullough, P. J., Lehrer, D. S., & Amend, J. (2019). Daily oral dosing of vitamin D3 using 5000 TO 50,000 international units a day in long-term hospitalized patients: Insights from a seven year experience. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 189, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.12.010>
- Mendoza, A., Takemoto, Y., Cruzado, K. T., Masoud, S. S., Nagata, A., Tantipanjanorn, A., Okuda, S., Kawagoe, F., Sakamoto, R., Odagi, M., Mototani, S., Togashi, M., Kawatani, M., Aono, H., Osada, H., Nakagawa, H., Higashi, T., Kittaka, A., Nagasawa, K., & Uesugi, M. (2022). Controlled lipid β -oxidation and carnitine biosynthesis by a vitamin D metabolite. *Cell Chemical Biology*, 29(4), 660-669.e12. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.08.008>

- Miao, Z., Wang, S., Wang, Y., Guo, L., Zhang, J., Liu, Y., & Yang, Q. (2020). A Potential Linking between Vitamin D and Adipose Metabolic Disorders. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 2656321. <https://doi.org/10.1155/2020/2656321>
- Mølmen, K. S., Hammarström, D., Pedersen, K., Lian Lie, A. C., Steile, R. B., Nygaard, H., Khan, Y., Hamarsland, H., Koll, L., Hanestadhaugen, M., Eriksen, A. L., Grindaker, E., Whist, J. E., Buck, D., Ahmad, R., Strand, T. A., Rønnestad, B. R., & Ellefsen, S. (2021). Vitamin D3 supplementation does not enhance the effects of resistance training in older adults. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12688>
- Montenegro, K. R., Cruzat, V., Carlessi, R., & Newsholme, P. (2019). Mechanisms of vitamin D action in skeletal muscle. *Nutrition Research Reviews*, 32(2), 192–204. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000064>
- Mutt, S. J., Hyppönen, E., Saarnio, J., Järvelin, M.-R., & Herzig, K.-H. (2014). Vitamin D and adipose tissue—More than storage. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00228>
- Nimitphong, H., Park, E., & Lee, M.-J. (2020). Vitamin D regulation of adipogenesis and adipose tissue functions. *Nutrition Research and Practice*, 14(6), 553. <https://doi.org/10.4162/nrp.2020.14.6.553>
- NRC. (2012). *Nutrient Requirements of Swine*. National Academies Press.
- Oczkowicz, M., Szymczyk, B., Świątkiewicz, M., Furgał-Dzierżuk, I., Koseniuk, A., Wierzbička, A., & Steg, A. (2021). Analysis of the effect of vitamin D supplementation and sex on Vdr, Cyp27r1 and Cyp27b1 gene expression in Wistar rats' tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 212, 105918. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105918>
- Oczkowicz, M., Szymczyk, B., Świątkiewicz, M., Wierzbička, A., Steg, A., & Szmatoła, T. (2024). Effect of vitamin D3 supplementation on blood parameters and liver gene expression in female rats. *Molecular Biology Reports*, 51. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09408-6>
- Office of Dietary Supplements—Vitamin D. (n.d.). Retrieved July 9, 2025, from <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>
- Park, C. Y., & Han, S. N. (2021). The Role of Vitamin D in Adipose Tissue Biology: Adipocyte Differentiation, Energy Metabolism, and Inflammation. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, 10(2), 130–144. <https://doi.org/10.12997/jla.2021.10.2.130>
- Pasing, Y., Fenton, C. G., Jorde, R., & Paulssen, R. H. (2017). Changes in the human transcriptome upon vitamin D supplementation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 173, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.016>
- Pludowski, P., Takacs, I., Boyanov, M., Belaya, Z., Diaconu, C. C., Mokhort, T., Zherdova, N., Rasa, I., Payer, J., & Pilz, S. (2022). Clinical Practice in the Prevention, Diagnosis and Treatment of Vitamin D Deficiency: A Central and Eastern European Expert Consensus Statement. *Nutrients*, 14(7), 1483. <https://doi.org/10.3390/nu14071483>

Potter, J. J., Liu, X., Koteish, A., & Mezey, E. (2013). 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human $\alpha 1(I)$ collagen expression and type I collagen formation. *Liver International*, 33(5), 677–686. <https://doi.org/10.1111/liv.12122>

Reddy, J. K., & Sambasiva Rao, M. (2006). Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(5), G852–G858. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00521.2005>

Rizzo, M., Colletti, A., Penson, P. E., Katsiki, N., Mikhailidis, D. P., Toth, P. P., Gouni-Berthold, I., Mancini, J., Marais, D., Moriarty, P., Ruscica, M., Sahebkar, A., Vinereanu, D., Cicero, A. F. G., Banach, M., Acosta, J., Al-Khnifsawi, M., Alnouri, F., Amar, F., ... Zirlik, A. (2023). Nutraceutical approaches to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A position paper from the International Lipid Expert Panel (ILEP). *Pharmacological Research*, 189, 106679. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106679>

SACN vitamin D and health report. (2023, December 11). GOV.UK. <https://www.gov.uk/government/publications/sacn-vitamin-d-and-health-report>

Savić, Z., Milic, N., Nićiforović, D., Damjanov, D., Pellicano, R., Medic-Stojanoska, M., & Abenavoli, L. (2018). Vitamin D supplementation in patients with alcoholic liver cirrhosis: A prospective study. *Minerva Medica*, 109. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.18.05723-3>

Schmid, A., & Walther, B. (2013). Natural Vitamin D Content in Animal Products. *Advances in Nutrition*, 4(4), 453–462. <https://doi.org/10.3945/an.113.003780>

Seuter, S., Virtanen, J. K., Nurmi, T., Pihlajamäki, J., Mursu, J., Voutilainen, S., Tuomainen, T.-P., Neme, A., & Carlberg, C. (2017). Molecular evaluation of vitamin D responsiveness of healthy young adults. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 174, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.003>

Shirvani, A., Kalajian, T. A., Song, A., & Holick, M. F. (2019). Disassociation of Vitamin D's Calcemic Activity and Non-calcemic Genomic Activity and Individual Responsiveness: A Randomized Controlled Double-Blind Clinical Trial. *Scientific Reports*, 9(1), 17685. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53864-1>

Smołucha, G., Steg, A., & Oczkowicz, M. (2024). The Role of Vitamins in Mitigating the Effects of Various Stress Factors in Pigs Breeding. *Animals*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ani14081218>

Steg, A., Oczkowicz, M., & Świątkiewicz, M. (2024). Effects of High-Dose Vitamin D3 Supplementation on Pig Performance, Vitamin D Content in Meat, and Muscle Transcriptome in Pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/jpn.14066>

Sun, R., Man, Z., Ji, J., Ji, S., Xu, K., Pu, Y., Yu, L., Zhang, J., Yin, L., & Pu, Y. (2020). L-Carnitine protects against 1,4-benzoquinone-induced apoptosis and DNA damage by suppressing oxidative stress and promoting fatty acid oxidation in K562 cells. *Environmental Toxicology*, 35(10), Article 10. <https://doi.org/10.1002/tox.22939>

Swindle, M. M., Makin, A., Herron, A. J., Clubb, F. J., & Frazier, K. S. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary Pathology*, 49(2), 344–356.

<https://doi.org/10.1177/0300985811402846>

Szymczak-Pajor, I., Miazek, K., Selmi, A., Balcerzyk, A., & Śliwińska, A. (2022). The Action of Vitamin D in Adipose Tissue: Is There the Link between Vitamin D Deficiency and Adipose Tissue-Related Metabolic Disorders? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 956. <https://doi.org/10.3390/ijms23020956>

Tabrizi, R., Moosazadeh, M., Lankarani, K. B., Akbari, M., Heydari, S. T., Kolahdooz, F., Samimi, M., & Asemi, Z. (2017). The effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles and liver function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 11, S975–S982. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.07.025>

Toda, T., Ito, M., Toda, Y., Smith, T., & Kummerow, F. (1985). Angiotoxicity in swine of a moderate excess of dietary vitamin D3. *Food and Chemical Toxicology*, 23(6), 585–592. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90183-8](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90183-8)

Tourkochristou, E., Mouzaki, A., & Triantos, C. (2023). Gene Polymorphisms and Biological Effects of Vitamin D Receptor on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms24098288>

Turer, C. B., Lin, H., & Flores, G. (2013). Prevalence of vitamin D deficiency among overweight and obese US children. *Pediatrics*, 131(1), e152-161. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1711>

Upadhaya, S. D., Chung, T. K., Jung, Y. J., & Kim, I. H. (2022). Dietary 25(OH)D3 supplementation to gestating and lactating sows and their progeny affects growth performance, carcass characteristics, blood profiles and myogenic regulatory factor-related gene expression in wean-finish pigs. *Animal Bioscience*, 35(3), 461–474. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0304>

Vieth, R. (2007). Vitamin D toxicity, policy, and science. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22 Suppl 2, V64-68. <https://doi.org/10.1359/jbmr.07s221>

Walker, G. E., Follenzi, A., Brusca, V., Manfredi, M., Bellone, S., Marengo, E., Maiuri, L., Prodam, F., & Bona, G. (2018). Fetuin B links vitamin D deficiency and pediatric obesity: Direct negative regulation by vitamin D. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 182, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.009>

Wang, H., Chen, W., Li, D., Yin, X., Zhang, X., Olsen, N., & Zheng, S. G. (2017). Vitamin D and Chronic Diseases. *Aging and Disease*, 8(3), 346–353. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.1021>

Wang, Y., Zhu, J., & DeLuca, H. F. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>
Warren, T., McAllister, R., Morgan, A., Rai, T. S., McGilligan, V., Ennis, M., Page, C., Kelly, C., Peace, A., Corfe, B. M., McAuley, M., & Watterson, S. (2021). The Interdependency and Co-Regulation of the Vitamin D and Cholesterol Metabolism. *Cells*,

10(8), 2007. <https://doi.org/10.3390/cells10082007>

Wierzbicka, A., Świątkiewicz, M., Tyra, M., Szmatoła, T., & Oczkiewicz, M. (2023). Effect of different doses of cholecalciferol and calcidiol on meat quality parameters and skeletal muscle transcriptome profiles in swine. *Meat Science*, 197, 109071. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109071>

Wilborn, B. S., Kerth, C. R., Owsley, W. F., Jones, W. R., & Frobish, L. T. (2004). Improving pork quality by feeding supranutritional concentrations of vitamin D3. *Journal of Animal Science*, 82(1), 218–224. <https://doi.org/10.2527/2004.821218x>

Yin, Y., Yu, Z., Xia, M., Luo, X., Lu, X., & Ling, W. (2012). Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(11), 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x>

Yoon, S., Kwon, O., & Kim, J. (2021). Vitamin D in athletes: Focus on physical performance and musculoskeletal injuries. *Physical Activity and Nutrition*, 25(2), Article 2. <https://doi.org/10.20463/pan.2021.0011>

Zhang, L., Wang, Z., Wang, X., Wei, L., Zhang, B., & Yang, L. (2024). Comparative proteomic exploration of plasma proteins in different levels of vitamin D with type 2 diabetes mellitus using iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 23(2), 2001–2010. <https://doi.org/10.1007/s40200-024-01456-w>

Zhang, L., Yang, M., & Piao, X. (2022). Effects of 25-hydroxyvitamin D3 on growth performance, serum parameters, fecal microbiota, and metabolites in weaned piglets fed diets with low calcium and phosphorus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(2), 597–606. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11388>

Zhang, T., Yu, Z., Hu, L., Zhang, C., Miao, H., Yang, R., Qi, M., Wu, B., & Huang, X. (2023). A Comprehensive LOVD Database for Fatty Acid Oxidation Disorders in Chinese Populations. *Human Mutation*, 2023(1), 5493978. <https://doi.org/10.1155/2023/5493978>

Zhang, Y., Zhou, F., Bai, M., Liu, Y., Zhang, L., Zhu, Q., Bi, Y., Ning, G., Zhou, L., & Wang, X. (2019). The pivotal role of protein acetylation in linking glucose and fatty acid metabolism to β -cell function. *Cell Death & Disease*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1349-z>

Żmijewski, M. A. (2022). Nongenomic Activities of Vitamin D. *Nutrients*, 14(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/nu14235104>

Zmijewski, M. A., & Carlberg, C. (2020). Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? *Experimental Dermatology*, 29(9), 876–884. <https://doi.org/10.1111/exd.14147>

Zumaraga, M. P., Medina, P. J., Recto, J. M., Abrahan, L., Azurin, E., Tanchoco, C. C., Jimeno, C. A., & Palmes-Saloma, C. (2017). Targeted next generation sequencing of the entire vitamin D receptor gene reveals polymorphisms correlated with vitamin D deficiency among older Filipino women with and without fragility fracture. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 41, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.12.003>

10 Oświadczenia współautorów oraz kopie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja 1: A. Steg, M. Oczkowicz, G. Smołucha, Omics as a tool to help determine the effectiveness of supplements, *Nutrients* (2022), 14(24), 5305;
<https://doi.org/10.3390/nu14245305>

Publikacja 2: A. Steg, M. Oczkowicz, M. Świątkiewicz, Effects of high-dose vitamin D₃ supplementation on pig performance, vitamin D content in meat, and muscle transcriptome in pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (2024), 109(2), 560-573;
<https://doi.org/10.1111/jpn.14066>

Publikacja 3: A. Steg, G. Smołucha, M. Świątkiewicz, M. Oczkowicz, Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (2025),
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2025.106835>

Oświadczenia współautorów dla :

Publikacja 1

Publikacja 2

Publikacja 3

Aneks rozprawy

Review

Omics as a Tool to Help Determine the Effectiveness of Supplements

Anna Steg , Maria Oczkowicz  and Grzegorz Smołucha 

Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice, Poland

* Correspondence: anna.steg@iz.edu.pl

Abstract: There has been considerable interest in dietary supplements in the last two decades. Companies are releasing new specifics at an alarming pace, while dietary supplements are one of the less-studied substances released for public consumption. However, access to state-of-the-art and high-throughput techniques, such as the ones used in omics, make it possible to check the impact of a substance on human transcriptome or proteome and provide answers to whether its use is reasonable and beneficial. In this review, the main domains of omics are briefly introduced. The review focuses on the three most widely used omics techniques: NGS, LC-MS, NMR, and their usefulness in studying dietary supplements. Examples of studies are described for some of the most commonly supplemented substances, such as vitamins: D, E, A, and plant extracts: resveratrol, green tea, ginseng, and curcumin extract. Techniques used in omics have proven to be useful in studying dietary supplements. NGS techniques are helpful in identifying pathways that change upon supplementation and determining polymorphisms or conditions that qualify for the necessity of a given supplementation. LC-MS techniques are used to establish the serum content of supplemented a compound and its effects on metabolites. Both LC-MS and NMR help establish the actual composition of a compound, its primary and secondary metabolites, and its potential toxicity. Moreover, NMR techniques determine what conditions affect the effectiveness of supplementation.

Keywords: omics; dietary supplements; vitamins; plant extracts



Citation: Steg, A.; Oczkowicz, M.; Smołucha, G. Omics as a Tool to Help Determine the Effectiveness of Supplements. *Nutrients* **2022**, *14*, 5305. <https://doi.org/10.3390/nu14245305>

Academic Editor: Roberto Iacone

Received: 25 October 2022

Accepted: 12 December 2022

Published: 14 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the last 20 years, the interest and use of dietary supplements have significantly increased [1]. Consequently, much research has been conducted on the benefits of these substances, and a huge number of companies producing them have been created. However, there are many problems and challenges associated with dietary supplements, the first of which is the definition itself. The law defines dietary supplements in part as products taken by mouth that contain a “dietary ingredient”. Dietary ingredients include vitamins, minerals, amino acids, herbs or botanicals, and other substances that can be used to supplement the diet [2]. This is a broad and general definition. In addition, several other categories of products among different countries, such as natural health products (NHPs), complementary medicines, or food supplements, also fit this definition [3]. Another challenge is that each country, even among those with similar cultures, has different regulations regarding dietary supplements, and the same substance/mixture in one country can be labeled as a dietary supplement while in another it is considered a controlled substance. This makes it difficult for scientists to conduct consistent research and for consumers to choose an effective and high-quality product.

Another problem is the existence of significantly different views about the testing and control of dietary supplements. It can roughly be distinguished between two extreme approaches. Some are in favor of treating supplements as drugs, which would allow for a thorough examination of effectiveness, side effects, and appropriate doses, while others

believe that supplements should be considered individually and less restrictively, which is due to, among others, the fact that the effects of many substances are assumed only on the basis of traditional knowledge [4]. Undoubtedly, corporations that produce supplements benefit from a large discrepancy, conflicting opinions, and the lack of uniform regulations. It is estimated that the supplement market in 2021 was worth USD 151.9 billion [5], and manufacturers are releasing new products at an alarming rate, sparing no money for marketing purposes [6]. This means that pharmacies and drugstores are full of easily accessible dietary supplements whose exact composition and potential effects have not been studied [7–11]. Those concerns are especially true with plant-derived supplements, which are the fastest growing segment of the supplements industry and face the biggest problems in terms of quality control and standardization [4,12,13]. All this indicates a very great need for scientific collaboration to overcome the aforementioned international problems [14,15]. Many state-of-the-art methods allow for a thorough examination of the ingredient identity, adulterants, and positive and negative impact of a given supplement on the body's functioning, determining the appropriate doses for specific social groups or interactions with other substances, as we wanted to demonstrate in this overview [16,17].

2. Fields Studying the Influence of Substances on Various Levels of Life Organization

Omics are the branches of science encompassing multiple molecular disciplines that aim to collectively characterize global sets of biological molecules, such as DNAs, RNAs, proteins, and metabolites [18]. Therefore, among omics, we can distinguish basic disciplines e.g., genomics, transcriptomics, proteomics, or metabolomics, and fields that intersect several approaches and examine interactions between different components such as nutritional genomics and microbiomics, pharmacogenomics, or foodomics.

2.1. Genomics

An entry point for other sciences is genomics, which is a field of science focusing on the collective characterization of a whole-genome of an organism, including interactions of genes with each other and with the environment. Genomics began to develop dynamically after the publication of the human genome sequence in 2001 [19,20]. Nowadays, genomics primarily uses modern, high-throughput DNA-sequencing techniques, microarrays, and bioinformatics. In the area of genomics, there can also be distinguished other omics disciplines such as transcriptomics (which studies the complete set of RNA transcripts that are produced at given circumstances in an organism or a specific tissue or cell) and epigenomics (which studies a complete set of epigenomics modifications on a gene expression) [21]. Genomic studies mostly make use of next-generation sequencing techniques.

2.2. Nutritional Genomics

Thanks to Garrod, who studied alkaptonuria, the concept of the influence of interactions between nutrition and genetics on phenotype was already known at the beginning of the 20th century [22]. However, the evolution of genomics contributed to the initiation of research on the influence of dietary components on gene expression, initiating a new field of omics—nutritional genomics—, which consists of two parts: nutrigenomics and nutrigenetics. The term nutrigenomics was first used in 2001 by Peregrin in order “to sum up the future of nutritional science into a single word” [23]. However, nowadays, this phrase is used to describe the study of interactions between dietary components and the genome plus the resulting changes in protein level, metabolism regulation and overall homeostasis [24]. In the case of nutrigenetics, its purpose is to check the body's response to dietary ingredients concerning genetic differences [25]. The analysis of the relationship between diet and genes conducted within nutritional genomics allows for the identification of mechanisms in which nutrition components affect health and the development of civilization diseases [26]. The first publications on nutritional genomics appeared at the beginning of the 90s and mainly concerned obesity issues, including the dietary fats genes interactions. At that time, it was hoped that it would be possible to identify obvious

genetic and nutritional factors that increase the predisposition to be overweight, and, as a result, cardiovascular diseases or diabetes. Indeed, recent analyses, suggest that more than ninety single genetic variants (usually SNP) are involved in body fatness, through pathways within the central nervous system (regulations of food intake) or within pathways of lipid metabolism or adipogenesis [19]. Moreover, studies showed that the intake of sugar-sweetened beverages and fried food interacts with the genetic risk of obesity [27,28].

Currently, more studies are being conducted to understand the mechanisms of the action of bioactive components on genes at the molecular level. Bioactive components of the diet are signaling molecules that can interact with one or more compounds, and as a result affect, for example, the process of gene expression in a quantitative and qualitative sense, lead to some changes in the body's physiological response to nutrients [29]. Bioactive ingredients act on two levels, either as chromatin structure regulators or as direct regulators of the activity of nuclear receptors [30,31]. In nutrigenomic experiments, *in vitro* conditions are mainly used, such as model cancer cells, and recently, the so-called organoids are created, for example, from stem cells, but also experimental animals such as the *Caenorhabditis elegans* or mice [19,31]. It is becoming obvious that there are complex interactions between the microbiome, the immune system, and the whole-body metabolism and that dietary components may modulate many of these dependencies [32]. The uses of nutrigenomics are multiple. For instance, it can help with personalized medicine and personalized diets by assessing an individual's nutritional requirements in order to prevent or treat obesity, diabetes, and metabolic disorder. Omics disciplines mainly employed in nutrition research are transcriptomics, proteomics, and metabolomics [33].

2.3. Proteomics

Proteomics is a broad and complex field of science that, on a large-scale, study protein properties, such as their function, structure, expression level, post-translational modifications or interactions, to obtain a global picture of cellular processes, networks, and disease processes [34]. Overall, the focus of proteomics is on the proteome, which is a portmanteau of the words protein and genome first used in 1995 by Marc Wilkins, and it refers to the totality of the proteins present in the cell line, tissue, or organism during the entire life cycle [35,36]. The study of the proteome is much more complicated than the study of the transcriptome or genome because the amount of protein in the body is influenced not only by mRNA expression but also by post-translational modifications or the current physiological state of the cell. The techniques conventionally used to study proteins are several types of chromatography for purification, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or western blotting for analysis, and gel-based approaches such as sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) or two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) for the separation of proteins. Nevertheless, when it comes to proteomics, high-throughput technologies such as protein microarrays, chips, mass spectrometry (MS) to analyze more complex protein mixtures, and X-ray crystallography or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to provide a three-dimensional structure of the protein are more commonly used [37,38]. These techniques provide a huge amount of data that require bioinformatic tools and databases to analyze, in order to predict the 2D and 3D structure of the tested proteins, interactions between them, and their response mechanism to various types of stresses, drugs, diseases, or dietary supplements.

2.4. Metabolomics

In the field of omics, we can also distinguish metabolomics, a dynamically developing area of science whose research goal is to identify and analyze the small endogenous and exogenous molecules (typically with sizes smaller than 1.5 kDa) called metabolites [39]. A complete set of substrates, intermediates, and products of metabolism in a cell, tissue, or organism is determined as a metabolome. Transcriptomic and proteomic analyses identify a comprehensive set of genes and their products being produced in the cell. Meanwhile, metabolomic studies can provide an insight into the current physiology of the cell [40]. In

the late 1940s, Roger Williams' research team developed the concept that every human being has his own "metabolic pattern" reflected by various components in body fluids components. This scientist, using paper chromatography, tested the presence of certain metabolites in urine and saliva, concluding that although the composition of these fluids varies from day to day and is distinctive from individual to individual, it is at the same time unique and characteristic to a given individual [41]. He conducted his research on samples taken from people suffering from, among others, alcoholism or schizophrenia and those staying in psychiatric hospitals, and he argued that each of these groups of people has a characteristic metabolic profile. Obviously, his research was mostly qualitative in nature. The real boom in the field of metabolomics took place about two decades later when more advanced techniques allowed for the quantitative description of tested samples [42]. Then, in 1971, Horning introduced the concept of the "metabolic profile", after Dalgiesh proved that, by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), it is possible to measure the levels of components in physiological fluids and tissue extracts [43,44]. At the same time, NMR spectroscopy also gained importance in the study of the metabolome, thanks to Seeley, who in 1974 presented the usefulness of this technique to study metabolites in human tissues, proving, the basis of muscle that almost all ATP molecules are complexed with magnesium [45]. As with the genome or the proteome, the human metabolome was also examined in 2007 using previously mentioned variations of techniques—NMR and MS. The current version of The Human Metabolome Database (HMDB) contains information on 2280 drug metabolites, 25,000 human metabolic and disease pathways, and 28,000 food components and food additives [46].

2.5. Foodomics

The last category of omics discussed in this review is foodomics. It is a term first introduced in 2009 at the Cesena conference and is defined as a discipline that studies food and nutrients through the use and integration of advanced omics techniques. Such research aims to provide a more holistic understanding of the interactions between food and the functioning of the organisms and, at the same time, aims to take care of the quality and safety of food of both plant and animal origin, in order to improve consumer's well-being and health [47,48]. Foodomics is the comprehensive approach for the exploitation of food science in light of an improvement of human nutrition; in this context, previously described nutrigenomics is considered a part of the more general term—foodomics [47]. Foodomics includes four sections of omics: genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics. This field requires a combination of food chemistry, biological sciences, and high throughput analysis, which is why its research and development is still quite limited [49]. Foodomics techniques are useful from the production to the consumption of food, starting with analyses of raw material—(its microbiological and biological safety), through assessing the impact of food processing, to the quality and safety control in distribution and production. For instance, foodomics tools can detect possible allergens or foodborne pathogens in the product and in the case of side-effects caused by food, can identify causative agents or biomarkers, such as peptides or metabolites, that are relevant for tracking microbial infections or food allergies [48,50].

3. Molecular Techniques Most often Used in Omic Studies

In nutrigenomic research, it is necessary to precisely determine the influence of the tested substances on biological processes in the organism at the following levels: transcriptome, genome, proteome, and metabolome. Advanced, high-throughput techniques that generate a massive amount of data must be used to obtain a holistic view of a given subject. The most commonly used omic techniques are briefly described below.

3.1. NGS

It took over 12 years of hundreds of scientists' work and cost almost USD 3 billion to obtain the sequence of the human genome [51].

The Human Genome Project relied on a first-generation sequencing technique called the Sanger technique, and although it allowed for the achievement of groundbreaking results, by the end of the project in 2002, it was known that a much more efficient, large-scale, and less expensive technique was needed, in order for these efforts to contribute to the development of genomic personalized medicine accessible for millions of patients [52]. Several years later, NGS (next-generation sequencing) techniques are in use, that overcome the limitation of Sanger sequencing methods and allow the entire genome to be sequenced in one day for about USD 1000 [53]. NGS-based tests rely on identifying the differences between the genome of the test sample and the reference genome. These differences may arrive from changes to the DNA sequence, e.g., single-nucleotide polymorphisms (SNPs), or large (the whole gene) deletions/duplications [52]. There are two major categories of NGS techniques, sequencing by hybridization and sequencing by synthesis (SBS), while the second approach is the predominant one [54]; therefore, the following descriptions focus on this method.

The basic NGS process involves three steps: library preparation which involves fragmenting DNA/RNA into multiple pieces and adding adapters (oligonucleotides of known sequence) at each end of the template fragments; then, sequencing of the library; and the last step is data analysis.

The vast majority of the sequencing data are generated using Illumina technology, where fragments of DNA with ligated adaptors at the ends, are hybridized to the flow cell surface and then amplified into a clonal cluster through bridge amplification cycles. Proprietary modified and fluorescently labeled nucleotides are incorporated and identified directly by fluorophore excitation during synthesis reactions. The process is repeated for at least 300 rounds. As all four reversible terminator dNTPs are present during each cycle, natural competition reduces incorporation bias and raw error rates. NGS platforms allow research of the genome, transcriptome, or epigenome of any organisms, with the use of a wide variety of methods such as whole-genome sequencing, de novo sequencing, targeted sequencing, total and mRNA sequencing, methylation sequencing or ChIP sequencing (chromatin immunoprecipitation sequencing) [55]. SBS methods rely on much shorter reads (up to 300–500 bases) and have an intrinsically higher error rate than Sanger sequencing. Another limitation of this approach is the reliance on high sequence coverage to obtain an accurate sequence [54].

Although typical, bulk RNA sequencing (RNA-seq) is extremely useful in studying gene expression, gene variants, alternative splicing, etc., and it illustrates an average of numerous cell transcriptomes present in the sample, disregarding the differences between individual cells. Therefore, shortly after introducing high-throughput RNA-seq, a technique for performing single-cell RNA-seq (scRNA-seq) emerged. This approach first requires tissue dissociation and then the isolation of single cells using fluorescence-activated cell sorting (FACS) or microfluidics-based techniques, or mechanical micromanipulation. The individual cells are lysed and converted into cDNA, which is the amplifier and is used to create RNA-seq libraries. scRNA-seq is successfully used in several fields, helping to study cancer heterogeneity and its microenvironment, immunology, neuroscience, and developmental biology [56]. It can also be useful in establishing the effect of a given factor on a particular type of cells, for instance, neurons or immune cells.

NGS techniques contributed to the rapid development and are now leading methods in omics fields such as genomics, transcriptomics, metagenomics, and nutritional genomics. NGS techniques can be used to determine human' or animal' genomes and can also be useful for both the qualitative and quantitative assessment and the identification of included in supplements species of, for instance, herbs. NGS techniques can also reveal a diverse community of fungi that are associated with live plant material [57].

3.2. LC/MS

Sometimes, a combination of several seemingly different techniques allows the discovery of their new possibilities and usefulness in many scientific fields. An example of such

a successful combination is the LC-MS method, which combines the physical separation capabilities of liquid chromatography (LC) with the mass analysis capabilities of mass spectroscopy (MS). The coupling of chromatography and mass spectroscopy has been a subject of interest for over 60 years. The first one, reported in 1958 was a combination of gas chromatography (GC) with MS [58]. In GC, the analytes are eluted from the separation column as a gas and can be directly electrically (EI) or chemically (CI) ionized in order to produce mass spectra. This is not possible in the case of liquid chromatography; thus coupling LC with MS was technically a much more significant challenge, and hence it was not commercially available until the 1970s [58,59].

Nowadays, besides liquid chromatography and mass spectrometry devices, the LC-MS system also includes an interface based on atmospheric pressure ionization (API) strategies, that is used to transfer components from the LC column to the MS ion source. Therefore, the sample is pumped through the high-performance liquid chromatography (HPLC) column, where analytes move through at different migration rates. This step separates mixtures with multiple components such as biological fluids, drugs, food, or pesticides. Then, the eluent is directed to MS, where mass determines the mass-to-charge ratio of ions. These data can be used to determine the exact molecular mass that helps to establish the exact molecular mass and structural information about the components of such samples.

The LC-MS offers high selectivity, resolution, precise mass, and specificity compared to other chromatography techniques. However, at the same time, it is also expensive in terms of capital and running costs, and is high maintenance.

This method is used successfully in a variety of fields, for instance in proteomic or metabolomic studies for peptide mass fingerprinting, the metabolite profiling of human/animal tissue, and for the analysis of natural products or secondary metabolites in plants [60,61].

3.3. NMR

At the end of World War II, the nuclear magnetic resonance (NMR) phenomenon was discovered independently by two groups of scientists Felix Bloch and Edward Purcell. It began to be tested within just a few years, mainly in chemistry, leading to the observation that different compounds give different signals [62]. NMR is a physical event that occurs in all nuclei that contain an odd number of protons and/or neutrons (in other words: nonzero nuclear spin) (most frequently used are ^1H and ^{13}C), and it means that at a characteristic and specific resonance frequency it comes to the absorption and re-emission of electromagnetic radiation [63].

Nowadays, NMR spectroscopy is a powerful tool that can provide detailed and quantitative physical, chemical, electronic and structural information about molecules in solutions and in the solid state. Many varieties of NMR techniques have been developed, which are used in various fields, e.g., in medicine, in which the so-called magnetic resonance imaging (MRI) is used for cancer diagnosis, and in chemistry, where proton NMR is used to identify the constituent parts of compounds. Furthermore, NMR is also a leading technique in proteomics and metabolomics to obtain information from biological fluids about the state of the disease or the level of toxins, as well as in foodomics to measure, for example, the ratio between water and fat and a given food product [64]. However, it should be mentioned that the disadvantage of this method is its low sensitivity, which means that it can only be used for the detection and measurement of metabolites in relatively high concentrations [65].

4. Some Examples of Omics Studies on the Most Popular Dietary Supplements

Currently, dietary supplements are composed of various ingredients such as minerals, amino acids, fatty acids, fibre, plant extracts, prebiotics, probiotics, and adaptogens (metabolic regulators (of a natural origin) that were shown to increase the ability of the organism to adapt to environmental factors and to avoid damage from such factors [66]). However, the most common supplements are still those containing vitamins. On the one

hand, it is understandable because the deficiency of any of the elements necessary for the proper functioning of our body can be dangerous, which in itself is an effective advertisement encouraging potential recipients to buy such preparations. On the other hand, the vast majority of vitamin deficiencies in the body are due to improper nutrition and can be relatively quickly “repaired” through a healthy and varied diet, without supplementation. Taking dietary supplements containing vitamins should always be consulted with a doctor and based on laboratory tests confirming the level of deficiency and the preparation’s composition and safety should be carefully checked. Due to the fact that dietary supplements do not have to be examined and controlled as thoroughly as in the case of drugs, the composition declared by the manufacturer may be inconsistent with the facts [10].

Moreover, multivitamin preparations may also contain substances that, taken at the same time, block mutual absorption or even cause side effects. In addition, even though, it is possible to define reference ranges for the level of a given vitamin for a specific group of people, as well as to indicate disease entities that may in some way be associated with a disturbed level of one of the vitamins, the impact of supplementation on health is not fully explored. All this indicates a great need for effective tools for the large-scale testing of the composition of supplements and checking the impact of a given preparation on metabolism or human transcripts. With the emergence of techniques such as NGS, LC/MS, and NMR, great hopes were raised for using them in order to understand the mechanisms of action and effectiveness of various supplements at different levels of the cellular organization—transcripts, proteome, and metabolome. The proof here is the significant number of works created since 2005 concerning attempts to use these techniques.

The following is a brief review of some of the studies that used various omic techniques to investigate the composition or health effects of various groups of supplemented substances, such as vitamins and plant extracts. As the number of different categories and ingredients of dietary supplements is enormous, and there are plenty of studies on each of them, we decided to show only a fraction of them. We selected supplements and research examples that well illustrate the use of various omic techniques in the study of supplements. We wanted to show that the use of various omic techniques on different substances gives a wide range of results that for the study of both the supplemented product itself and the effect of its supplementation on the body. We paid special attention to vitamin D, because it is one of the most frequently supplemented vitamins, on which there are many new scientific reports and around which there are still lots of controversies, primarily regarding the doses, forms of supplementation, and potential impact on the functioning of the body [67]. The second group of compounds, apart from vitamins, are plant extracts. This choice is mainly because it is the fastest-growing branch of the supplements market, but also herbal dietary supplements are the greatest challenge to study. One of the reasons for this is because most of the premises about the effect of a given plant ingredient is based on traditional beliefs, and there are no data on the toxicity of these products. Moreover, there is a large genetic variability between different subspecies and varieties, and active ingredients obtained from plants are often sensitive to standard methods of purification, detoxification and disinfection, which means that these products are often with traces of pesticides or microbes [4,12].

4.1. Vitamins

4.1.1. Vitamin D

The main focus of the review is research on vitamin D due to the fact that, of all the supplements, vitamin D supplementation is the most popular one (according to The ConsumerLab survey Dietary Supplement Consumer Trends and Preferences Report (2020) [68]. In fact, it is the only vitamin whose supplementation is widely recommended, especially in the fall and winter. The reason is that many population studies have shown vitamin D deficiency in most of the respondents. The shortage of this vitamin was intrinsically linked to rickets. Nowadays, all the current recommendations are based on bone health [67]. Unfortunately, the recommended daily doses vary significantly depending on the continent

and even the country. The European Food Safety Authority recommends an intake of 600 IU (15 µg)/day in healthy adults, with a maximum recommended intake of 4000 IU/day, while the UK Scientific Advisory Committee on Nutrition recommends the intake of 400 IU/day for all [67]. Available studies, mostly RCTs (randomized controlled trials), suggest beneficial effects of vitamin D supplementation on bone mineral density and bone mineral content (BMD/BMC) with doses of about 10–25 µg/day (400–1000 IU), with the indication that the effects may depend on calcium intake [69]. There were also some studies suggesting that vitamin D supplementation affects muscle strength/function, fracture risk, or overall immune system functioning, but these require further research.

The most frequently used indicator of vitamin-D status is a quantification of 25(OH)D in serum, for which the half-life is about 2–3 weeks [70]. The parent vitamin D in plasma has a much shorter half-life (0.5–5 days), which limited efforts to overcome technical challenges in its measurement [71]. One study showed that vitamin D concentration in serum may respond linearly to the dose of vitamin D administered daily, while in contrast to that, the concentration of serum 25(OH)D appeared to be steeper at low doses and approached a plateau as the dose of supplemented vitamin D increased [70,72]. Historically, serum vitamin D concentration was determined by competitive protein binding assay (CPBA) or HPLC [73,74]. These methods have limitations, such as low specificity in the case of CPBA, or limited throughput [75]. MS is the preferred analytical method for the quantitation of small molecules, such as vitamin D, because it offers high analytical sensitivity, specificity, and reproducibility. At present, LC-MS/MS assays are the preferred and routine method for measurements of 25(OH)D concentration, but there are only a few studies describing the use of LC-MS in measuring circulating vitamin D [76]. Based on the listed above reports, Best et al. from the University of Washington assumed that the serum vitamin D concentration may be a valuable biomarker that, opposite to 25(OH)D concentrations, proportionally reflects vitamin D uptake. Therefore, they made an attempt to optimize the LC-MS/MS method for this assay [71]. The group conducted two pilot studies where people were assigned into groups with different doses of vitamin D supplementation. Blood and SUBQ (subcutaneous) adipose tissue were collected at baseline and after 3 months of supplementation. With the use of the LC-MS/MS technique, the vitamin D₃ and 25(OH)D₃ levels were quantified. One of the findings was that with supplementation, the serum vitamin D₃ concentration increased proportionally to the dose and reached a plateau by 1 month of treatment. Serum and adipose tissue vitamin D₃ concentrations were correlated, and the dose-response of vitamin D₃ in adipose mirrored that in serum. By contrast, the 25(OH)D₃ response to supplementation was less than proportional to the dose and reached a plateau after 3 months, which is consistent with some meta-analyses that determined the that dose-response of serum 25(OH)D concentration to vitamin D intake was nonlinear. Therefore, the optimization and application of a modern LC-MS/MS method demonstrated the potential importance of the serum vitamin D concentration as a biomarker of actual vitamin D exposure in response to supplementation, in contrast to the currently used measurement of the 25(OH)D₃ level.

Many reports indicate a link between vitamin D deficiency and an increased risk of developing a number of diseases, including civilization diseases or cancer. Even though the impact of vitamin D supplementation on gene expression has been extensively studied, much is still unknown [77–83]. This is where modern methods, such as NGS, can be helpful, as shown in studies conducted by Silva et al. [84] that analyzed the global gene expression of the human-derived Caco-2 cell line treated with vitamin D₃. The results showed that genes involved in neuropeptide signaling, inflammation, cell adhesion, and morphogenesis were differentially expressed. The most considerable impact of vitamin D could be seen in the case of genes implicated in zinc, manganese, and iron homeostasis, such as ceruloplasmin, haptoglobin, and ZnT10 coding genes. These results may suggest that vitamin D₃ stimulates the release of zinc and manganese into circulation to reach organs in need, for instance, to stimulate bone formation, preventing osteoporosis. These findings

require further investigation, but it can be seen that the use of the NGS method allows for setting new, previously unknown effects of supplementation and further research goals.

However, the effectiveness of a given dietary supplement often depends not only on the form and dose but also on the individual characteristics of the person taking this compound. The VitDbol study (NCT02063334, ClinicalTrials.gov) showed that the responsiveness of the participants to the vitamin D oral supplementation, which was measured in 25(OH)D₃ and 1.25(OH)₂D₃ serum concentrations, was dependent on individual changes in PTH (parathormone) levels or chromatin accessibility at particular loci. Thanks to the use of FAIRE-qPCR (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) technology on isolated PMBCs (peripheral blood mononuclear cells), participants were segregated into high, mid, or low responders [85]. As shown in the same intervention trial, although taking a given supplement resulted in a relatively small increase in the 25(OH)D₃ serum concentration, this was found to be sufficient to induce significant changes at multiple sites in the epigenome of human leukocytes, as shown by assessing epigenome-wide chromatin accessibility by applying FAIRE-seq [86]. Moreover, it was shown that the effectiveness of vitamin D supplementation may be associated with BMI (body mass index) and serum fructose. These conclusions were reached by McClorry et al., who by examining the serum metabolome (assessed from children supplemented with vitamin D₃) using the 1H-NMR method, showed that changes in S-25(OH)D concentrations were negatively correlated with the change in fructose concentrations [87].

Despite the similar exposure to sunlight, the same latitude and lifestyle, and similar diet, gender, and age, it turned out that in the group of people there were significant differences in vitamin D₃ levels. One of the reasons for this may be genetic polymorphisms, as exemplified in the Filipino adult population, where with the use of targeted NGS lower serum levels, the following gene/genotypes have been observed: KNG1 rs11924390 T/T; ANKH rs2454873 G/G; NPFFR2 rs4129733 T/G; SH2B1 rs4788102 G/A; RAP1A rs494453 T/T and CRHBP rs7728378 T/C. These genes were previously associated with the risk of osteoporosis, type 2 diabetes, obesity, or stress response, but interestingly, most of them are independent of the canonical pathways of vitamin D synthesis or metabolism [88,89].

As shown in the example of vitamin D, the level of a given compound in the body, as well as the effectiveness of its supplementation, depends on many factors, such as the dose of the supplement, but also individual factors, such as genetic polymorphisms or BMI. Methods used in the field of omics are beneficially used here in assessing the effect of a given supplement on transcripts, metabolites, or the proteome and, in finding a possible reason for the lack of the assumed response of the organism to the administered compounds. Some of the most significant publications describing the use of omics techniques in the study of vitamin D are listed in Table 1.

4.1.2. Vitamin E

Vitamin E is a term for a group of eight fat-soluble compounds, of which α -tocopherol has the highest biological activity. It functions mainly as an antioxidant that protects cell membranes from oxidative damage and along with vitamin A plays a role in vision [90]. Vitamin E deficiency, for which the symptoms are mostly neurologic, rarely occurs in humans and only as a result of abnormalities in dietary fat absorption or metabolism, for instance, due to mutation in genes coding alpha-tocopherol transfer protein (α -TPP) [91].

For decades, vitamin E supplementation has been tested for cardiovascular disease or cancer, mostly prostate cancer and prevention, with mixed results. Some trials show that a daily dose of 50 IU alpha-tocopheryl acetate (ATA) can reduce prostate cancer incidence by about 40%, while on the other hand, a daily dosage of 400 IU followed for 7–12 years, increased prostate cancer incidence by 17% [92,93]. The study conducted by Huang et al. aimed to measure the serum biochemical changes in men receiving 50 IU ATA or 400 IU ATA to gain biochemical insight into vitamin E dosage-related effects potentially relevant to prostate cancer findings [94]. Fasting serums were collected from participants of two distinct trials—VEAPS (400 IU) (clinicaltrials.gov (NCT00114387)) and

ATBC (50 IU) (clinicaltrials.gov (NCT00342992)). With the use of a high-resolution accurate mass (HRAM) platform of ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS), baseline and follow-up serum metabolites were measured. After excluding unknown compounds, 974 metabolites, classified into eight chemical classes (amino acids, carbohydrates, cofactors and vitamins, energy metabolites, lipids, nucleotides, peptides, or xenobiotics), were included in the final analysis. Testing the biochemical effects of supplementation with either 50 IU or 400 IU ATA daily showed that in addition to the anticipated significant increase in alpha-CEHC sulfate and alpha-tocopherol in both trials, a novel C22 lactone sulfate compound was significantly decreased only in the high-dose VEAPS trial. In addition, most of the androgenic steroid metabolites that directly correlated with serum C22 lactone sulfate were significantly reduced by ATA supplementation only in VEAPS. These investigations point to a direct impact of high-dose vitamin E supplementation on this lactone-containing metabolite that correlated with androgen metabolites potentially relevant to elevated prostate cancer incidence [94].

Table 1. List of publications describing the use of omics techniques in the study of vitamin D.

First Author	Year of Publishing	Purpose	Used Method
Carlberg	2019	Modulation of the epigenome of immune cells by vitamin D status	ChIP-seq, FAIRE-seq
Carlberg	2018	Response of the human epigenome to vitamin D supplementation	FAIRE-seq
Seuter	2016	Molecular evaluation of vitamin D responsiveness of adults	FAIRE-seq
Wilfinger	2014	Utility of primary vitamin D receptor target genes as biomarkers for the vitamin D3 status	ChIP-seq, FAIRE-seq
Saksa	2015	Dissecting high from low responders for the vitamin D3 supplementation	ChIP-seq
Tuoresmaki	2014	Localizations of vitamin D receptors in genome	ChIP-seq
Lu	2018	Review connecting genomic effects of vitamin D on immune cells with multiple sclerosis	ChIP-seq
Benson	2017	Method analysis: Designing of a custom next generation sequencing panel for vitamin D associated genes	ION AmpliSeq, ION S5 CI system
Cheng	2020	Effects of vitamin D on the immunomodulation of head kidney in yellow catfish	NGS
Zumaraga	2021	NGS of the entire vitamin D receptor gene in order to investigate polymorphisms and correlation with vitamin D deficiency	targeted NGS
Zumaraga	2016	NGS in order to detect genetic polymorphisms correlated with vitamin D deficiency	targeted NGS
Silva	2016	Studying changes in gene expression in CaCo2 cells upon vitamin D treatment	NGS
Hänninen	2020	Influence of vitamin D supplementation on sNfL (serum neurofilament light chain), that are promising biomarkers of MS activity	MRI
McClorry	2019	Impact of BMI and serum fructose on effectiveness of vitamin D supplementation on children	NMR
Bislev	2020	Investigation of cardiovascular and musculoskeletal health upon daily supplementation of vitamin D	NMR
Rana	2014	Effects of vitamin D supplementation on muscle energy phospho-metabolites	P magnetic resonance spectroscopy
Sheedy	2014	Analysis of human urinary metabolome in response to calcium-vitamin D3 supplementation	H-NMR
Ponda	2012	Influence of vitamin D oral supplementation on the lipid profile	NMR-based lipid fractions
Chen	2015	Association of consumption of vitamin D2 enhanced mushroom with improved bone health in mice	NMR

Clinical trials have generally failed to demonstrate reduced cardiovascular risk with vitamin E supplementation, but as reactive oxygen species may contribute to the progression of diabetes complications, vitamin E antioxidant functions may be exceptionally beneficial for individuals with diabetes or Haptoglobin (Hp) 2-2 genotype (polymorphism in *Hp* gene that binds to free hemoglobin and is HDL-related). Costacou et al. conducted a crossover study to evaluate the effects of α -tocopherol supplementation on HDL (high-density lipoprotein) function in type 1 diabetes, stratifying by Hp genotype. Participants within each Hp genotype were randomly allocated to eight weeks of daily 400 IU α -tocopherol acetate or placebo. Collected plasma samples were analyzed with the use of NMR lipoprotein subfraction analysis. Particle concentrations of lipoproteins of different sizes were calculated from the measured amplitudes of their spectroscopically distinct lipid-methyl group. Findings suggest that α -tocopherol may improve HDL-mediated cholesterol efflux, a dysfunction that may be at least partly responsible for the observed cardiovascular susceptibility in Hp 2-2 carriers in type 1 diabetes. The results also suggest that vitamin E may reduce LDL (low-density lipoprotein) particle concentration in this Hp subgroup, with no benefit; indeed somewhat adverse changes in lipoprotein subfractions and lipid peroxides were observed in Hp 1 allele carriers. Therefore, these findings provide some support for the hypothesis that α -tocopherol supplementation, while not beneficial for the general or diabetes population overall, may benefit those most susceptible to cardiovascular disease, i.e., individuals with diabetes who carry the Hp 2-2 genotype [95].

4.1.3. Vitamin A

Vitamin A is a term for a family of retinoids (retinol, retinaldehyde, retinoic acid), with provitamin A (carotenoids, most prevalent is β -carotene) as a precursor. This vitamin is an essential fat-soluble micronutrient obtained from the diet, which absorption can be impaired by zinc deficiency and alcohol consumption [96]. The deficiency of this micronutrient is considered one of the most prevalent deficiencies worldwide, mainly affecting children (globally about 30% of children under the age of 5) in developing countries. Vitamin A deficiency can lead to blindness and cutaneous aberrations, can make a person prone to infections, and can increase the risk of cancer development [97]. As dangerous as deficiency is, the excessive intake of vitamin A can lead to neurological side effects, osteoporosis, and abnormalities during embryogenesis [98–100].

The multiplicity of retinoids bioactivities is largely due to their ability to regulate the expression of targeted genes, primarily through nuclear retinoid receptors [101,102]. To determine changes in gene expression levels due to vitamin A supplementation, Wang et al. conducted a study to evaluate the metabolomic changes in RAW264.7 cells. Cells were treated with retinoid at an IC₅₀ dose. RAW264.7 cells showed significant changes in protein biosynthesis, urea cycle, arginine and proline metabolism, malate-aspartate shuttle, alanine metabolism, and cellular respiration after retinol treatment IC₅₀ dose (140 μ M), indicating that retinol affects the cellular physiological functions via different metabolic pathways. With the use of ¹H-NMR 22 metabolites, such as amino acids, sugars, organic acids, glutathione, glycerin, and creatinine were identified as changed upon treatment. The cells also showed significantly increased levels of oxidative stress, IL-6 (interleukin 6) and TNF- α (tumor necrosis factor α), likely because of the mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation caused by retinol treatment [103]. Therefore, it is possible to identify which metabolic changes occur under the influence of a given supplement and determine its potential toxicity using NMR techniques.

4.2. Plant Extracts

4.2.1. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene, RSV) is a small, natural polyphenol found mainly in the skin of red grapes, berries, tea, nuts, and blueberries and in dark chocolate. RSV exists in two isomeric forms, but the "trans" form is predominant and is used as a food supplement or in the cosmetic industry. In recent years there has been a growing interest

in the potential health benefits of resveratrol supplementation, which is reported to have anti-inflammatory, antioxidant, anti-hyperlipidemic, immune-modulator, anti-carcinogenic, cardio- and neuroprotective, and anti-aging effects. However, the potential effects of resveratrol were recognized through in vitro, ex vivo, and animal studies while human clinical studies conducted so far did not confirm many of the above actions of RSV, and some even suggested toxicity [104,105].

There are a few studies investigating the influence of resveratrol on the transcriptome or proteome [106–110], but in order to determine the effect of a substance in vivo and in clinical trials, it is also necessary to investigate the distribution and level of the compound in the blood and other biological fluids, in the tissues where the compound is metabolized but, in some cases, especially when the compound has a short biological half-life or poor aqueous solubility, such as resveratrol, this can be a challenge. In such cases, the LC-MS/MS method may be appropriate, as was shown with resveratrol, for which the distribution in the mouse plasma and brain was successfully determined with the use of this method, which supports pharmacokinetic studies [111].

4.2.2. Green Tea

Tea is the second most consumed beverage around the world, after water, and although there are many categories and varieties of tea, green tea is gaining popularity not only as a relaxing drink but also as having many health benefits. Tea is produced from the leaves, buds, or stems of the plant *Camellia sinensis*. Depending on the level of antioxidants present and the degree of fermentation, there are three major forms of tea—black tea, oolong tea, and green tea. Green tea is categorized as nonfermented, and mainly (24–36% in dry weight) consists of catechins (polyphenols). Besides polyphenols, tea consists of caffeine, flavonoids, lignin, amino acids, organic acid, and chlorophyll. Numerous findings suggest that green tea may impact the cardiovascular system's functioning, reduce body mass, and even decrease the risk of neurodegenerative diseases or cancer. In vitro studies have shown that green tea polyphenols (GTP), mostly (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) are antioxidants free-radical scavengers and can induce autophagy. As shown with the use of omics analyses of the microbiome, such as LC-MS/MS and single-cell transcriptomics, tea polyphenols can also regulate the circadian rhythm by affecting intestinal flora and related metabolites and can regulate circadian gene expression [112,113]. Due to the effects mentioned above, green tea extract (GTE) supplementation has become common, despite no published data on the effects of long-term GTE consumption and studies that showed that EGCG may induce cytotoxicity to liver cells [114–117].

Green tea may have an anti-obesity effect, and to assess the underlying molecular mechanisms, next-generation sequencing can be used. Zang et al. using zebrafish larva and adult obesity models showed that the daily administration of GTE reduced visceral adipose tissue volume and based on the RNA-sequencing of liver tissue, this may be due to the activation of Wnt/ β -catenin and adenosine monophosphate-activated protein kinase pathways [118]. A similar study conducted on an obesogenic mice model proved that green tea contributes to systemic metabolic homeostasis by regulating the expression of specific genes involved in BCAA (branched chain amino acids) degradation and lipid and glucose metabolism [119].

4.2.3. Ginseng

Traditionally used in Chinese medicine ginseng is the most widely consumed herb globally [120]. The main phytochemical constituents in ginseng are triterpene saponins (the ginsenosides), which occur in different proportions depending on the ginseng species. Fresh ginseng root is used in food recipes, while ginseng extract or powder are used as supplements due to ginseng's reputation as a panacea for various physical and mental issues. Ginseng is believed to help manage stress, memory loss, or fatigue and can help treat diabetes, respiratory infections, cardiovascular disease, inflammatory disorders, and even breast or prostate cancer. Some studies assessing the effect of ginseng on the transcriptome,

proteome, or metabolome have already been carried out [121–125]. However, meta-analysis and clinical trials did not confirm the positive influence of ginseng on overall health or in treating mentioned conditions [115,126,127]. Due to no substantial evidence, the US Food and Drug Administration (FDA) did not approve ginseng as a drug [128]. Nonetheless, ginseng products are commonly marketed as a dietary supplement but should be taken with extreme caution as when taken in excessive use, it may have a variety of side effects and interactions with drugs.

On the packaging of a dietary supplement, there is often only general information about its ingredients. As in the case of ginseng preparations, usually, only the name of the species and its percentage are given. Meanwhile, depending on the variety, age of the plant and the processing method, the content of primary metabolites varies [129,130]. For instance, there are four processed *P. ginseng* products, white ginseng, tae-geuk ginseng, red ginseng, and black ginseng which differ in the sugar content that is shown with the use of high-resolution magic angle spinning (HR-MAS) NMR-based metabolomics [130]. Additionally, each cultivar has its characteristic profile of primary and secondary metabolites, which was shown in the example of seven cultivars (Chunpoong, Chungsun, Kumpoong, Yunpoong, Gopoong, Sunwon, and Sunun) that were analyzed using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS) and HR-MAS NMR spectroscopy, which allowed the study to determine the differences in the level of ginsenosides and amino-acids [131].

4.2.4. Curcumin

Curcumin is another example of an ingredient used daily as a food product that has become a dietary supplement under the influence of reports of a broad, beneficial effect on health. Curcumin (CUR; polyphenol) is one of the main compounds found in the rhizome of turmeric (*Curcuma longa*), a plant that is usually used as a spice used in the preparation of curries in Asian countries or as a coloring agent (vivid orange-yellow color) in a variety of industries. In Ayurvedic medicine, turmeric is also known to be helpful in respiratory problems, dermatological disorders, or wound healing. In recent decades, curcumin attracted the attention of scientists due to its therapeutic potential as anti-diabetic, anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer, anti-aging, and even as a treatment component in chronic diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, rheumatoid arthritis, migraines, and many more. Furthermore, while there are quite a lot of studies on the effect of curcumin on transcriptome or proteome [132–137], including ones conducted with omic methods, unfortunately, this influence has not been confirmed in any of the official, reliable clinical trials. One of many concerns, with the use of curcumin extract as a potential drug, is its instability, poor solubility, and low bioavailability [138–144].

In connection with reports of the influence of curcumin on certain lung diseases, such as asthma, lung cancer, or pulmonary fibrosis, researchers from Taiwan hypothesized that this compound might have a positive effect on the course of chronic and progressive lung disease, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), characterized by fibrosing interstitial pneumonitis. Some in vitro and in vivo studies showed that curcumin might promote apoptosis, inhibit differentiation and enhance antioxidant mechanisms in fibroblasts, but the effect of curcumin on modulating gene expression profiles in those cells was not investigated. Therefore, using next-generation sequencing and bioinformatic analyses, Chang et al. explored the effects of curcumin on mRNA and microRNA changes in IPF fibroblasts. Thanks to the use of NGS it was possible to identify several dozen down- and up-regulated protein-coding genes and microRNAs in curcumin-treated IPF fibroblasts, which are involved in the pathways responsible for the suppression of cell cycle progression. They found that curcumin might decrease the level of hsa-miR-6724-5p, leading to increased KLF10 expression and resulting in cell cycle arrest in fibroblasts, which supports the potential role of this compound in the treatment of IPF.

5. Conclusions

Omics are areas of science that are considered essential to the holistic research and development of many vital issues, such as personalized medicine and the efficient and safe production of specific drugs. Techniques from the domain of omics should also be widely used in the study of dietary supplements. As shown in the examples in the review, the most commonly used omics techniques, such as NGS, LC-MS, and NMR, help investigate the molecular-level effect of a supplement in specific cases and its safe use. Variants of NGS techniques are most useful in establishing new potential effects of supplementation and in identifying signaling pathways and biological processes that are actually altered by the component. In addition, NGS allows the identification of groups of people, for example, with various polymorphisms or specific syndromes, which may be predisposed to a deficiency of a given compound and in which supplementation would have an actual, commensurate effect of bringing the organism to homeostasis. LC-MS techniques are most helpful in assessing the effects of various doses of the supplemented compound on metabolites and proteins. They are also used to measure the serum content of a given compound that would reflect the supplemented doses well. LC-MS techniques can also be used in studying the distribution and level of metabolites in compounds. Moreover, the variants of NMR techniques should be used to study metabolic changes and metabolic action pathways. They are also helpful in studying the potential toxicity of a compound. NMR can establish the exact composition of the compound, its sugar content, and primary and secondary metabolites. Moreover, those methods can be used to determine what conditions or individual characteristics may be affecting the effectiveness of supplementation. Therefore, by using these modern techniques and their combinations, the possibility of thoroughly examining the ingredients of dietary supplements and determining for whom such supplementation may be useful or necessary, and at the same time safe, become widely available.

Author Contributions: Conceptualization, A.S., M.O. and G.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, M.O. and G.S.; funding acquisition, M.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by National Science Centre (2019/35/O/NZ9/03148., 10.2020-09.2024).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kantor, E.D.; Rehm, C.D.; Du, M.; White, E.; Giovannucci, E.L. Trends in Dietary Supplement Use Among US Adults From 1999–2012. *JAMA* **2016**, *316*, 1464. [CrossRef] [PubMed]
2. FDA Consumer Updates. Available online: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/fda-101-dietary-supplements> (accessed on 10 October 2021).
3. Dwyer, J.T.; Coates, P.M.; Smith, M.J. Dietary supplements: Regulatory challenges and research resources. *Nutrients* **2018**, *10*, 41. [CrossRef] [PubMed]
4. Fu, P.P.; Chiang, H.M.; Xia, Q.; Chen, T.; Chen, B.H.; Yin, J.J.; Wen, K.C.; Lin, G.; Yu, H. Quality assurance and safety of herbal dietary supplements. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2009**, *27*, 91–119. [CrossRef] [PubMed]
5. Dietary Supplements Market Size, Share & Trends Analysis Report by Ingredient (Vitamins, Minerals), by Form, by Application, by End User, by Distribution Channel, by Region, and Segment Forecasts 2022–2030. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dietary-supplements-market> (accessed on 15 March 2022).
6. Kesselheim, A.S.; Connolly, J.; Rogers, J.; Avorn, J. Mandatory disclaimers on dietary supplements do not reliably communicate the intended issues. *Health Aff.* **2015**, *34*, 438–446. [CrossRef]
7. Denham, B.E. Dietary supplements—Regulatory issues and implications for public health. *JAMA* **2011**, *306*, 428–429. [CrossRef] [PubMed]
8. Deuster, P.A.; Lindsey, A.T.; Scott, J.M. Dietary supplements: Regulatory challenges and issues in the department of defense. *Mil. Med.* **2018**, *183*, 53–55. [CrossRef]

9. Pawar, R.S.; Grundel, E. Overview of regulation of dietary supplements in the USA and issues of adulteration with phenethylamines (PEAs). *Drug Test. Anal.* **2017**, *9*, 500–517. [\[CrossRef\]](#)
10. Petroczi, A.; Taylor, G.; Naughton, D.P. Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 393–402. [\[CrossRef\]](#)
11. Tucker, J.; Fischer, T.; Upjohn, L.; Mazzera, D.; Kumar, M. Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated With US Food and Drug Administration Warnings. *JAMA Netw. Open* **2018**, *1*, e183337. [\[CrossRef\]](#)
12. Brown, A.C. An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 1 of 5 series. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *107*, 449–471. [\[CrossRef\]](#)
13. Ratajczak, M.; Kaminska, D.; Światły-Błaszkiwicz, A.; Matysiak, J. Quality of dietary supplements containing plant-derived ingredients reconsidered by microbiological approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 6837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Cicero, A.F.G.; Ferroni, A.; Ertek, S. Tolerability and safety of commonly used dietary supplements and nutraceuticals with lipid-lowering effects. *Expert Opin. Drug Saf.* **2012**, *11*, 753–766. [\[CrossRef\]](#)
15. Maughan, R.J. Quality assurance issues in the use of dietary supplements, with special reference to protein supplements. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 1843S–1847S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Faller, A.C.; Arunachalam, T.; Shanmughanandhan, D.; Kesanakurti, P.; Shehata, H.R.; Ragupathy, S.; Newmaster, S.G. Investigating appropriate molecular and chemical methods for ingredient identity testing of plant-based protein powder dietary supplements. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Crighton, E.; Coghlan, M.L.; Farrington, R.; Hoban, C.L.; Power, M.W.P.; Nash, C.; Mullaney, I.; Byard, R.W.; Trengove, R.; Musgrave, I.F.; et al. Toxicological screening and DNA sequencing detects contamination and adulteration in regulated herbal medicines and supplements for diet, weight loss and cardiovascular health. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *176*, 112834. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Micheel, C.M.; Nass, S.J.; Omenn, G.S.; Policy, H.S. *Evolution of Translational Omics*; Micheel, C.M., Nass, S.J., Omenn, G.S., Eds.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2012; ISBN 978-0-309-22418-5.
19. Mathers, J.C. Nutrigenomics in the modern era. *Proc. Nutr. Soc.* **2017**, *76*, 265–275. [\[CrossRef\]](#)
20. Craig Venter, J.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; et al. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304–1351. [\[CrossRef\]](#)
21. Kaur, S. Genomics. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 310–312. [\[CrossRef\]](#)
22. Garrod, A.E. The incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality. *Mol. Med.* **1996**, *2*, 274–282. [\[CrossRef\]](#)
23. Peregrin, T. The new frontier of nutrition science: Nutrigenomics. *J. Am. Diet. Assoc.* **2001**, *101*, 1306. [\[CrossRef\]](#)
24. Ekmekci, A.; Cirak, M.Y. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Adv. Food Biochem.* **2009**, 457–475. [\[CrossRef\]](#)
25. Subbiah, M.T.R. Nutrigenetics and nutraceuticals: The next wave riding on personalized medicine. *Transl. Res.* **2007**, *149*, 55–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Chadwick, R. Nutrigenomics, individualism and public health. *Proc. Nutr. Soc.* **2004**, *63*, 161–166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Qi, Q.; Chu, A.Y.; Kang, J.H.; Jensen, M.K.; Curhan, G.C.; Pasquale, L.R.; Ridker, P.M.; Hunter, D.J.; Willett, W.C.; Rimm, E.B.; et al. Sugar-Sweetened Beverages and Genetic Risk of Obesity. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1387–1396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Qi, Q.; Chu, A.Y.; Kang, J.H.; Huang, J.; Rose, L.M.; Jensen, M.K.; Liang, L.; Curhan, G.C.; Pasquale, L.R.; Wiggs, J.L.; et al. Fried food consumption, genetic risk, and body mass index: Gene-diet interaction analysis in three US cohort studies. *BMJ* **2014**, *348*, g1610. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Guaadaoui, A.; Benaicha, S.; Elmajdoub, N.; Bellaoui, M.; Hamal, A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2014**, *3*, 17–179. [\[CrossRef\]](#)
30. Fenech, M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics—diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1365–1370. [\[CrossRef\]](#)
31. Gętek, M.; Czech, N.; Fizia, K.; Białek-Dratwa, A.; Muc-Wierzgoń, M.; Kokot, T.; Nowakowska-Zajdel, E. Nutrigenomika—Bioaktywne składniki żywności. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **2013**, *67*, 255–260. [\[CrossRef\]](#)
32. Verma, M.; Hontecillas, R.; Abedi, V.; Leber, A.; Tubau-Juni, N.; Philipson, C.; Carbo, A.; Bassaganya-Riera, J. Modeling-Enabled Systems Nutritional Immunology. *Front. Nutr.* **2016**, *3*, 5. [\[CrossRef\]](#)
33. Kato, H.; Takahashi, S.; Saito, K. Omics and integrated omics for the promotion of food and nutrition science. *J. Tradit. Complement. Med.* **2011**, *1*, 25–30. [\[CrossRef\]](#)
34. Blackstock, W.P.; Weir, M.P. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 121–127. [\[CrossRef\]](#)
35. Wasinger, V.C.; Cordwell, S.J.; Poljak, A.; Yan, J.X.; Gooley, A.A.; Wilkins, M.R.; Duncan, M.W.; Harris, R.; Williams, K.L.; Humphery-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1090–1094. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Anderson, N.L.; Anderson, N.G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853–1861. [\[CrossRef\]](#)
37. Zhang, Z.; Wu, S.; Stenoien, D.L.; Paša-Tolić, L. High-throughput proteomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 427–454. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

38. Aslam, B.; Basit, M.; Nisar, M.A.; Khurshid, M.; Rasool, M.H. Proteomics: Technologies and their applications. *J. Chromatogr. Sci.* **2017**, *55*, 182–196. [CrossRef] [PubMed]
39. Stobiecki, M. Metabolomika—narzędzie w genomice funkcjonalnej i biologii systemów. *Biotechnologia* **2009**, *2*, 54–64.
40. Hollywood, K.; Brison, D.R.; Goodacre, R. Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics* **2006**, *6*, 4716–4723. [CrossRef]
41. Gates, S.C.; Sweeley, C.C. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clin. Chem.* **1978**, *24*, 1663–1673. [CrossRef]
42. Novotny, M.V.; Soini, H.A.; Mechref, Y. Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *866*, 26–47. [CrossRef]
43. Dalgliesh, C.; Horning, E.; Horning, M.; Knox, K.; Yarger, K. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem. J.* **1966**, *101*, 792–810. [CrossRef]
44. Horning, E.C.; Horning, M.G. Human metabolic profiles obtained by gc and gc/ms. *J. Chromatogr. Sci.* **1971**, *9*, 129–140. [CrossRef]
45. Wishart, D.S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A.C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; et al. HMDB: The human metabolome database. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 521–526. [CrossRef]
46. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Marcu, A.; Guo, A.C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D608–D617. [CrossRef] [PubMed]
47. Cifuentes, A. Food analysis and foodomics. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7109. [CrossRef]
48. Andjelković, U.; Gajdošik, M.Š.; Gašo-Sokač, D.; Martinović, T.; Josić, D. Foodomics and food safety: Where we are. *Food Technol. Biotechnol.* **2017**, *55*, 290–307. [CrossRef]
49. Capozzi, F.; Bordoni, A. Foodomics: A new comprehensive approach to food and nutrition. *Genes Nutr.* **2013**, *8*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
50. Giacometti, J.; Josic, D. Foodomics in microbial safety. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 16–22. [CrossRef]
51. National Human Genome Research Institute. Human Genome Project FAQ, National Institute of Health. 2010. Available online: <https://www.genome.gov/11006943/human-genome-project-completion-frequently-asked-questions/> (accessed on 8 January 2021).
52. Muzzey, D.; Evans, E.A.; Lieber, C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr. Genet. Med. Rep.* **2015**, *3*, 158–165. [CrossRef] [PubMed]
53. Metzker, M.L. Sequencing technologies the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 31–46. [CrossRef] [PubMed]
54. Slatko, B.E.; Gardner, A.F.; Ausubel, F.M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2018**, *122*, e59. [CrossRef]
55. Sequencing Technology Sequencing by Synthesis. Available online: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html> (accessed on 25 November 2021).
56. Olsen, T.K.; Baryawno, N. Introduction to Single-Cell RNA Sequencing. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2018**, *122*, e57. [CrossRef] [PubMed]
57. Ivanova, N.V.; Kuzmina, M.L.; Braukmann, T.W.A.; Borisenko, A.V.; Zakharov, E.V. Authentication of herbal supplements using next-generation sequencing. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156426. [CrossRef] [PubMed]
58. Chatfield, D.A.; Fitzgerald, R.L. *Liquid Chromatography—Mass Spectrometry: An Introduction*; Ardrey, R.E., Ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2003; Volume 50, p. 276. ISBN 0471497991.
59. Pitt, J.J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **2009**, *30*, 19–34.
60. Stobiecki, M.; Skirycz, A.; Kerhoas, L.; Kachlicki, P.; Muth, D.; Einhorn, J.; Mueller-Roeber, B. Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. *Metabolomics* **2006**, *2*, 197–219. [CrossRef]
61. Gika, H.G.; Theodoridis, G.A.; Plumb, R.S.; Wilson, I.D. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 12–25. [CrossRef] [PubMed]
62. Marion, D. An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol. Cell. Proteom.* **2013**, *12*, 3006–3025. [CrossRef] [PubMed]
63. Rhodes, C.J. Magnetic resonance spectroscopy. *Sci. Prog.* **2017**, *100*, 241–292. [CrossRef]
64. Rinck, P. Magnetic Resonance in Medicine. In *The Basic Textbook of the European Magnetic Resonance Forum*, 11th ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2017.
65. Horgan, R.P.; Kenny, L.C. ‘Omic’ technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Obstet. Gynaecol.* **2011**, *13*, 189–195. [CrossRef]
66. Panossian, A.; Wikman, G.; Wagner, H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 287–300. [CrossRef]
67. Dobson, R.; Cock, H.R.; Brex, P.; Giovannoni, G. Vitamin D supplementation. *Pract. Neurol.* **2018**, *18*, 35–42. [CrossRef]
68. Collagen and Magnesium Rise in Popularity, as Fish Oil and Curcumin Dip in Latest ConsumerLab Survey of Supplement Users. Available online: <https://www.consumerlab.com/news/most-popular-supplements-from-survey/02-29-2020/> (accessed on 11 April 2022).
69. Panel, E.; Nda, A. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for niacin. *EFSA J.* **2014**, *12*, 3759. [CrossRef]
70. Ross, C.; Taylor, C.L.; Yaktine, A.L. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2011; ISBN 978-0-309-16394-1.

71. Best, C.M.; Riley, D.V.; Laha, T.J.; Pflaum, H.; Zelnick, L.R.; Hsu, S.; Thummel, K.E.; Foster-Schubert, K.E.; Kuzma, J.N.; Cromer, G.; et al. Vitamin D in human serum and adipose tissue after supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **2021**, *113*, 83–91. [\[CrossRef\]](#)
72. Barger-Lux, M.J.; Heaney, R.P.; Dowell, S.; Chen, T.C.; Holick, M.F. Vitamin D and its Major Metabolites: Serum Levels after Graded Oral Dosing in Healthy Men. *Osteoporos. Int.* **1998**, *8*, 222–230. [\[CrossRef\]](#)
73. Chen, T.C.; Turner, A.K.; Holick, M.F. A method for the determination of the circulating concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D. *J. Nutr. Biochem.* **1990**, *1*, 320–327. [\[CrossRef\]](#)
74. Heaney, R.P.; Davies, K.M.; Chen, T.C.; Holick, M.F.; Janet Barger-Lux, M. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 204–210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Norman, A.W. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 491S–499S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Galior, K.; Ketha, H.; Grebe, S.; Singh, R.J. 10 years of 25-hydroxyvitamin-D testing by LC-MS/MS-trends in vitamin-D deficiency and sufficiency. *Bone Rep.* **2018**, *8*, 268–273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Medeiros, J.F.P.; de Oliveira Borges, M.V.; Soares, A.A.; dos Santos, J.C.; de Oliveira, A.B.B.; da Costa, C.H.B.; Cruz, M.S.; Bortolin, R.H.; de Freitas, R.C.C.; Dantas, P.M.S.; et al. The impact of vitamin D supplementation on VDR gene expression and body composition in monozygotic twins: Randomized controlled trial. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11943. [\[CrossRef\]](#)
78. Durrant, L.R.; Bucca, G.; Hesketh, A.; Möller-Levet, C.; Tripkovic, L.; Wu, H.; Hart, K.H.; Mathers, J.C.; Elliott, R.M.; Lanham-New, S.A.; et al. Vitamins D2 and D3 Have Overlapping But Different Effects on the Human Immune System Revealed Through Analysis of the Blood Transcriptome. *Front. Immunol.* **2022**, *13*. [\[CrossRef\]](#)
79. Vaughan-Shaw, P.G.; Grimes, G.; Blackmur, J.P.; Timofeeva, M.; Walker, M.; Ooi, L.Y.; Svinti, V.; Donnelly, K.; Din, F.V.N.; Farrington, S.M.; et al. Oral vitamin D supplementation induces transcriptomic changes in rectal mucosa that are linked to anti-tumour effects. *BMC Med.* **2021**, *19*, 174. [\[CrossRef\]](#)
80. Pasing, Y.; Fenton, C.G.; Jorde, R.; Paulssen, R.H. *Changes in the Human Transcriptome upon Vitamin D Supplementation*; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 173, ISBN 2007002167.
81. Dastorani, M.; Aghadavod, E.; Mirhosseini, N.; Foroozafard, F.; Zadeh Modarres, S.; Amiri Siavashani, M.; Asemi, Z. The effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles and gene expression of insulin and lipid metabolism in infertile polycystic ovary syndrome candidates for in vitro fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16*, 94. [\[CrossRef\]](#)
82. Makieva, S.; Reschini, M.; Ferrari, S.; Bonesi, F.; Polledri, E.; Fustinoni, S.; Restelli, L.; Sarais, V.; Somigliana, E.; Viganò, P. Oral Vitamin D supplementation impacts gene expression in granulosa cells in women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* **2021**, *36*, 130–144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Garand, M.; Toufiq, M.; Singh, P.; Huang, S.S.Y.; Tomei, S.; Mathew, R.; Mattei, V.; Al Wakeel, M.; Sharif, E.; Al Khodor, S. Immunomodulatory effects of vitamin d supplementation in a deficient population. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5041. [\[CrossRef\]](#)
84. Claro da Silva, T.; Hiller, C.; Gai, Z.; Kullak-Ublick, G.A. Vitamin D3 transactivates the zinc and manganese transporter SLC30A10 via the Vitamin D receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *163*, 77–87. [\[CrossRef\]](#)
85. Seuter, S.; Virtanen, J.K.; Nurmi, T.; Pihlajamäki, J.; Mursu, J.; Voutilainen, S.; Tuomainen, T.P.; Neme, A.; Carlberg, C. Molecular evaluation of vitamin D responsiveness of healthy young adults. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *174*, 314–321. [\[CrossRef\]](#)
86. Carlberg, C.; Seuter, S.; Nurmi, T.; Tuomainen, T.P.; Virtanen, J.K.; Neme, A. In vivo response of the human epigenome to vitamin D: A Proof-of-principle study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *180*, 142–148. [\[CrossRef\]](#)
87. McClorry, S.; Slupsky, C.M.; Lind, T.; Karlsland Åkeson, P.; Hernell, O.; Öhlund, I. Effectiveness of vitamin D supplementation in Swedish children may be negatively impacted by BMI and serum fructose. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *75*, 108251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Zumaraga, M.P.; Medina, P.J.; Recto, J.M.; Abrahan, L.; Azurin, E.; Tanchoco, C.C.; Jimeno, C.A.; Palmes-Saloma, C. Targeted next generation sequencing of the entire vitamin D receptor gene reveals polymorphisms correlated with vitamin D deficiency among older Filipino women with and without fragility fracture. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *41*, 98–108. [\[CrossRef\]](#)
89. Zumaraga, M.P.; Concepcion, M.A.; Duante, C.; Rodriguez, M. Next generation sequencing of 502 lifestyle and nutrition related genetic polymorphisms reveals independent loci for low serum 25-hydroxyvitamin d levels among adult respondents of the 2013 philippine national nutrition survey. *J. ASEAN Fed. Endocr. Soc.* **2021**, *36*, 56–63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Barker, B. *Vitamin E Supplementation in People with Cystic Fibrosis: Summary of a Cochrane Review*; Explore: New York, NY, USA, 2021. [\[CrossRef\]](#)
91. Institute of Medicine (US). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, Proceedings of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2000; Volume 2, ISBN 978-0-309-06935-9.
92. Klein, E.A.; Thompson, I.M.; Tangen, C.M.; Crowley, J.J.; Lucia, M.S.; Goodman, P.J.; Minasian, L.M.; Ford, L.G.; Parnes, H.L.; Gaziano, J.M.; et al. Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer. *JAMA* **2011**, *306*, 1549. [\[CrossRef\]](#)
93. Heinonen, O.P.; Albanes, D.; Virtamo, J.; Taylor, P.R.; Huttunen, J.K.; Hartman, A.M.; Haapakoski, J.; Malila, N.; Rautalahti, M.; Ripatti, S.; et al. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: Incidence and mortality in a controlled trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 440–446. [\[CrossRef\]](#)
94. Huang, J.; Hodis, H.N.; Weinstein, S.J.; Mack, W.J.; Sampson, J.N.; Mondul, A.M.; Albanes, D. Serum Metabolomic Response to Low- and High-Dose Vitamin E Supplementation in Two Randomized Controlled Trials. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2020**, *29*, 1329–1334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

95. Costacou, T.; Levy, A.P.; Miller, R.G.; Snell-Bergeon, J.; Asleh, R.; Farbstein, D.; Fickley, C.E.; Pambianco, G.; de la Vega, R.; Evans, R.W.; et al. Effect of vitamin E supplementation on HDL function by haptoglobin genotype in type 1 diabetes: Results from the HapE randomized crossover pilot trial. *Acta Diabetol.* **2016**, *53*, 243–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Zinder, R.; Cooley, R.; Vlad, L.G.; Molnar, J.A. Vitamin A and Wound Healing. *Nutr. Clin. Pract.* **2019**, *34*, 839–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Wirth, J.P.; Petry, N.; Tanumihardjo, S.A.; Rogers, L.M.; McLean, E.; Greig, A.; Garrett, G.S.; Klemm, R.D.W.; Rohner, F. Vitamin a supplementation programs and country-level evidence of vitamin A deficiency. *Nutrients* **2017**, *9*, 190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Ferreira Faustino, J.; Ribeiro-Silva, A.; Faeda Dalto, R.; Martins De Souza, M.; Fortes Furtado, J.M.; de Melo Rocha, G.; Alves, M.; Melani Rocha, E. Vitamin A and the eye: An old tale for modern times. *Arq. Bras. Oftalmol.* **2016**, *79*, 56–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Saeed, A.; Dullaart, R.P.F.; Schreuder, T.C.M.A.; Blokzijl, H.; Faber, K.N. Disturbed vitamin A metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients* **2018**, *10*, 29. [[CrossRef](#)]
100. Piersma, A.H.; Hessel, E.V.; Staal, Y.C. Retinoic acid in developmental toxicology: Teratogen, morphogen and biomarker. *Reprod. Toxicol.* **2017**, *72*, 53–61. [[CrossRef](#)]
101. McGrane, M.M. Vitamin A regulation of gene expression: Molecular mechanism of a prototype gene. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 497–508. [[CrossRef](#)]
102. Bar-El Dadon, S.; Reifen, R. Vitamin A and the epigenome. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 2404–2411. [[CrossRef](#)]
103. Wang, Y.; Song, X.; Geng, Y. Effects of IC50 dose of retinol on metabolomics of RAW264.7 cells. *J. Food Biochem.* **2020**, *44*, e13090. [[CrossRef](#)]
104. Novelle, M.G.; Wahl, D.; Diéguez, C.; Bernier, M.; de Cabo, R. Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Res. Rev.* **2015**, *21*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Shaito, A.; Posadino, A.M.; Younes, N.; Hasan, H.; Halabi, S.; Alhababi, D.; Al-Mohannadi, A.; Abdel-Rahman, W.M.; Eid, A.H.; Nasrallah, G.K.; et al. Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wu, H.; Chen, L.; Zhu, F.; Han, X.; Sun, L.; Chen, K. The cytotoxicity effect of resveratrol: Cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins* **2019**, *11*, 731. [[CrossRef](#)]
107. Zhou, J.; Liao, Z.; Jia, J.; Chen, J.L.; Xiao, Q. The effects of resveratrol feeding and exercise training on the skeletal muscle function and transcriptome of aged rats. *PeerJ* **2019**, *2019*, e7199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Lv, Z.M.; Ling, M.Y.; Chen, C. Comparative proteomics reveals protective effect of resveratrol on a high-fat diet-induced damage to mice testis. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2020**, *66*, 37–49. [[CrossRef](#)]
109. Chen, X.; Wang, Y.; Tian, J.; Shao, Y.; Zhu, B.; Wang, J.; Hua, Z. Quantitative Chemical Proteomics Reveals Resveratrol Inhibition of A549 Cell Migration Through Binding Multiple Targets to Regulate Cytoskeletal Remodeling and Suppress EMT. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 636213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Wang, C.; Chen, Z.; Zhao, X.; Lin, C.; Hong, S.; Lou, Y.; Shi, X.; Zhao, M.; Yang, X.; Guan, M.X.; et al. Transcriptome-based analysis reveals therapeutic effects of resveratrol on endometriosis in arat model. *Drug Des. Devel. Ther.* **2021**, *15*, 4141–4155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Ramalingam, P.; Ko, Y.T. Validated LC-MS/MS method for simultaneous quantification of resveratrol levels in mouse plasma and brain and its application to pharmacokinetic and brain distribution studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *119*, 71–75. [[CrossRef](#)]
112. Guo, T.; Song, D.; Ho, C.T.; Zhang, X.; Zhang, C.; Cao, J.; Wu, Z. Omics Analyses of Gut Microbiota in a Circadian Rhythm Disorder Mouse Model Fed with Oolong Tea Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 8847–8854. [[CrossRef](#)]
113. Zhang, Y.; Cheng, L.; Liu, Y.; Zhang, R.; Wu, Z.; Cheng, K.; Zhang, X. Omics Analyses of Intestinal Microbiota and Hypothalamus Clock Genes in Circadian Disturbance Model Mice Fed with Green Tea Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 1890–1901. [[CrossRef](#)]
114. Prasanth, M.I.; Sivamaruthi, B.S.; Chaiyasut, C.; Tencomnao, T. A review of the role of green tea (camellia sinensis) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients* **2019**, *11*, 474. [[CrossRef](#)]
115. Sellami, M.; Slimeni, O.; Pokrywka, A.; Kuvačić, G.; Hayes, L.D.; Milic, M.; Padulo, J. Herbal medicine for sports: A review. *J. Int. Soc. Sport. Nutr.* **2018**, *15*, 14. [[CrossRef](#)]
116. Xing, L.; Zhang, H.; Qi, R.; Tsao, R.; Mine, Y. Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1029–1043. [[CrossRef](#)]
117. Seeram, N.P.; Henning, S.M.; Niu, Y.; Lee, R.; Scheuller, H.S.; Heber, D. Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1599–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Zang, L.; Shimada, Y.; Nakayama, H.; Kim, Y.; Chu, D.C.; Juneja, L.R.; Kuroyanagi, J.; Nishimura, N. RNA-seq based transcriptome analysis of the anti-obesity effect of green tea extract using zebrafish obesity models. *Molecules* **2019**, *24*, 3256. [[CrossRef](#)]
119. Choi, J.Y.; Kim, Y.J.; Ryu, R.; Cho, S.J.; Kwon, E.Y.; Choi, M.S. Effect of green tea extract on systemic metabolic homeostasis in diet-induced obese mice determined via RNA-seq transcriptome profiles. *Nutrients* **2016**, *8*, 640. [[CrossRef](#)]
120. Jia, L.; Zhao, Y.; Liang, X.-J. Current Evaluation of the Millennium Phytomedicine- Ginseng (II): Collected Chemical Entities, Modern Pharmacology, and Clinical Applications Emanated from Traditional Chinese Medicine. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2924–2942. [[CrossRef](#)]

121. Kim, S.W.; Gupta, R.; Lee, S.H.; Min, C.W.; Agrawal, G.K.; Rakwal, R.; Kim, J.B.; Jo, I.H.; Park, S.Y.; Kim, J.K.; et al. An integrated biochemical, proteomics, and metabolomics approach for supporting medicinal value of Panax ginseng fruits. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 994. [CrossRef]
122. Wang, J.; Hou, Y.; Jia, Z.; Xie, X.; Liu, J.; Kang, Y.; Wang, X.; Wang, X.; Jia, W. Metabonomics Approach to Comparing the Antistress Effects of Four Panax ginseng Components in Rats. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 813–821. [CrossRef] [PubMed]
123. Panossian, A.; Abdelfatah, S.; Efferth, T. Network pharmacology of ginseng (Part ii): The differential effects of red ginseng and ginsenoside rg5 in cancer and heart diseases as determined by transcriptomics. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1010. [CrossRef] [PubMed]
124. Park, M.; Kim, K.H.; Jaiswal, V.; Choi, J.; Chun, J.L.; Seo, K.M.; Lee, M.J.; Lee, H.J. Effect of black ginseng and silkworm supplementation on obesity, the transcriptome, and the gut microbiome of diet-induced overweight dogs. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8002. [CrossRef] [PubMed]
125. Wang, D.; Lv, L.; Xu, Y.; Jiang, K.; Chen, F.; Qian, J.; Chen, M.; Liu, G.; Xiang, Y. Cardioprotection of Panax Notoginseng saponins against acute myocardial infarction and heart failure through inducing autophagy. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *136*, 111287. [CrossRef] [PubMed]
126. Smith, I.; Williamson, E.M.; Putnam, S.; Farrimond, J.; Whalley, B.J. Effects and mechanisms of ginseng and ginsenosides on cognition. *Nutr. Rev.* **2014**, *72*, 319–333. [CrossRef] [PubMed]
127. Xiang, Y.-Z.; Shang, H.-C.; Gao, X.-M.; Zhang, B.-L. A Comparison of the ancient use of ginseng in traditional Chinese medicine with modern pharmacological experiments and clinical trials. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 851–858. [CrossRef]
128. Multum, C. Ginseng as a Drug—General Information. Available online: <https://www.drugs.com/mtm/ginseng.html> (accessed on 13 December 2022).
129. Yang, S.O.; Shin, Y.S.; Hyun, S.H.; Cho, S.; Bang, K.H.; Lee, D.; Choi, S.P.; Choi, H.K. NMR-based metabolic profiling and differentiation of ginseng roots according to cultivation ages. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *58*, 19–26. [CrossRef]
130. Yoon, D.; Shin, W.C.; Lee, Y.S.; Kim, S.; Baek, N.I.; Lee, D.Y. A Comparative Study on Processed Panax ginseng Products Using HR-MAS NMR-Based Metabolomics. *Molecules* **2020**, *25*, 1390. [CrossRef]
131. Yoon, D.; Choi, B.R.; Kim, Y.C.; Oh, S.M.; Kim, H.G.; Kim, J.U.; Baek, N.I.; Kim, S.; Lee, D.Y. Comparative analysis of panax ginseng berries from seven cultivars using UPLC-QTOF/MS and nmr-based metabolic profiling. *Biomolecules* **2019**, *9*, 362. [CrossRef]
132. D’Aguanno, S.; D’Agnano, I.; De Canio, M.; Rossi, C.; Bernardini, S.; Federici, G.; Urbani, A. Shotgun proteomics and network analysis of neuroblastoma cell lines treated with curcumin. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 1068–1077. [CrossRef]
133. Cooney, J.M.; Barnett, M.P.G.; Dommels, Y.E.M.; Brewster, D.; Butts, C.A.; McNabb, W.C.; Laing, W.A.; Roy, N.C. A combined omics approach to evaluate the effects of dietary curcumin on colon inflammation in the Mdr1a^{-/-} mouse model of inflammatory bowel disease. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *27*, 181–192. [CrossRef]
134. Huminiecki, L.; Horbańczuk, J.; Atanasov, A.G. The functional genomic studies of curcumin. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *46*, 107–118. [CrossRef]
135. Gouda, M.M.; Rex, D.A.B.; Es, S.P.; Modi, P.K.; Chandrasekaran, J.; Bhandary, Y.P. Proteomics Analysis Revealed the Importance of Inflammation-Mediated Downstream Pathways and the Protective Role of Curcumin in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in C57BL/6 Mice. *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 2950–2963. [CrossRef]
136. Li, L.; Zhang, Z.; Huang, Y. Integrative transcriptome analysis and discovery of signaling pathways involved in the protective effects of curcumin against oxidative stress in tilapia hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **2020**, *224*, 105516. [CrossRef] [PubMed]
137. Huang, X.; Liang, C.; Yang, H.; Li, X.; Deng, X.; Liang, X.; Li, L.; Huang, Z.; Lu, D.; Ma, Y.; et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits the growth of adrenocortical carcinoma: Identification of potential candidate genes and pathways by transcriptome analysis. *Oncol. Lett.* **2021**, *21*, 476. [CrossRef] [PubMed]
138. Nelson, K.M.; Dahlin, J.L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1620–1637. [CrossRef] [PubMed]
139. Menon, V.P.; Sudheer, A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 105–125. [CrossRef] [PubMed]
140. Kotha, R.R.; Luthria, D.L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* **2019**, *24*, 2930. [CrossRef]
141. Nelson, K.M.; Dahlin, J.L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. Curcumin May (Not) Defy Science. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 467–470. [CrossRef]
142. Bashang, H.; Tamma, S. The use of curcumin as an effective adjuvant to cancer therapy: A short review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2020**, *67*, 171–179. [CrossRef]
143. Sadeghian, M.; Rahmani, S.; Jamialahmadi, T.; Johnston, T.P.; Sahebkar, A. The effect of oral curcumin supplementation on health-related quality of life: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Affect. Disord.* **2021**, *278*, 627–636. [CrossRef]
144. Lestari, M.L.A.D.; Indrayanto, G. Curcumin. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 39, ISBN 9780128001738.

ORIGINAL ARTICLE

Pigs

Effects of High-Dose Vitamin D3 Supplementation on Pig Performance, Vitamin D Content in Meat, and Muscle Transcriptome in Pigs

Anna Steg¹  | Maria Oczkiewicz¹  | Małgorzata Świątkiewicz² ¹Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, Krakowska, Poland | ²Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Krakowska, Poland**Correspondence:** Maria Oczkiewicz (maria.oczkowicz@iz.edu.pl)**Received:** 5 August 2024 | **Revised:** 2 October 2024 | **Accepted:** 19 October 2024**Funding:** This work was supported by the National Science Centre (2019/35/O/NZ9/03148).**Keywords:** biofortified pork | cholecalciferol | feed supplementation | nutrigenomics | RNA-sequencing

ABSTRACT

Vitamin D is known for its role in calcium homeostasis, bone health, and immune function. Recent research has explored its effects on muscle functionality and meat quality in pigs. This study examined high-dose vitamin D3 supplementation in pigs, focusing on growth, blood and tissue vitamin D3 levels, and muscle transcriptome changes. Thirty pigs were divided into three groups, given different amounts of oral supplementation: control, 5000 IU/kg and 10,000 IU/kg vitamin D3. Biochemical and haematological blood parameters, vitamin D content in blood and muscle, and kidney calcium content were evaluated. RNA-seq and qPCR analysed muscle transcriptome changes, while gene set enrichment analysis (GSEA) identified gene expression enrichments. Results showed that 5000 IU/kg vitamin D3 supplementation altered blood parameters like platelet anisocytosis and glucose levels but did not affect body weight, weight gain, or feed intake. Kidney calcium content increased with supplementation. The muscle (*longissimus dorsi*) vitamin D content increased, suggesting the potential for biofortified pork, although still not optimal as a dietary vitamin D source. Transcriptome analysis revealed minimal gene expression changes, with only the interferon-gamma receptor 2 (*IFNGR2*) gene differentially expressed at the highest dose. GSEA indicated enrichment in ATP metabolic processes and electron transport chain genes in the 5000 IU/kg group, and immune system, cholesterol, steroid, and fatty acid metabolism genes in the 10,000 IU/kg group. Despite literature suggesting a role for vitamin D in muscle gene expression and growth improvement, this study found its effects limited.

1 | Introduction

There are many scientific reports on the effects of vitamin D on a number of functions in the body, but only effects on calcium and phosphorus homeostasis, bone health and immune system functioning are well established. Vitamin D deficiency is a global health problem associated with an increased likelihood

of many diseases. The main food sources of vitamin D are oily fish, egg yolks, fortified dairy, sun-dried mushrooms and meat to a lesser extent (Moore, Murphy, and Holick 2005). Due to the lack of adequate availability of solar radiation at many latitudes in the fall and winter seasons, there is a need for access to food products with a high vitamin content, which would compensate for deficiencies through the diet.

Abbreviations: ADG, average daily gain; ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, one-way analysis of variance; DEGs, differentially expressed genes; ETC, electron transport chain; FCR, feed conversion ratio; GSEA, gene set enrichment analysis; IFNGR2, interferon-gamma receptor 2; LDH, lactate dehydrogenase; PDW, platelet size heterogeneity index; RDA, recommended dietary allowance; RDWC, red cell distribution width; VDR, vitamin D receptor.

One of the foods naturally containing vitamin D is pork, although offal contains much greater amounts than muscle meat (Schmid and Walther 2013). Notably, the amount of vitamin D in pork products is relatively low (1.0–23.0 µg/kg), possibly because the animals are kept indoors without access to sunlight (Larson-Meyer et al. 2017; Schmid and Walther 2013). Thus, one solution might be to fortify pig diets with vitamin D to obtain so called vitamin D biofortified pork, that is a higher vitamin D content in the meat of indoor reared pigs (Duffy et al. 2018). The maximum limit for vitamin D supplementation (vitamin D3 or equivalent) in pigs, for a given state of knowledge, is 2000 IU/kg complete feed (50 µg/kg), as regulated by the European Food Safety Authority (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed FEEDAP 2014).

In addition to obtaining biofortified pork, supplementing pigs' diet with vitamin D may also impact animal health, growth performance and pork quality (Duffy et al. 2018; Upadhaya et al. 2021, 2022). It was established in the case of beef cattle, where vitamin D supplementation at high doses improved beef tenderness (reduced shear force values) and vitamin D concentration in meat (Karges et al. 2001; Montgomery et al. 2000). A study conducted on swine using doses of cholecalciferol up to 3000 IU/kg showed to improve meat texture parameters such as shear force and cohesiveness (Wierzbicka et al. 2023). The supplementation of 25(OH)D3 in sow and pig diets improved carcass characteristics by enhancing water-holding capacity and reducing drip loss of pork meat (Upadhaya et al. 2022). Similar studies that were carried out on pigs in which supranutritional doses of vitamin D3 (40,000 and 80,000 IU/kg) were used improved the pork colour, increased the pH, and increased the level of vitamin D3 in the meat significantly, but did not affect the tenderness of the meat and in the case of the highest dose retarded the animals' growth (Wilborn et al. 2004). In general, vitamin D is considered safe across a wide range of concentrations; however, there are concerns that such high doses might cause hypercalcaemia and contribute to coronary atherosclerosis (Lauridsen 2014; Toda et al. 1985). A study conducted by Burild et al. with lower doses of vitamin D3 (from 200 to 2000 IU/kg) revealed an increase in the vitamin content in the meat. However, these values were still low (on average 0.45 µg/kg in red muscle tissue for the highest dose used), which did not allow the recognition of pork as a good source of vitamin D in the diet (Burild et al. 2016). This indicates the need for further research to determine the appropriate vitamin D3 dose in the diet of pigs, which would increase the content of this vitamin in pork and improve its qualitative characteristics while avoiding the adverse effects associated with the potential toxicity of excess vitamin D and the high costs associated with such supplementation in animal husbandry.

Other reasons for investigating higher doses of vitamin D than recommended are studies that suggest that only high levels of vitamin D in the body may be effective in treating certain long-term diseases (Spedding et al. 2013).

Vitamins are a vital nutrient that is receiving growing recognition in sports nutrition. The presence of vitamin D3 receptors in human skeletal muscle tissue suggests that 1,25-dihydroxy vitamin D directly influences the functioning of skeletal muscle (Montenegro et al. 2019). Animal studies have revealed that

higher-than-normal doses of vitamin D3 may have ergogenic effects on the human metabolic system, resulting in several physiological enhancements (Dahlquist, Dieter, and Koehle 2015). These elevated doses have shown the potential to improve aerobic capacity, promote muscle growth, enhance force and power production, and accelerate recovery time following exercise (Dahlquist, Dieter, and Koehle 2015; Yoon, Kwon, and Kim 2021). The effects of vitamin D on muscle function, strength and endurance are also often debated in the context of accidents in the elderly. However, research on this topic has produced contradictory results and does not clearly explain the effect of vitamin D on muscle tissue at the molecular level (Autier et al. 2017; Beaudart et al. 2014; Hassan-Smith, Hewison, and Gittos 2017).

To date, few studies have examined the influence of vitamin D on gene expression in muscle at the comprehensive whole-transcriptome level. The outcomes of these studies have demonstrated minimal to no significant impact of vitamin D on gene expression (Hangelbroek et al. 2019; Mølmen et al. 2021). Another study involving swine, including calcidiol in the diet, resulted in minimal alterations in genes responsible for myogenesis, energy production and muscle fibre formation (Wierzbicka et al. 2023).

Higher-than-standard doses of vitamin D have been tested in pigs, affecting various health parameters and immune responses, but with inconclusive results (Smolucha, Steg, and Oczkowicz 2024). High doses of vitamin D, like 5000 or 10,000 IU, have proved safe and beneficial in some clinical trials however not in those connected to bone health (Amir et al. 2010; Burt et al. 2019; DeGiorgio et al. 2019; Heaney 2008; van Helmond et al. 2022). While the adverse effects of vitamin D deficiency are well-established, much remains unknown about the impact of high doses and elevated levels of vitamin D in the blood. Hence, the idea for our nutritional experiment, where higher than standard doses of vitamin D3 (5000 IU/kg of feed and 10,000 IU/kg of feed) were used for 3 months. This study aimed to determine the effect of feed supplementation with vitamin D3 on the entire transcriptome of muscle tissue, biochemical parameters of pig blood and vitamin D content in meat. Previous muscle transcriptome studies have primarily investigated the effects of recommended or slightly increased doses of vitamin D. In contrast, our research aimed to assess the impact of significantly higher doses of vitamin D. Preliminary results concerning the effect of this supplementation on liver and adipose tissue were published in abstract form at the 2022 EAAP conference (Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, n.d., 264, 268). Vitamin D changes the expression levels of genes in the liver that are associated mostly with fatty acid metabolism, such as β-oxidation. In the case of adipose tissue, no differentially expressed genes (DEGs) were found. Our findings have the potential to provide insights into the mechanisms through which vitamin D impacts the organism.

2 | Materials and Methods

2.1 | Animal Experiment

All procedures in this study involving the use of live animals were agreed upon by the 1st Local Ethics Committee for

Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 427/2020, date 22.07.2020). Throughout the experimental period, a veterinarian regularly monitored the health status of postweaning pigs.

The feeding experiment and slaughter were conducted at the National Research Institute of Animal Production (Experimental Station in Pawłowice). The animal material consisted of 30 castrated male (barrows) Polish Large White fatteners. The pigs were housed in individual cages and had adequate access to feed and free access to water. On the 84th day of life, the pigs were assigned to one of three equal experimental groups (A, B or C) by stratified randomization. Blood samples were collected at the beginning of the feeding experiment via venipuncture of

the jugular vein into anticoagulant-filled tubes (EDTA). Blood samples were centrifuged to separate the plasma and stored at -20°C . For the next 90 days, the animals were fed isoprotein and isoenergetic feed mixtures differing only in the amount of vitamin D3 (0/5000/10,000 IU/kg of feed). The vitamin D levels in the feed mixtures were controlled with premixes that contained the appropriate amount of vitamin D (DSM Nutritional Products Sp. z o.o., Mszczonów, Poland). The ingredient composition and nutritional value of the feed mixture are presented in Table 1. Body mass and feed intake were measured individually at the beginning of the experiment and on the last day. The ADG and feed utilization were calculated. After finishing the trial, the pigs were transported to the slaughterhouse and slaughtered with an approved standard method by exsanguination

TABLE 1 | Ingredients (%) of diets in the experiment.

Parameter	Group A [†]	Group B [†]	Group C [†]
<i>Grower phase</i>			
Barley	36.06	36.06	36.06
Wheat	20.00	20.00	20.00
Corn	10.00	10.00	10.00
Wheat bran	10.00	10.00	10.00
Soybean meal	17.00	17.00	17.00
Rapeseed oil	4.00	4.00	4.00
1-Ca phosphate	0.55	0.55	0.55
Feed chalk	1.20	1.20	1.20
Salt	0.25	0.25	0.25
L-Lysine	0.26	0.26	0.26
DL-Methionine	0.09	0.09	0.09
L-Threonine	0.09	0.09	0.09
Vitamin-mineral premix (for Group A)	0.50	—	—
Vitamin-mineral premix (for Group B)	—	0.50	—
Vitamin-mineral premix (for Group C)	—	—	0.50
<i>Finisher phase</i>			
Barley	41.53	41.53	41.53
Wheat	20.00	20.00	20.00
Corn	10.00	10.00	10.00
Wheat bran	10.00	10.00	10.00
Soybean meal	13.00	13.00	13.00
Rapeseed oil	3.00	3.00	3.00
1-Ca phosphate	0.36	0.36	0.36
Fodder chalk	1.10	1.10	1.10
Salt	0.25	0.25	0.25
L-Lysine	0.20	0.20	0.20
DL-Methionine	0.03	0.03	0.03
L-Threonine	0.03	0.03	0.03
Vitamin-mineral premix (for Group A)	0.50	—	—
Vitamin-mineral premix (for Group B)	—	0.50	—
Vitamin-mineral premix (for Group C)	—	—	0.50

[†]A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed.

after being electrically stunned with high-voltage electric tongs. Blood samples and muscle samples were collected immediately after slaughter. Blood samples were collected into anticoagulant-filled tubes (EDTA), centrifuged to separate the plasma, and stored at -20°C . For NGS analysis, muscle samples (from the *longissimus dorsi*) were collected into RNAlater-filled tubes and stored at -20°C . Muscle samples for vitamin D3 content analysis were collected and stored at -20°C .

2.2 | Vitamin D Content in Blood and Meat

The quantification of vitamin D content in blood was performed by chemiluminescent method with the use of a MAGLUMI 25-OH Vitamin D (CLIA) kit on MAGLUMI 1000 instrument by an external company (ANCHEM Laboratory, 20 Fredry Street, Katowice, Poland). A total 25-OH vitamin D was obtained in ng/mL, and the measurement range of the method was 3–150 ng/mL.

Determination of the vitamin D content in the muscle samples was performed by semi-preparative normal-phase HPLC, followed by an analytical reverse-phase HPLC method (PN-EN 12821:2009) at an external company (J. S. Hamilton Poland Laboratory, 180 Chwaszczyńska Street, Gdynia, Poland). The result vitamin D3 was obtained in $\mu\text{g}/100\text{ g}$, the minimum detection level was 0.25 $\mu\text{g}/100\text{ g}$.

2.3 | Calcium Content in Kidney Tissues

Calcium content in the kidneys was quantified via flame atomic absorption spectrophotometry (SOP M.008b, ed.6) at the Central Research Laboratory of the National Research Institute of Animal Production in Aleksandrowice. The total calcium concentration was obtained in g/kg.

2.4 | Blood Analysis

Morphological parameters were examined in complete blood samples with a Vet Mythic 18 automatic haematology analyser (Orphée C2 Diagnostics, France) as described previously (Szczeplaniak et al. 2023). The parameters evaluated were: total white blood cell count, lymphocytes, monocytes, granulocytes, red blood cells count, haemoglobin content, haematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin, red cell distribution width (RDWC), number of platelets and their mean volume, plateletcrit and platelet size heterogeneity index (PDW).

Biochemical parameters were assessed in serum samples utilizing the colorimetric method, with Cormay test kits (Lublin, Poland) and a BS-180 biochemical automatic analyser (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co. Ltd., China). The analysed biochemical parameters included total cholesterol (CHOL), high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, triacylglycerides, lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), glucose (GLU), albumin, creatinine, urea, total protein, calcium (Ca), phosphate (P) and magnesium (Mg).

2.5 | RNA Isolation

RNA was isolated from muscle samples using a Total RNA Mini kit (A&A Biotechnology). Quantitative evaluation of the isolated RNA was performed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The RNA Integrity Number (RIN) value was determined using a TapeStation2200 (RNA tape, Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol, and the RIN was greater than 7.2.

2.6 | NGS

cDNA libraries were prepared using a QuantSeq. 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD (Lexogen) according to the manufacturer's protocol, starting with 300 ng total RNA. Each sample had a unique barcode. The quality and quantity of the cDNA libraries were assessed by a Qubit fluorimeter (Thermo Scientific, USA) and TapeStation2200 system (D1000 tape, Agilent Technologies, USA). The final concentrations of the cDNA libraries were normalized to 2 nM, after which they were pooled. The libraries were diluted according to the cluster generation protocol and the next-generation sequencing was performed on an Illumina NextSeq. 550 instrument (Illumina, USA), using the High-Output v2.5 kit (Illumina, USA) in single read mode.

2.7 | Bioinformatic Analysis

The processing of the NGS files was performed with the QuantSeq Data Analysis Pipeline on the BlueBee Genomics Platform. The pipeline processes the FASTQ files through trimming with BBDuk, read alignment with STAR to the swine genome (Sscrofa11.1), and quality control steps to generate gene read counts with HTSeq. Low-quality raw reads samples were filtered out. The minimum number of reads was set to 9 mln. Then the differential expression analysis was performed with the DESeq2 pipeline. After differential expression analysis, genes with $\text{padj} < 0.05$ (FDR—false discovery rate) and no fold-change threshold were regarded as DEGs. The functional analysis was performed with STRING software (<http://string-db.org>, version 12.0).

2.8 | Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

GSEA was performed with STRING software analysis (<http://string-db.org>, version 12.0). From the whole data set, genes with a base mean value of less than 10 were removed, and by ranking the genes by the p -value, a list of genes with their corresponding log2FoldChange values was created.

2.9 | Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Validation of the RNA-seq results was performed by qPCR. RNA samples (300 ng of total RNA) were reverse-transcribed with the use of a high-capacity RNA to cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, USA). For the interferon-gamma receptor 2 (*IFNGR2*) and the *VDR* gene, the qPCR was performed using TagMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems,

Lithuania) and TagMan gene expression assay (Ss03386849, Ss03385197; Thermo Fisher Scientific, USA) on a QuantStudio 7-flex instrument (Thermo Fisher Scientific, USA) according to a manufacturer's protocol. For the *MYH2*, *CRYAB*, *FNDC5* and *CS* genes, qPCR was performed in triplicate using RT PCR Mix EvaGreen (A&A Biotechnology, Poland) on a QuantStudio 7-flex instrument (Thermo Fisher Scientific, USA) according to a manufacturer's protocol. Gene-specific primers are listed in Table 2. The data were normalized to the *OAZ1* reference gene. The relative expression levels were calculated using the delta-delta CT method (Livak and Schmittgen 2001).

2.10 | Statistical Analysis

All the statistical analyses were performed using the SAS Enterprise Guide software (SAS Institute Inc.; version: 7.1). Statistical analyses of blood parameter quantification, 25(OH)D3 and vitamin D3 concentrations, calcium concentration, and qPCR results were conducted by one-way analysis of variance (ANOVA) if a normal distribution was present, and non-parametric ANOVA was used if the distribution was not normal. The comparison of means between the experimental groups was performed using Duncan's multiple range test at the $p \leq 0.05$ level of significance. The results are reported as the means.

2.11 | Data Visualization

Figures 2 and 5 were created with the SAS Enterprise Guide software (SAS Institute Inc.; version: 7.1). Figure 4 was created with R (version 4.4.0) utilizing the 'circlize' package. Figure 1 was created with the use of BioRender.com.

3 | Results

3.1 | Morphological, Biochemical, Body Weight and Feed Intake Analyses

A supplementation feed mixture for pigs with different levels of vitamin D3 resulted in a decrease in several morphological blood parameters, such as platelet anisocytosis ($p = 0.0042$) and the RDWC for the group supplemented with 5000 IU/kg feed ($p = 0.035$) (Table 3). In addition, changes in biochemical parameters, such as a decrease in GLU ($p = 0.022$), and in the case of vitamin D supplementation in the amount of 5000 IU/kg of feed, also an increase in the level of ALT ($p = 0.028$) and LDH ($p = 0.049$) were noticed (Table 4). However, no statistically significant differences were found in body weight, weight gain,

feed intake, or feed utilization for any of the experimental groups (Table 5).

3.2 | Vitamin D3 Content in Blood and Meat Samples

Supplementation with 5000 IU/kg feed resulted in an increase of more than threefold, and supplementation with 10,000 IU/kg of feed resulted in a fourfold increase in 25(OH) vitamin D in the blood compared to that in the control group (without supplementation) ($p = 0.0001$) (Table 6).

Supplementing the pig diet with 5000 IU/kg feed of vitamin D3 resulted in a 35% increase in the vitamin D content in muscle samples from pork loin, while supplementation with 10,000 IU/kg feed of vitamin D3 increased the content by 162% (Table 7).

Since concentrations of vitamin D3 were below the LOD for most samples in Group A, a constant value that equals the

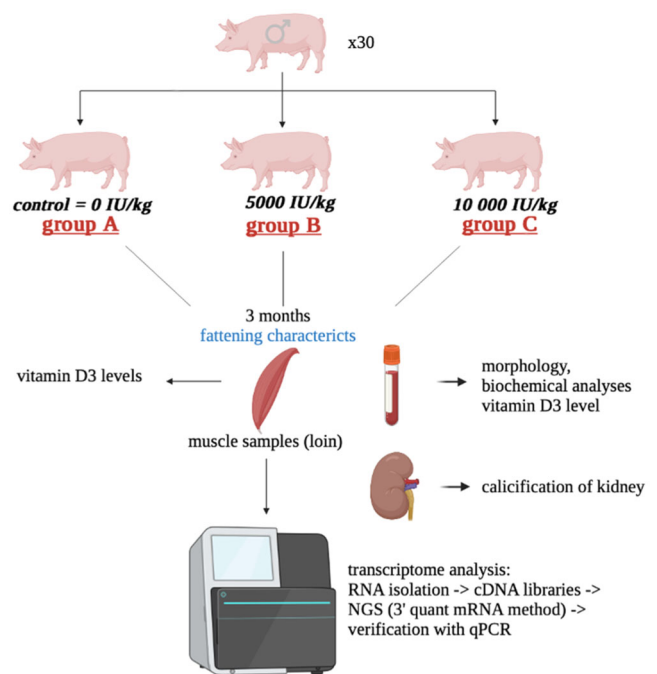


FIGURE 1 | Experimental design for evaluating the effects of vitamin D3 supplementation. Doses are given as IU of vitamin D3 per kg of feed. At the experiment's beginning and end, data such as body weight or feed intake and blood samples for basic blood tests were taken. The vitamin D content was measured both in blood and loin. The muscle sample was collected for differential gene expression analysis. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

TABLE 2 | Sequences of primers used in the qPCR analysis.

Gene name	Forward sequence 3'-5'	Reverse sequence 5'-3'
<i>CS</i>	AGGAGTGCTACTCGCCCG	AGCCAAAATGTCTTTTAAGTTCGTG
<i>CRYAB</i>	CCAGCTGGATTGACACTGGG	ACCATGTTTCATCCTGGCGCT
<i>MYH2</i>	GAAGCAGGGGCGACTTTGAC	GGGTTGACGGTGACACAGAA
<i>FNDC5</i>	CATCATCAAGGACAACGAGC	CATATCTTGCTTCGGAGGAG
<i>OAZ1</i>	TGCAGCGGATCCTCAACA	TGGGTTTATCCCCCTCCTTCT

TABLE 3 | Effect of vitamin D3 supplementation on morphological parameters.

Parameter	Group A [†]	Group B [†]	Group C [†]	RMSE	p-value
WBC, 10 ³ /μL	15.77	18.09	16.08	6.03	0.674
LYM, 10 ³ /μL	7.00	8.00	6.85	3.07	0.690
MON, 10 ³ /μL	0.74	0.94	0.73	0.40	0.438
GRA, 10 ³ /μL	7.20	9.01	8.50	4.82	0.731
RBC, 10 ⁶ /μL	6.79	6.01	6.05	0.78	0.074
HGB, g/dL	14.94	14.05	13.50	1.49	0.160
HCT, %	42.77	40.73	40.46	5.07	0.577
MCV, μm ³	65.05	68.04	66.98	3.97	0.202
MCH, qg	22.27	23.49	22.38	1.59	0.200
RDWC, %	18.97 ^a	17.70 ^b	18.54 ^a	1.11	0.036
PLT, 10 ³ /μL	195.73	192.77	240.83	93.21	0.423
MPV, μm ³	6.94	6.67	6.73	0.57	0.565
PCT, %	0.13	0.13	0.16	0.06	0.423
PDW, %	25.81 ^a	19.92 ^b	21.33 ^a	3.01	0.004

Note: a, b—mean values in the same row marked with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$.

[†]A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed.

TABLE 4 | Effect of vitamin D3 supplementation on biochemical parameters.

Parameter	Group A [†]	Group B [†]	Group C [†]	RMSE	p-value
GLU, mg/dL	108.00 ^a	98.00 ^b	125.00 ^a	20.90	0.022
CHOL, mg/dL	90.00	88.00	94.00	15.40	0.643
TG, mg/dL	43.00	41.00	51.00	11.90	0.152
HDL, mg/dL	57.40	51.70	56.30	9.43	0.511
LDL, mg/dL	25.00	29.50	30.60	11.66	0.385
ALT, U/L	35.00 ^a	49.00 ^b	38.00 ^a	11.10	0.018
UREA, mg/dL	29.20	29.60	25.70	6.45	0.346
ALB, g/dL	4.17	3.95	4.01	0.43	0.506
TP, g/dL	7.67	7.50	7.53	0.55	0.755
LDH, U/L	11760 ^a	1425.00 ^b	1184.00 ^a	242.80	0.048
Ca, mg/dL	10.96	11.31	11.26	0.68	0.464
P, mg/dL	8.74	8.98	9.07	1.92	0.924
Mg, mg/dL	2.18	2.20	2.26	0.24	0.715
CREA, mg/dL	1.51	1.55	1.54	0.25	0.901

Note: a, b—mean values in the same row marked with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$.

[†]A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed.

TABLE 5 | Effects of vitamin D supplementation on pig performance parameters.

Parameter	Group A [†]	Group B [†]	Group C [†]	RMSE	p-value
Body weight 1st day of experiment (kg)	31.50	30.70	30.60	3.27	0.798
Body weight end of experiment (kg)	99.90	97.90	99.40	8.54	0.863
Average daily weight gain (g)	781.71	768.61	786.12	102.71	0.925
Total feed intake during experiment (kg)	211.50	205.00	216.00	18.35	0.415
Feed utilization per 1 kg of body weight gain (kg)	3.10	3.12	3.16	0.34	0.916
Weight of half carcasses (kg)	75.00	73.29	76.33	7.25	0.647

[†]A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed.

TABLE 6 | 25(OH)D3 content in blood.

	Group A [†]	Group B [†]	Group C [†]	<i>p</i> -value	RMSE
25(OH)D3 (ng/mL)	34.40	108.73	139.97	0.0001	14.71

[†]A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed.

TABLE 7 | Vitamin D3 content in longissimus dorsi tissue.

	Group A [†]	Group B [†]	Group C [†]	<i>p</i> -value	RMSE
Vitamin D3 (μg/100 g)	0.19	0.25	0.49	0.0001	0.13

[†]A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed.

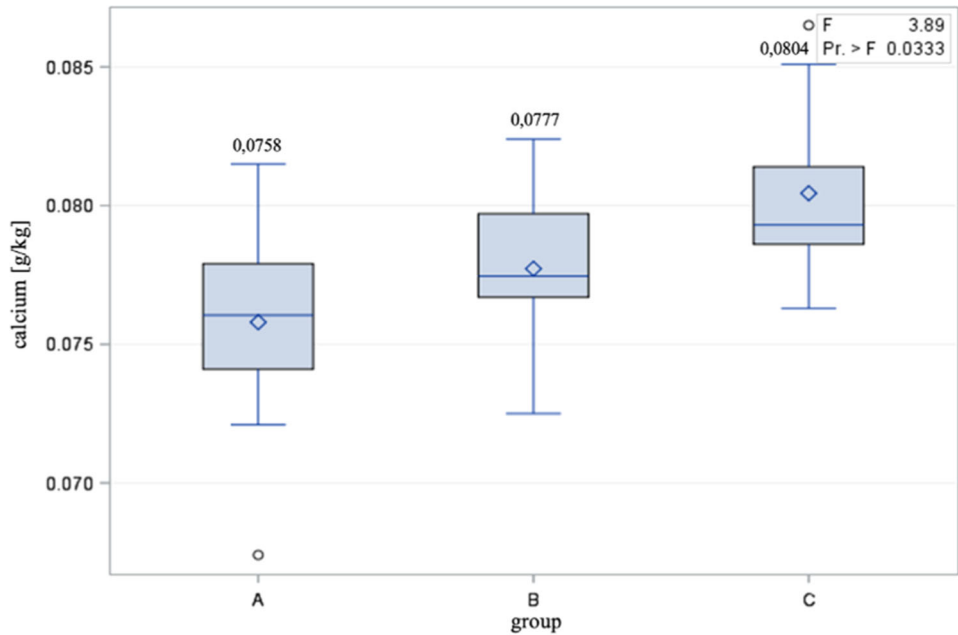


FIGURE 2 | Box plot representing calcium concentration in the kidney (g/kg) across experimental groups. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed. The boxes show the interquartile range (IQR), with the horizontal line representing the median and the diamond shape indicating the mean value. The whiskers extend to the minimum and maximum values within 1.5 times the IQR. Outliers are shown as individual points. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpn.14066)]

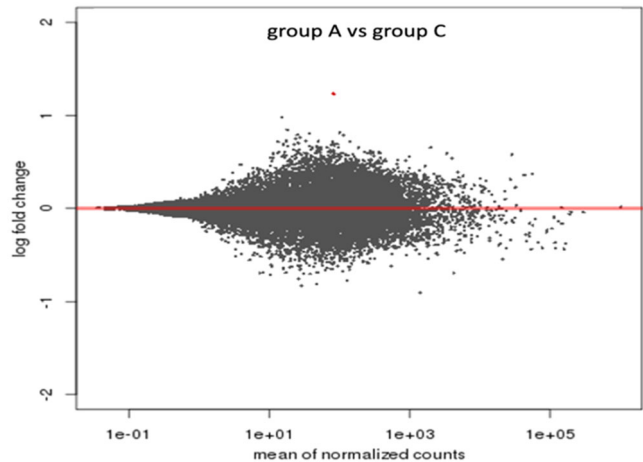


FIGURE 3 | MA plots of the expression level (mean of normalized counts) and ratio (Log2FC) for each gene in muscle tissue (comparison between Group A [no supplementation] and Group C [10,000 IU vit. D3/kg of feed]). A DEG is shown in red. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpn.14066)]

lowest detectable concentration divided by the square of two was set for these samples.

3.3 | Calcium Content in the Kidney

Supplementation of the pig's diet with vitamin D3 caused elevated kidney calcium levels for both supplementation doses ($p = 0.033$) (Figure 2).

3.4 | NGS Results

After sequencing the 3' quant mRNA cDNA libraries, five samples did not result in minimal read counts and were no longer subjected to differential expression analysis. Twenty-five samples were taken for further analysis. All the samples passed the quality control. Analysis of the muscle transcriptome profiles of the pigs did not reveal many differences between the control and experimental groups. The only DEG was discovered in the

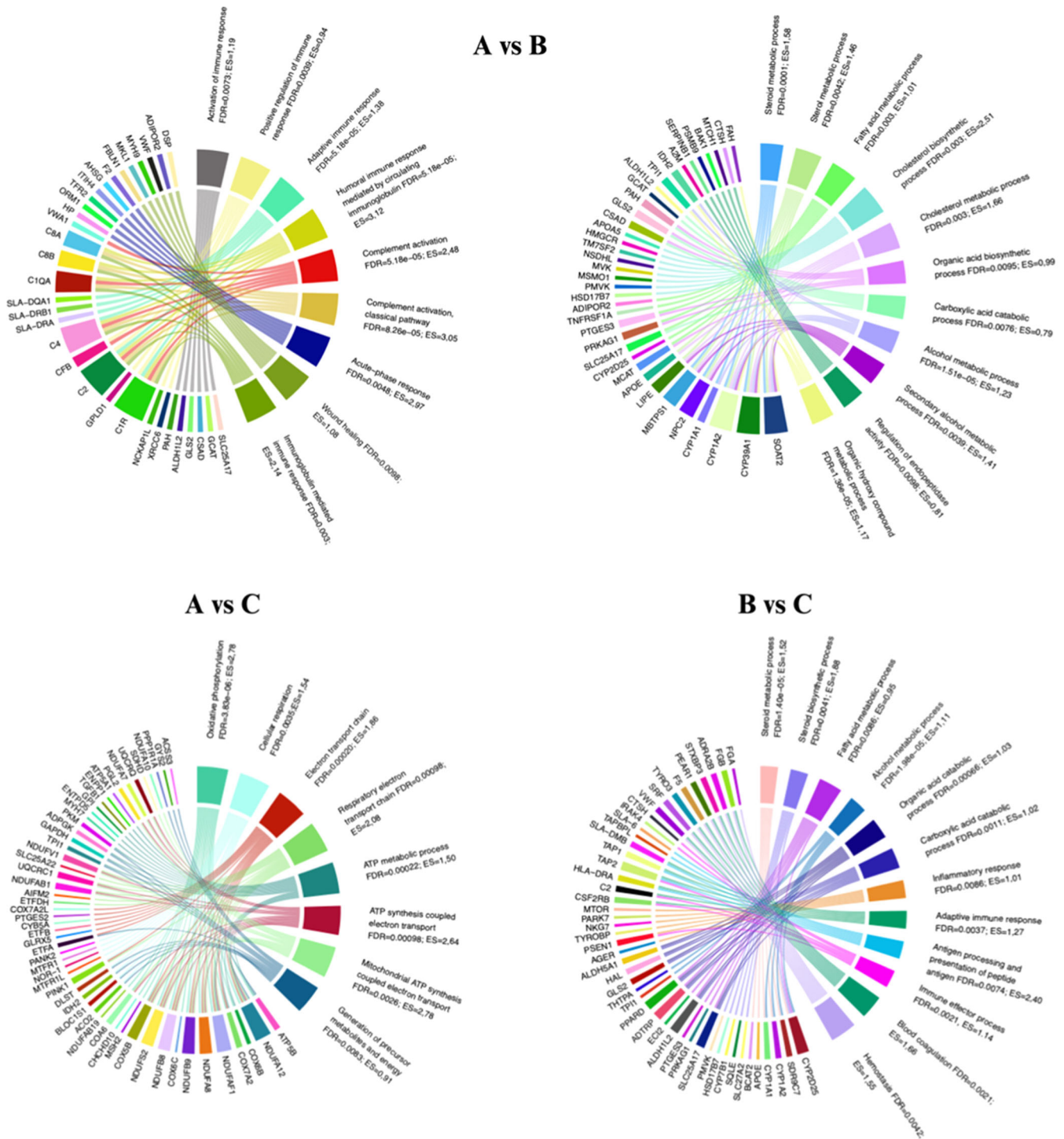


FIGURE 4 | Enriched biological processes and top associated genes altered by vitamin D supplementation in muscle sample. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed. ES, Enrichment Score; FDR, false discovery rate. For all the processes, the direction was top, meaning the inhibition of the process. The GSEA analysis was performed on STRING software, and the data visualization was created with R. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

comparison between the control group and the group supplemented with 10,000 IU/kg (Figure 3). The high dose of vitamin D3 supplementation resulted in the upregulation of the *IFNGR2* (ENSSSCG00000034378) gene (p adjusted = 0.002, $\log_2FC = 1.388$). To verify in depth whether supplementation with high doses of vitamin D3 has any effect on a specific signalling pathway or functional group of genes, the GSEA was performed (Figure 4). In the group supplemented with

10,000 IU/kg, the most affected biological processes were mitochondrial ATP synthesis coupled with electron transport, oxidative phosphorylation, and other processes connected with the respiratory chain. In the group supplemented with 5000 IU/kg, annotated biological processes generally concerned immune system functioning (such as acute-phase response, complement activation) and steroid metabolic processes (such as cholesterol biosynthesis process).

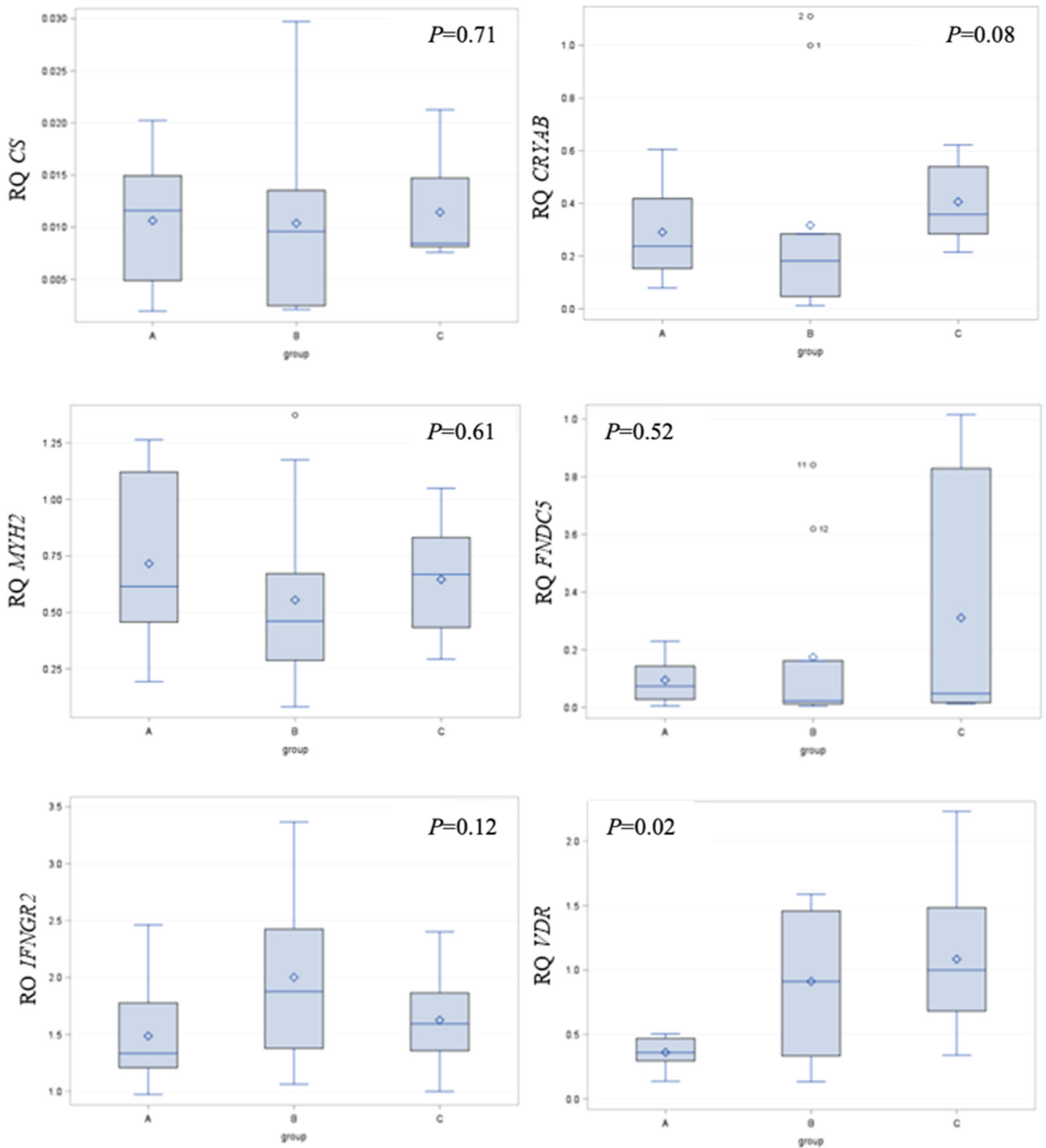


FIGURE 5 | mRNA expression (based on RQ) of *CS*, *CRYAB*, *IFNGR2*, *MYH2*, *VDR* and *FNDC5* genes across experimental groups. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D3/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D3/kg of feed. The boxes show the interquartile range (IQR), with the horizontal line representing the median and the diamond shape indicating the mean value. The whiskers extend to the minimum and maximum values within 1.5 times the IQR. Outliers are shown as individual points. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

3.5 | qPCR Results

Genes for analysis using the qPCR method were chosen based on literature, which suggested that vitamin D might impact their expression levels in muscle tissue (Hangelbroek et al. 2019;

Nadimi et al. 2019; Upadhaya et al. 2022). Our aim was to determine whether we could identify changes in expression by applying specific primers and employing an alternative methodology, even in the absence of differences noted during transcriptome analysis through sequencing. The *IFNGR2* gene was

tested to validate the RNA-seq results. However, quantitative PCR for 30 samples did not reveal an effect of vitamin D supplementation on the gene expression of any of the tested genes, except for the *VDR* gene (Figure 5).

4 | Discussion

4.1 | High Doses of Vitamin D3, Growth and Health Parameters

During the course of the experiment, we did not record any serious health problems in the animals in any of the experimental groups. Animals from all groups maintained sufficient levels of vitamin D in the blood. Adequate vitamin D levels can improve feed conversion ratio (FCR) efficiency and promote overall growth performance, positively affecting growth and weight gain in pigs. However, the animals did not differ in the growth rate or feed intake, which also indirectly proves the lack of health effects of supplementation. Studies focusing mainly on gestating sows, farrowing, and weaning piglets suggest that especially 25(OH)D3 supplementation improves the growth rate and feed efficiency (Álvarez-Delgado et al. 2023; Upadhaya et al. 2021, 2022). Vitamin D was also shown to attenuate growth depression induced by porcine rotavirus, as shown in a study by Zhao, where pigs received 5000 IU/kg vitamin D supplementation in their diet (Zhao et al. 2014). A possible explanation for the improvement in growth performance might be partly the activation of the growth hormone/insulin-like growth factor-1 pathway, which promotes bone, skeletal muscle, and general body growth (Upadhaya et al. 2022). On the other hand, in vitro and minor clinical studies suggest that vitamin D contributes to reducing body mass. Karges et al. also showed such effects of vitamin D supplementation in cattle (Karges et al. 2001). Moreover, feeding pigs supranutritional doses of vitamin D3 (80,000 IU/kg of feed) tended to decrease ADG (average daily gain) (Wilborn et al. 2004). Our study revealed no significant differences in feed intake or body weight between the experimental and control groups. Our results are in accordance with those obtained by the Duffy group, which showed that the application of vitamin D in the diet did not significantly change the FCR or the final weight of the pigs (Duffy et al. 2018). There are also other studies that did not confirm any effect of vitamin D supplementation on body weight or feed intake, suggesting that the source, the form, and the dose of vitamin D might have different effects, which need to be further evaluated (Yang et al. 2019; Yang and Ma 2021). For instance, the Zhou group indicated that including 25(OH)D3 in the diet of piglets had a stronger positive effect than vitamin D3 on the average daily feed intake, ADG, and body weight than vitamin D3 (Zhou et al. 2022).

Supplementation with 5000 IU/kg of vitamin D resulted in changes in several blood parameters (RDWC, PDW, serum GLU levels, ALT, LDH). For all these parameters, we observed significant differences between the group supplemented with 5000 IU/kg of vitamin D and the groups not supplemented or supplemented with 10,000 IU/kg, but there were no differences between unsupplemented animals and animals supplemented with the high vitamin D dose. These findings suggest

that these changes might not be directly associated with vitamin D supplementation. Instead, a potential explanation for fluctuations in GLU or liver enzymes could be the consumption of a high-calorie diet provided to promote rapid weight gain in the fattened animals (de Moura e Dias et al. 2021). In each of the studied groups, several deviating individuals were found.

4.2 | Supplementation With High Doses of Vitamin D3 and Vitamin D3 in Blood and Tissues

The content of vitamin D in the serum blood increased with increasing supplementation dose, showing that the feeding experiment was successful. According to the National Institute of Health Office of Dietary Supplements guidelines for vitamin D levels, Group A is sufficient (34.4 ng/mL), while both experimental groups are above the recommended levels, which should draw attention to potential toxicity (Office of Dietary Supplements 2024).

The feeding experiment increased vitamin D levels in pig meat (*longissimus dorsi* muscle), proving the possibility of obtaining biofortified pork upon supplementation. We measured the vitamin D3 content in the *longissimus dorsi* muscle since it is a major component of the pork part consumed by humans. The recommended dietary allowance (RDA) of vitamin D for most of the population is 600 IU/day (15 µg/day) (Office of Dietary Supplements 2024; Ross et al. 2011). Pork consumption varies greatly between races and ethnicities. The average annual pork consumption in the United States is 23.13 kg per person, corresponding to 63 g per day (Davis and Lin 2005). The consumption of a typical serving size of pork achieved after supplementation corresponded to 1.1% and 2% of the RDA for the B and C groups, respectively. This indicates that pork, even when animals are supplemented with high doses, cannot be considered a good source of vitamin D for achieving optimal levels of vitamin D. Significantly higher values of vitamin D in pork were obtained by the Wilborn group through supplementation with supranutritional doses (Wilborn et al. 2004). The vitamin D3 content in the loin after feeding with 40,000 IU/kg feed was 6.84 µg/100 g, and after feeding with 80,000 IU/kg of feed was 15.3 µg/100 g. However, even the control group in that experiment showed a much greater content of vitamin D3 (1.39 µg/100 g) than that in our experiment and the literature. The vitamin D3 content in *longissimus* assessed by the Duffy group after the addition of 50 µg of vitamin D3/kg of feed was 0.14 µg/100 g (Duffy et al. 2018). The vitamin D content in the control group in our experiment was ~1/3 higher, but it should be stressed that many of the samples in this group were below the LOD for the chosen method. Therefore, the value is not as precisely estimated. It should also be noted that some studies suggest that to better reflect the actual impact of given food on vitamin D intake, the total vitamin D activity (vitamin D3 + 25-OH-D3 (× 5) + vitamin D2 + 25-OH-D2 (× 5)) or total vitamin D content (vitamin D3 + 25-OH-D3) should be calculated. This is because the vitamin D activity of meat might also be contributed by other forms of vitamin D. Studies suggest a positive, linear correlation between the serum 25(OH)D3 and the vitamin D3 content in meat when vitamin D3 is added to the feed (Barnkob et al. 2019; Burild et al. 2016).

4.3 | Supplementation With High Doses of Vitamin D3 and Calcium Content in the Kidney

Excessive amounts of vitamin D can lead to hypercalcaemia (an excessive calcium level in the blood). Hypercalcaemia might cause damage to various organs, including the kidneys. Our study observed elevated calcium levels in the kidneys upon vitamin D supplementation of 2.5% and 6% in the B and C groups, respectively. The normal range for total calcium in the blood serum is typically between 8.6 and 10.3 mg/dL (UCLA, n.d.); the calcium content assessed for our experimental groups was above the upper normal limit, which indicates a potentially harmful effect of supplementation with high doses of vitamin D on kidney function. However, the highest content of blood calcium was found in the group supplemented with 5000 IU/kg vitamin D3, which suggests that this effect might not be driven by vitamin D content itself.

4.4 | Supplementation With High Doses of Vitamin D3 and Muscle Transcriptome

Cell culture studies have shown that vitamin D signalling alters the expression of several genes in skeletal muscle cells, affecting proliferation, differentiation, myogenesis, myotube size and cell cycle progression (Ceglia and Harris 2013; Girgis et al. 2014; Olsson et al. 2016). While some clinical trials and meta-analyses suggest that vitamin D supplementation reduces the risk of falls in older individuals and improves muscle strength or physical performance in athletes, others do not (Bischoff-Ferrari et al. 2004; Chiang et al. 2017; Mølmen et al. 2021; Vaes et al. 2018). These conflicting data and unclear knowledge about the precise mechanisms by which vitamin D signalling influences muscle development and function prove the need for further investigation of the molecular effects of vitamin D. Scientific literature on the relationship between vitamin D and muscle gene expression in vivo is limited. The results of our RNA-seq study indicate that vitamin D supplementation, even at high doses, has little effect on gene expression in the whole transcriptome of muscle. Comparisons between all groups (A vs. B, B vs. C, A vs. C) revealed only one DEG (FDR < 0.05) in RNA-seq. The altered gene encoding IFNGR2 was found to be upregulated upon the highest supplementation. The IFNGR2 protein is involved in the binding and signalling of IFN- γ . It forms a heterodimeric receptor complex with the IFNGR1 subunit, which is necessary to activate downstream signalling pathways in response to IFN- γ binding. This activation leads to the modulation of immune responses and the induction of an antiviral state in cells. The mechanism of action of IFN- γ has been proven to involve the vitamin D pathway, as in vitro studies have shown that vitamin D inhibits IFN- γ production (Cippitelli and Santoni 1998; Ragab et al. 2016). Despite not achieving statistically significant differences between the different experimental groups according to the qPCR results for the *IFNGR2* gene, we still observed a slight change in the same direction as the RNA-seq results for the supplemented group.

In vitro studies have proposed a role for vitamin D signalling in skeletal muscle function, mostly due to the studies suggesting that vitamin D receptor (VDR) is present in muscle cells (Hangelbroek et al. 2019; Sriksuea et al. 2012). The VDR is a

nuclear receptor that, upon binding with the active form of vitamin D (1,25-dihydroxy vitamin D3), influences the transcription of various genes. Our study observed an upregulation of the *VDR* gene in muscle tissue upon vitamin D supplementation. It should be noted that the CT (threshold cycle) value for the *VDR* gene in RT-PCR ranged between 32 and 35 cycles, meaning that the *VDR* gene was present in relatively low abundance in the muscle samples. This finding aligns with existing literature that underscores the role of the VDR in muscle function. In muscle tissue, VDR activation is thought to contribute to muscle strength, function, and repair mechanisms (Girgis et al. 2014). Increased expression of VDR has been linked to improved muscle cell proliferation, differentiation, and overall muscle health (Dzik and Kaczor 2019; Usategui-Martin et al. 2022). However, the existing data is conflicting, raising questions about whether vitamin D's effects on muscle are direct or indirect; moreover, the differential expression of *VDR* in muscle tissue—affected by factors such as age, sex, physical activity, species-specific differences and various stages of muscle differentiation—underscores the complexity of vitamin D's role in muscle health (Girgis et al. 2013).

Few studies on 25(OH)D3 supplementation have shown changes in gene expression levels. For instance, the additional 25(OH)D3 supplementation in pigs' diet by the Upadhaya group upregulated the expression of myogenic marker—*MYOD* and downregulated the expressive of the negative regulator of muscle mass—*MSTN*, which suggested that the vitamin D3 metabolite plays a role in improving muscle tissue (Upadhaya et al. 2022). To evaluate the effect of higher doses on myogenesis, we performed RT-PCR analyses of *MYH2* gene expression. This myosin gene helps in muscle contraction, but we did not observe any changes in gene expression ($p = 0.6130$). We also performed the gene expression analysis of *CRYAB* (alpha-B crystallin), which is usually highly expressed in skeletal muscle to protect it from atrophy, as a study on vitamin D-deficient rats revealed its downregulation. The study mentioned above also revealed a decrease in the expression of the key oxidative enzyme—*CS* (citrate synthase) gene. However, we did not observe changes in the gene expression of any of the mentioned genes.

A study performed on mice revealed that vitamin D3 supplementation increased *FNDC5* gene expression in muscle samples (Nadimi et al. 2019). *FNDC5* encodes fibronectin-type III domain-containing 5, the precursor to irisin. Irisin induces the expression of uncoupling protein 1 (UCP1) in adipose tissue, which converts white adipocytes to brown adipocytes, thereby increasing thermogenesis and improving insulin resistance (Nadimi et al. 2019). However, our RT-PCR analysis of *FNDC5* gene expression using RT-PCR did not show any significant changes ($p = 0.4629$).

A clinical trial investigating the effect of vitamin D supplementation on skeletal muscle gene expression in older adults revealed that the effect was very weak. After 25(OH)D3 supplementation, transcriptome analysis corrected for multiple testing using a FDR, which led to no DEGs in frail older adults (Hangelbroek et al. 2019). Another study investigating the effect of higher doses of supplementation with vitamin D3 (2 weeks of 10,000 IU/day, followed by 10 weeks of 2000 IU/day or 13 weeks of combined vitamin D3 2000 IU/day) also did not support a role of vitamin D in muscle functionality.

Gene enrichment analyses indicated that the impact on the muscle transcriptome was primarily limited to gene sets associated with endothelial and cardiovascular functions (Mølmen et al. 2021).

We also performed GSEA on all the sequenced genes that confirmed well established actions of vitamin D. Interestingly, all enrichments were in the same direction—top, indicating inhibition of the genes. For the group supplemented with 5000 IU/kg of vitamin D3, enrichment was found in groups of genes connected with ATP metabolic processes and the electron transport chain (ETC). Vitamin D is indirectly involved in oxidative phosphorylation in cellular respiration in two ways. First, enhancing calcium absorption is vital in maintaining calcium homeostasis. Calcium ions (Ca^{2+}) are crucial for the proper functioning of several components of the ETC. These ions participate in the regulation of ATP synthase, an enzyme complex responsible for ATP production in the final step of the ETC. Therefore, adequate vitamin D levels indirectly support ETC function by promoting optimal calcium availability (Voltan et al. 2023). Second, vitamin D has been shown to affect mitochondrial function and dynamics, even though the exact underlying mechanisms are not fully understood. Vitamin D influences the expression of genes related to mitochondrial biogenesis, energy metabolism, and the oxidative stress response (Voltan et al. 2023).

GSEA of the group supplemented with the highest vitamin D dose revealed two groups of enriched biological processes. First, immune system functioning – includes the immune response, acute-phase activation, wound healing, and complement activation. Vitamin D plays a significant role in immunomodulation. Second, CHOL, steroid, and fatty acid metabolic processes are involved. Although vitamin D's exact mechanisms and implications for fatty acid metabolism are still being studied, vitamin D has been shown to affect the expression of genes involved in lipid metabolism—related to fatty acid synthesis, transport and oxidation (Fatehi-Hassanabad and Chan 2005; Yuan et al. 2022). Moreover, vitamin D has been found to affect adipocyte differentiation (Miao et al. 2020). Vitamin D has been found to influence CHOL metabolism and may regulate the activity of enzymes involved in CHOL biosynthesis, such as HMG-CoA reductase (Warren et al. 2021). Some studies suggest that vitamin D may downregulate the expression of this enzyme, potentially reducing CHOL production. Vitamin D may influence the expression of CHOL transporters, such as ATP-binding cassette transporter A1 and scavenger receptor class B type I (Papotti et al. 2021). These transporters play a role in CHOL efflux from cells and the reverse CHOL transport pathway (Ye et al. 2011). Finally, GSEA also revealed enrichment in alcohol metabolic processes and the regulation of endopeptidase activity.

4.5 | Summary

While vitamin D supplementation had some effect on blood parameters, GLU levels, enzyme levels, and vitamin D3 content, the relationship between high-dose supplementation and various health parameters is complex and not yet fully understood. Both experimental groups had elevated blood vitamin D levels.

The experiment demonstrated that vitamin D levels in pig meat (specifically the *longissimus* muscle) could be increased through supplementation, suggesting the possibility of obtaining biofortified pork. However, even with these high doses of supplementation, pork alone cannot be considered a good source for achieving optimal vitamin D levels. Our RNA-seq analysis demonstrated that vitamin D supplementation, even at high doses, had minimal impact on gene expression in the overall muscle transcriptome. RNA-seq revealed one DEG encoding *IFNGR2*. The *VDR* gene expression was upregulated in a dose-dependent manner. GSEA suggested that vitamin D supplementation influenced oxidative phosphorylation, mitochondrial function, calcium homeostasis, immune system functioning, CHOL and fatty acid metabolism, and alcohol metabolism. The conflicting data and limited understanding of the precise mechanisms by which vitamin D signalling influences muscle development and function highlight the need for further research on the molecular effects of vitamin D to establish the potential benefits and risks associated with high-dose vitamin D3 supplementation.

Author Contributions

The work was mainly conceived and designed by M. O. and A. S. A. S. performed the experiments, collected and analysed experimental data. M. O. managed the project. M. O. and M. Š. contributed materials and analysis tools. A. S. wrote the manuscript and prepared all Figures and Tables 2–7. M. Š. prepared Table 1. All authors reviewed the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the National Science Centre (2019/35/O/NZ9/03148).

Ethics Statement

The study was approved by the 1st Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 427/2020, date 22.07.2020). The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. The study was approved by the 1st Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 427/2020). The authors confirm that they have followed EU standards for the protection of animals used for scientific purposes and feed legislation.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

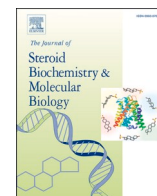
The sequencing data have been submitted to the GEO server (GSE243386) under the link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE243386>.

References

- Álvarez-Delgado, C., I. Ruedas-Torres, J. M. Sánchez-Carvajal, et al. 2023. "Impact of Supplementation With Dihydroxylated Vitamin D3 on Performance Parameters and Gut Health in Weaned Iberian Piglets Under Indoor/Outdoor Conditions." *Porcine Health Management* 9: 15. <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00307-z>.
- Amir, E., C. E. Simmons, O. C. Freedman, et al. 2010. "A Phase 2 Trial Exploring the Effects of High-Dose (10,000 IU/Day) Vitamin D3 in Breast Cancer Patients With Bone Metastases." *Cancer* 116, no. 2: 284–291. <https://doi.org/10.1002/cncr.24749>.

- Autier, P., P. Mullie, A. Macacu, et al. 2017. "Effect of Vitamin D Supplementation on Non-Skeletal Disorders: A Systematic Review of Meta-Analyses and Randomised Trials." *Lancet Diabetes & Endocrinology* 5, no. 12: 986–1004. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30357-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30357-1).
- Barnkob, L. L., P. M. Petersen, J. P. Nielsen, and J. Jakobsen. 2019. "Vitamin D Enhanced Pork From Pigs Exposed to Artificial UVB Light in Indoor Facilities." *European Food Research and Technology* 245, no. 2: 411–418. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3173-6>.
- Beaudart, C., F. Buckinx, V. Rabenda, et al. 2014. "The Effects of Vitamin D on Skeletal Muscle Strength, Muscle Mass, and Muscle Power: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99, no. 11: 4336–4345. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1742>.
- Bischoff-Ferrari, H. A., B. Dawson-Hughes, W. C. Willett, et al. 2004. "Effect of Vitamin D on Falls: A Meta-Analysis." *JAMA* 291, no. 16: 1999–2006. <https://doi.org/10.1001/jama.291.16.1999>.
- Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. n.d. "EAAP Book of Abstracts." Accessed January 21, 2024. <https://www.wageningenacademic.com/doi/book/10.3920/978-90-8686-937-4>.
- Burild, A., C. Lauridsen, N. Faqir, H. M. Sommer, and J. Jakobsen. 2016. "Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in Pork and Their Relationship to Vitamin D Status in Pigs." *Journal of Nutritional Science* 5: e3. <https://doi.org/10.1017/jns.2015.28>.
- Burt, L. A., E. O. Billington, M. S. Rose, D. A. Raymond, D. A. Hanley, and S. K. Boyd. 2019. "Effect of High-Dose Vitamin D Supplementation on Volumetric Bone Density and Bone Strength: A Randomized Clinical Trial." *JAMA* 322, no. 8: 736. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11889>.
- Ceglia, L., and S. S. Harris. 2013. "Vitamin D and Its Role in Skeletal Muscle." *Calcified Tissue International* 92, no. 2: 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9645-y>.
- Chiang, C.-M., A. Ismaeel, R. B. Griffis, and S. Weems. 2017. "Effects of Vitamin D Supplementation on Muscle Strength in Athletes: A Systematic Review." *Journal of Strength and Conditioning Research* 31, no. 2: 566–574. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001518>.
- Cippitelli, M., and A. Santoni. 1998. "Vitamin D3: A Transcriptional Modulator of the Interferon- γ Gene." *European Journal of Immunology* 28, no. 10: 3017–3030. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3017::AID-IMMU3017>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3017::AID-IMMU3017>3.0.CO;2-6).
- Dahlquist, D. T., B. P. Dieter, and M. S. Koehle. 2015. "Plausible Ergogenic Effects of Vitamin D on Athletic Performance and Recovery." *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 12, no. 1: 33. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0093-8>.
- Davis, C. G., and B.-H. Lin. 2005. *Factors Affecting U.S. Pork Consumption*. Economic Research Service/USDA. https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/37377/15778_ldpm13001_1_.pdf.
- DeGiorgio, C. M., D. Hertling, A. Curtis, D. Murray, and D. Markovic. 2019. "Safety and Tolerability of Vitamin D3 5000 IU/Day in Epilepsy." *Epilepsy & Behavior* 94: 195–197. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.03.001>.
- Duffy, S. K., A. K. Kelly, G. Rajauria, et al. 2018. "The Use of Synthetic and Natural Vitamin D Sources in Pig Diets to Improve Meat Quality and Vitamin D Content." *Meat Science* 143: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.014>.
- Dzik, K. P., and J. J. Kaczor. 2019. "Mechanisms of Vitamin D on Skeletal Muscle Function: Oxidative Stress, Energy Metabolism and Anabolic State." *European Journal of Applied Physiology* 119, no. 4: 825–839. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04104-x>.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP). 2014. "Scientific Opinion on the Safety and Efficacy of Vitamin D3 (Cholecalciferol) as a Feed Additive for All Animal Species or Categories Based on a Dossier Submitted by Lohmann Animal Health GmbH." *EFSA Journal* 12, no. 2: 3568. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3568>.
- Fatehi-Hassanabad, Z., and C. B. Chan. 2005. "Transcriptional Regulation of Lipid Metabolism by Fatty Acids: A Key Determinant of Pancreatic Beta-Cell Function." *Nutrition & Metabolism* 2, no. 1: 1. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-1>.
- Girgis, C. M., R. J. Clifton-Bligh, M. W. Hamrick, M. F. Holick, and J. E. Gunton. 2013. "The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism." *Endocrine Reviews* 34, no. 1: 33–83. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1012>.
- Girgis, C. M., R. J. Clifton-Bligh, N. Mokbel, K. Cheng, and J. E. Gunton. 2014. "Vitamin D Signaling Regulates Proliferation, Differentiation, and Myotube Size in C2C12 Skeletal Muscle Cells." *Endocrinology* 155, no. 2: 347–357. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1205>.
- Hangelbroek, R. W. J., A. M. M. Vaes, M. V. Boekschoten, et al. 2019. "No Effect of 25-Hydroxyvitamin D Supplementation on the Skeletal Muscle Transcriptome in Vitamin D Deficient Frail Older Adults." *BMC Geriatrics* 19: 151. <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1156-5>.
- Hassan-Smith, Z. K., M. Hewison, and N. J. Gittoes. 2017. "Effect of Vitamin D Deficiency in Developed Countries." *British Medical Bulletin* 122, no. 1: 79–89. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx005>.
- Heaney, R. P. 2008. "Vitamin D in Health and Disease." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3, no. 5: 1535–1541. <https://doi.org/10.2215/CJN.01160308>.
- van Helmond, N., T. L. Brobyn, P. J. LaRiccia, et al. 2022. "Vitamin D3 Supplementation at 5000 IU Daily for the Prevention of Influenza-Like Illness in Healthcare Workers: A Pragmatic Randomized Clinical Trial." *Nutrients* 15, no. 1: 180. <https://doi.org/10.3390/nu15010180>.
- Karges, K., J. C. Brooks, D. R. Gill, J. E. Breazile, F. N. Owens, and J. B. Morgan. 2001. "Effects of Supplemental Vitamin D3 on Feed Intake, Carcass Characteristics, Tenderness, and Muscle Properties of Beef Steers." *Journal of Animal Science* 79, no. 11: 2844. <https://doi.org/10.2527/2001.79112844x>.
- Larson-Meyer, D. E., B. C. Ingold, S. R. Fensterseifer, et al. 2017. "Sun Exposure in Pigs Increases the Vitamin D Nutritional Quality of Pork." *PLoS ONE* 12, no. 11: e0187877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187877>.
- Lauridsen, C. 2014. "TRIENNIAL GROWTH SYMPOSIUM— Establishment of the 2012 Vitamin D Requirements in Swine With Focus on Dietary Forms and Levels of Vitamin D1." *Journal of Animal Science* 92, no. 3: 910–916. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7201>.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method." *Methods* 25, no. 4: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Miao, Z., S. Wang, Y. Wang, et al. 2020. "A Potential Linking Between Vitamin D and Adipose Metabolic Disorders." *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2020: 2656321. <https://doi.org/10.1155/2020/2656321>.
- Mølmen, K. S., D. Hammarström, K. Pedersen, et al. 2021. "Vitamin D3 Supplementation Does Not Enhance the Effects of Resistance Training in Older Adults." *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 12, no. 3: 599–628. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12688>.
- Montenegro, K. R., V. Cruzat, R. Carlessi, and P. Newsholme. 2019. "Mechanisms of Vitamin D Action in Skeletal Muscle." *Nutrition Research Reviews* 32, no. 2: 192–204. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000064>.
- Montgomery, J. L., F. C. Parrish, D. C. Beitz, R. L. Horst, E. J. Huff-Lonergan, and A. H. Trenkle. 2000. "The Use of Vitamin D3 to Improve Beef Tenderness." *Journal of Animal Science* 78, no. 10: 2615. <https://doi.org/10.2527/2000.78102615x>.
- Moore, C. E., M. M. Murphy, and M. F. Holick. 2005. "Vitamin D Intakes by Children and Adults in the United States Differ Among Ethnic Groups." *Journal of Nutrition* 135, no. 10: 2478–2485. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2478>.

- de Moura e Dias, M., S. A. dos Reis, L. L. da Conceição, et al. 2021. "Diet-Induced Obesity in Animal Models: Points to Consider and Influence on Metabolic Markers." *Diabetology & Metabolic Syndrome* 13, no. 1: 32. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00647-2>.
- Nadimi, H., A. Djazayeri, M. H. Javanbakht, et al. 2019. "The Effect of Vitamin D Supplementation on Serum and Muscle Irisin Levels, and FNDC5 Expression in Diabetic Rats." *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* 8, no. 3: 236–243.
- Office of Dietary Supplements. 2024. *Vitamin D: Fact Sheet for Health Professionals*. National Institutes of Health. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>.
- Olsson, K., A. Saini, A. Strömberg, et al. 2016. "Evidence for Vitamin D Receptor Expression and Direct Effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Human Skeletal Muscle Precursor Cells." *Endocrinology* 157, no. 1: 98–111. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1685>.
- Papotti, B., J. C. Escolà-Gil, J. Julve, F. Poti, and I. Zanotti. 2021. "Impact of Dietary Lipids on the Reverse Cholesterol Transport: What We Learned From Animal Studies." *Nutrients* 13, no. 8: 2643. <https://doi.org/10.3390/nu13082643>.
- Ragab, D., D. Soliman, D. Samaha, and A. Yassin. 2016. "Vitamin D Status and Its Modulatory Effect on Interferon Gamma and Interleukin-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Culture." *Cytokine* 85: 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.05.024>.
- Ross, A. C., J. E. Manson, S. A. Abrams, et al. 2011. "The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D From the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, no. 1: 53–58. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2704>.
- Schmid, A., and B. Walther. 2013. "Natural Vitamin D Content in Animal Products." *Advances in Nutrition* 4, no. 4: 453–462. <https://doi.org/10.3945/an.113.003780>.
- Smolucha, G., A. Steg, and M. Oczkowicz. 2024. "The Role of Vitamins in Mitigating the Effects of Various Stress Factors in Pigs Breeding." *Animals* 14, no. 8: 1218. <https://doi.org/10.3390/ani14081218>.
- Spedding, S., S. Vanlint, H. Morris, and R. Scragg. 2013. "Does Vitamin D Sufficiency Equate to a Single Serum 25-Hydroxyvitamin D Level or Are Different Levels Required for Non-Skeletal Diseases?" *Nutrients* 5, no. 12: 5127–5139. <https://doi.org/10.3390/nu5125127>.
- Srikuea, R., X. Zhang, O.-K. Park-Sarge, and K. A. Esser. 2012. "VDR and CYP27B1 Are Expressed in C2C12 Cells and Regenerating Skeletal Muscle: Potential Role in Suppression of Myoblast Proliferation." *American Journal of Physiology—Cell Physiology* 303, no. 4: C396–C405. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00014.2012>.
- Szczepanik, K., I. Furgał-Dierżuk, Ł. Gala, and M. Świątkiewicz. 2022. "Effects of *Hermetia Illucens* Larvae Meal and Astaxanthin as Feed Additives on Health and Production Indices in Weaned Pigs." *Animals* 13, no. 1: 1. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>.
- Toda, T., M. Ito, Y. Toda, T. Smith, and F. Kummerow. 1985. "Angiotoxicity in Swine of a Moderate Excess of Dietary Vitamin D3." *Food and Chemical Toxicology* 23, no. 6: 585–592. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90183-8](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90183-8).
- UCLA. n.d. *Normal Calcium Levels*. Accessed July 16, 2023. <https://www.uclahealth.org/medical-services/surgery/endocrine-surgery/patient-resources/patient-education/normal-calcium-levels>.
- Upadhaya, S. D., T. K. Chung, Y. J. Jung, and I. H. Kim. 2022. "Dietary 25(OH)D3 Supplementation to Gestating and Lactating Sows and Their Progeny Affects Growth Performance, Carcass Characteristics, Blood Profiles and Myogenic Regulatory Factor-Related Gene Expression in Wean-Finish Pigs." *Animal Bioscience* 35, no. 3: 461–474. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0304>.
- Upadhaya, S. D., Y. J. Jung, Y. M. Kim, T. K. Chung, and I. H. Kim. 2021. "Effects of Dietary Supplementation With 25-OH-D3 During Gestation and Lactation on Reproduction, Sow Characteristics and Piglet Performance to Weaning." *Animal Feed Science and Technology* 271: 114732. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114732>.
- Usategui-Martín, R., D.-A. De Luis-Román, J. M. Fernández-Gómez, M. Ruiz-Mambrilla, and J.-L. Pérez-Castrillón. 2022. "Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Nutrients* 14, no. 2: 360. <https://doi.org/10.3390/nu14020360>.
- Vaes, A. M. M., M. Tieland, N. Toussaint, et al. 2018. "Cholecalciferol or 25-Hydroxycholecalciferol Supplementation Does Not Affect Muscle Strength and Physical Performance in Pre frail and Frail Older Adults." *Journal of Nutrition* 148, no. 5: 712–720. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy024>.
- Voltan, G., M. Cannito, M. Ferrarese, F. Ceccato, and V. Camozzi. 2023. "Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging From Metabolism to Genomic Effects." *Genes* 14, no. 9: 1691. <https://doi.org/10.3390/genes14091691>.
- Warren, T., R. McAllister, A. Morgan, et al. 2021. "The Interdependency and Co-Regulation of the Vitamin D and Cholesterol Metabolism." *Cells* 10, no. 8: 2007. <https://doi.org/10.3390/cells10082007>.
- Wierzbicka, A., M. Świątkiewicz, M. Tyra, T. Szmatola, and M. Oczkowicz. 2023. "Effect of Different Doses of Cholecalciferol and Calcidiol on Meat Quality Parameters and Skeletal Muscle Transcriptome Profiles in Swine." *Meat Science* 197: 109071. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109071>.
- Wilborn, B. S., C. R. Kerth, W. F. Owsley, W. R. Jones, and L. T. Frobish. 2004. "Improving Pork Quality by Feeding Supranutritional Concentrations of Vitamin D3." *Journal of Animal Science* 82, no. 1: 218–224. <https://doi.org/10.2527/2004.821218x>.
- Yang, J., G. Tian, D. Chen, et al. 2019. "Effects of Dietary 25-hydroxyvitamin D3 Supplementation on Growth Performance, Immune Function and Antioxidative Capacity in Weaned Piglets." *Archives of Animal Nutrition* 73, no. 1: 44–51. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2018.1560113>.
- Yang, P., and Y. Ma. 2021. "Recent Advances of Vitamin D in Immune, Reproduction, Performance for Pig: A Review." *Animal Health Research Reviews* 22, no. 1: 85–95. <https://doi.org/10.1017/S1466252321000049>.
- Ye, D., B. Lammers, Y. Zhao, I. Meurs, T. J.C. Van Berkel, and M. Van Eck. 2011. "ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1, HDL Metabolism, Cholesterol Efflux, and Inflammation: Important Targets for the Treatment of Atherosclerosis." *Current Drug Targets* 12, no. 5: 647–660. <https://doi.org/10.2174/138945011795378522>.
- Yoon, S., O. Kwon, and J. Kim. 2021. "Vitamin D in Athletes: Focus on Physical Performance and Musculoskeletal Injuries." *Physical Activity and Nutrition* 25, no. 2: 20–25. <https://doi.org/10.20463/pan.2021.0011>.
- Yuan, X., H. Cui, Y. Jin, et al. 2022. "Fatty Acid Metabolism-Related Genes Are Associated With Flavor-Presenting Aldehydes in Chinese Local Chicken." *Frontiers in Genetics* 13: 902180. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.902180>.
- Zhao, Y., B. Yu, X. Mao, et al. 2014. "Dietary Vitamin D Supplementation Attenuates Immune Responses of Pigs Challenged With Rotavirus Potentially Through the Retinoic Acid-Inducible Gene I Signalling Pathway." *British Journal of Nutrition* 112, no. 3: 381–389. <https://doi.org/10.1017/S000711451400097X>.
- Zhou, X., Y. Zou, Y. Xu, et al. 2022. "Dietary Supplementation of 25-Hydroxyvitamin D3 Improves Growth Performance, Antioxidant Capacity and Immune Function in Weaned Piglets." *Antioxidants* 11, no. 9: 1750. <https://doi.org/10.3390/antiox11091750>.



Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs

Anna Steg^a, Grzegorz Smolucha^a, Małgorzata Świątkiewicz^b, Maria Oczkiewicz^{a,*}

^a Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, ul. Krakowska 1, Balice, Poland

^b Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, ul. Krakowska 1, Balice, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
vitamin D
liver metabolism
fatty acid β -oxidation
transcriptomics
proteomics

ABSTRACT

Vitamin D plays a multifaceted role in the body, influencing a wide range of physiological processes. While its benefits in deficiency states are well recognized, the effects of high-dose vitamin D₃ supplementation in vitamin D-sufficient individuals remain poorly understood. In this study, we applied an integrative transcriptomic and proteomic approach to assess the dose-dependent effects of long-term dietary vitamin D₃ supplementation (5000 and 10,000 IU/kg feed) in healthy pigs. Despite the absence of phenotypic alterations in fattening characteristics, we observed significant molecular changes in liver tissue, particularly in pathways related to fatty acid β -oxidation, amino acid catabolism, and oxidative stress response. High-dose vitamin D₃ supplementation led to consistent downregulation of key genes and proteins involved in mitochondrial and peroxisomal β -oxidation, including *ACSL5*, *ACADVL*, *HADHA*, *ACAA1* (gene expression), and *ACADM*, *ECHDC1*, and *ECHDC2* (protein level). These findings suggest a reduced hepatic capacity for activating and degrading long-, very long-, and medium-chain fatty acids, potentially resulting in the accumulation of lipid intermediates and a shift toward alternative metabolic pathways. Our findings indicate that very high-dose vitamin D₃ supplementation in non-deficient states may lead to adverse metabolic shifts in the liver, including lipid accumulation and compromised energy metabolism. These effects appear to be dose-dependent, and while they may not manifest phenotypically in short-lived species, they offer important insights into non-classical toxicological effects of high-dose vitamin D₃ supplementation. Importantly, this study highlights the context-dependent nature of vitamin D's effects and provides a new direction for research focused on its metabolic roles beyond classical pathways.

1. Introduction

The effects of vitamin D supplementation, particularly at the tissue level, remain a significant yet underexplored subject. Vitamin D plays an essential role in calcium homeostasis and the regulation of bone metabolism. Beyond its classical functions, research has revealed numerous non-skeletal effects, implicating vitamin D in various physiological processes such as immune modulation, cardiovascular health, and cancer prevention [42]. Nevertheless, many questions remain regarding the molecular mechanisms of action, the balance between beneficial and

adverse effects, and the optimal serum levels needed to maximize health outcomes. Notably, recent research has revealed a complex interplay between vitamin D status and liver function, underscoring the importance of investigating how elevated vitamin D intake could influence hepatic physiology and pathophysiology [1].

The liver is a central organ in vitamin D metabolism. Vitamin D, synthesized in the skin from 7-dehydrocholesterol upon UVB exposure, undergoes its first hydroxylation in the liver to form 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D]. This intermediate metabolite is then converted into the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D], mainly in the

Abbreviations: 2DE, 2D-gel electrophoresis; ACAA1, acetyl-CoA acyltransferase 1; ACADM, acyl-CoA dehydrogenase medium chain; ACADVL, acyl-CoA dehydrogenase very long chain; ACSL5, acyl-CoA synthetase long chain family member 5; ALT, alanine transaminase; BCAA, branched-chain amino acids; CRP, C-reactive protein; DEG, differentially expressed gene; DEP, differentially expressed protein; ECHDC1, ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1; FAO, fatty acid β -oxidation; GSEA, gene set enrichment analysis; HADHA, hydroxy acyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha; LDH, lactate dehydrogenase; LDHB, lactate dehydrogenase b; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NGS, next-generation sequencing; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; ROS, reactive oxygen species; TCA, tricarboxylic acid cycle; TMLHE, trimethyllysine hydroxylase; VDR, vitamin D receptor.

* Corresponding author.

E-mail address: maria.oczkwicz@iz.edu.pl (M. Oczkiewicz).

<https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2025.106835>

Received 29 April 2025; Received in revised form 27 June 2025; Accepted 15 July 2025

Available online 16 July 2025

0960-0760/© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

kidneys. Additionally, the liver produces vitamin D-binding protein, which is responsible for transporting 1,25(OH)₂D throughout the body [16]. The vitamin D receptor (VDR) is a crucial mediator of vitamin D signaling, transmitting the biological effects of 1,25(OH)₂D by modulating the expression of target genes associated with diverse physiological processes. Although the expression of the VDR is relatively low in healthy hepatocytes, it is significant in nonparenchymal cells such as Kupffer cells, stellate cells, and endothelial cells [14,27]. These findings suggest that vitamin D may directly influence hepatic functions. Indeed, VDR gene polymorphisms have been linked to both the presence and severity of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), and VDR expression correlates with the severity of chronic liver disease [54,55]. Moreover, the relationship between vitamin D deficiency and various liver pathologies—including NAFLD, alcoholic liver disease, and viral hepatitis—highlights the therapeutic potential of vitamin D in maintaining or restoring liver health [12,36,43,46,56,7].

Despite these indications of vitamin D's hepatic relevance, comprehensive analyses of gene expression and protein level changes under different supplementation plans are limited. Most existing research has focused on blood samples or in vitro immune cell cultures, highlighting the need for comprehensive in vivo approaches [17,52,5,58,10]. Whole RNA-seq and proteomics analyses in this area remain notably limited. Moreover, many investigations conducted in vivo have employed only standard doses or involved vitamin D as a drug intervention [1,18,21,35].

Standard guidelines from the Institute of Medicine (IOM) recommend a daily vitamin D₃ intake of 600–800 IU for adults, increasing to 800–1000 IU for high-risk groups, with a tolerable upper limit of 4000 IU/day to reduce the risk of hypercalcemia [24]. In contrast, the Endocrine Society recommends 1500–2000 IU/day to maintain serum 25(OH)D levels ≥ 75 nmol/L (30 ng/mL) for musculoskeletal health [59]. For individuals with obesity, 2–3 times higher doses are advised, with intakes up to 10,000 IU/day considered safe. For pigs, the National Research Council [33] suggests 200–300 IU/kg of feed during the grow-finish stages. Legislation limits the vitamin D₃ supply to 1000–2000 IU/kg of diet (25–50 μ g/kg of feed) while allowing up to 50 μ g/kg of feed when 25(OH)D is combined with vitamin D₃ [20]. Therefore, recommendations are not definitively established and depend on various factors. There are many supporters of high doses of supplementation, as studies suggest that high doses of vitamin D might benefit various physiological functions, as current recommendations are insufficient to achieve the therapeutic serum 25(OH)D concentrations required for benefits beyond bone health [48]. Higher serum levels exceeding 40–50 ng/mL are associated with improved health outcomes and can play a significant preventive role in reducing the risk and managing metabolic disorders, autoimmune diseases, infections, and cancers [62]. However, while such high doses may provide immunomodulatory and metabolic advantages, they also raise questions about potential toxicity, such as hypercalcemia. These observations indicate a considerable gap in understanding the balance between potential benefits and risks of high-dose vitamin D supplementation.

This issue also holds practical significance in livestock management. In modern pig husbandry, vitamin D levels are almost entirely reliant on dietary sources [21]. Supplementation in pigs may enhance bone health, improve immune function, and increase reproductive performance and growth rates, ultimately optimizing production and farm efficiency [47]. Higher vitamin D intake can also positively influence meat quality, improving texture, water-holding capacity, and color [49]. Nevertheless, the processes behind these changes and any possible negative effects of high-dose supplementation are not well understood. Significantly, pigs possess multiple physiological and metabolic similarities to humans, such as comparable gastrointestinal and liver functions, which makes them a useful model for translational research examining the effects of vitamin D on liver function.

Given these considerations, our experiment aims to evaluate how long-term, high-dose vitamin D₃ supplementation impacts the hepatic

transcriptome and proteome in pigs. We employed a pig model to investigate how dietary vitamin D₃ at higher-than-standard doses (5000 and 10,000 IU/kg of feed) affects both the transcriptome and proteome of the liver. To our knowledge, our study is the first to investigate the effects of high-dose vitamin D₃ supplementation in healthy individuals, specifically pigs, on a whole-transcriptome and proteome level. We aimed to gain insight into optimizing vitamin D₃ supplementation strategies while carefully considering the safety of supplementation, with potential benefits of with potential applications in animal production and human health.

2. Methods

2.1. Animal experiment

All procedures in this study involving the use of live animals were agreed upon by the 1st Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 427/2020, date 22.07.2020). Throughout the experimental period, a veterinarian regularly monitored the health status of postweaning pigs.

The feeding experiment and slaughter were conducted at the National Research Institute of Animal Production (Experimental Station in Pawlowice). The animal material consisted of 30 castrated male (barrows) Polish Large White fatteners. The pigs were housed in individual cages and had adequate access to feed and free access to water. On the 84th day of life, the pigs were assigned to one of three equal experimental groups (A, B, or C) by stratified randomization. For the next 90 days, the animals were fed isoprotein and isoenergetic feed mixtures differing only in the amount of vitamin D₃ (0 / 5000 / 10,000 IU/kg of feed). The vitamin D₃ levels in the feed mixtures were controlled with premixes that contained the appropriate amount of vitamin D₃ (DSM Nutritional Products Sp. z o.o., Mszczonów, Poland). The feed mixture's ingredient composition, nutritional value, blood parameters and fattening characteristics are presented elsewhere [49]. Serum blood samples were collected at the beginning and the end of the feeding experiment. After finishing the trial, the pigs were transported to the slaughterhouse and slaughtered with an approved standard method by exsanguination after being electrically stunned with high-voltage electric tongs. For NGS and 2D-gel analysis, liver samples were collected into RNAlater-filled tubes and stored at -20°C .

2.2. RNA isolation

RNA isolation was performed on liver samples using a Total RNA Mini kit (A&A biotechnology). Quantitative evaluation of the isolated RNA was performed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The RNA Integrity Number (RIN) value was determined using TapeStation2200 (RNA tape, Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol.

2.3. Next generation sequencing (NGS)

The cDNA libraries were prepared using a QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD (Lexogen) according to a protocol, starting with 300 ng total RNA. Each sample ($n = 30$) had a unique barcode. The quality and quantity of the cDNA libraries were assessed by the Qubit Fluorimeter (Thermo Scientific, USA) and TapeStation2200 system (D1000 tape, Agilent Technologies, USA). The final concentration of cDNA libraries was normalized to 2 nM and they were pooled. The libraries were diluted according to cluster generation protocol and the next-generation sequencing was performed on an Illumina NextSeq 550 instrument (Illumina, USA), using the High-Output v2.5 kit (Illumina, USA) using single read mode.

2.4. Bioinformatic analysis

The processing of the NGS files was performed with the QuantSeq Data Analysis Pipeline on the BlueBee® Genomics Platform. The pipeline processes the FASTQ files through trimming with BBDuk, read alignment with STAR to the swine genome (Sscrofa11.1), and quality control steps to generate gene read counts with HTSeq. Low-quality raw reads samples were filtered out. The minimum number of reads was set to 9 mln. Then, the differential expression analysis was performed with the DESeq2 pipeline. After differential expression analysis, genes with adjusted p -value < 0.05, base mean > 10, and fold change cutoff of $\log_2\text{FC} \leq -1$ or $\log_2\text{FC} \geq 1$ were regarded as differentially expressed genes (DEGs). The functional analysis was performed with STRING software as normal geneset analysis (<http://string-db.org>, version 12.0, H. sapiens database).

2.5. Statistical analysis

All the statistical analyses were performed using the SAS Enterprise Guide software (SAS Institute Inc., version 7.1). Statistical analyses of qPCR and western blot results were conducted by one-way analysis of variance (ANOVA). The comparison of means between the experimental groups was performed using Duncan's multiple range test at the $P \leq 0.05$ level of significance. The results are reported as the means.

2.6. qPCR

Validation for RNA-seq results was performed by quantitative real-time PCR (qPCR). RNA samples (300 ng of total RNA) were reverse transcribed with the use of a high-capacity RNA to cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, USA). qPCR was performed in triplicate using RT PCR Mix EvaGreen (A&A Biotechnology, Poland) on a QuantStudio 7-flex instrument (Thermo Fisher Scientific, USA). We performed qPCR on the selected genes using gene- and species-specific assays (Thermo Scientific, USA). Data were normalized using *RPS29* gene. The relative expression levels were calculated using the delta-delta CT method [28]. The genes were chosen on the basis of RNA-seq data and literature data.

2.7. Proteome analysis

2.7.1. Protein isolation

50 mg of liver samples were homogenised with the use of a grinder in cold RIPA buffer (Pierce™ RIPA buffer, Thermo Scientific, USA) containing a protease inhibitor cocktail (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, USA) and stored on ice for 30 min with short vortexing every 10 min. The homogenate was then centrifuged at 14,000 g at 4 °C for 15 min, and the supernatant was collected. Protein content was measured using the BCA method (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.7.2. 2D-gel electrophoresis

For the 2D-gel electrophoresis (2DE) analysis, 500 µg of protein samples were purified using ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, USA). 2D electrophoresis was performed in duplicates for each sample ($n = 30$). 185 µl of buffer containing 250 µg purified proteins were used to rehydrate 11-cm non-linear, pH 3–10 strips (ReadyStrip™ IPG Strip, Bio-Rad). Proteins were separated in the first dimension by isoelectric focusing (IEF) at 26,000 V-h using the Protean® i12 IEF Cell (Bio-Rad, USA). After focusing, the IPG strips were equilibrated for 20 min in an equilibration buffer containing 6 M urea, 0.05 M Tris-HCl, 2 % SDS, 20 % glycerol, and 2 % (w/v) at pH 8.8. This was followed by a 25-minute equilibration in a buffer containing 6 M urea, 0.05 M Tris-HCl, 2 % SDS, 20 % glycerol, and 2.5 % (w/v) iodoacetamide at pH 8.8. The strips were then placed onto 4–20 % gradient prestained SDS-polyacrylamide gels (Criterion, Bio-Rad, USA), and the second dimension was performed using the Criterion Cell system (Bio-Rad, USA). After the second-

dimension separation, proteins were visualised in the imaging system (ChemiDoc™ MP, Bio-Rad, USA) using prestained gel function and stained using Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Fisher Scientific, USA). Gel analysis was performed with SameSpot v5.1.0.0. Spots with an area < 200 were deleted, and spots with p -value < 0.05 were regarded as differentially expressed proteins (DEPs). Spots of interest were manually excised from gels stained with Coomassie blue and sent to the mass spectrometry analysis at Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, Laboratory of Proteomics and Mass Spectrometry for identification. The spots underwent in-gel digestion with trypsin, and mass spectrometric data were obtained using a nLC-MS-MS (timsTOF Pro2, Bruker) spectrometer. A comparison of the obtained masses of peptides and their fragments with the protein sequence database (SwissProt) was performed using the MASCOT database.

2.7.3. Western blot

For the Western blotting, 10 µg of protein samples were separated by 12 % SDS/PAGE gel and transferred with semi-wet transfer onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Trans-Blot Turbo System, Bio-Rad, USA). The membrane was blocked with 3 % BSA (Serva, Germany) in TBS containing 0.1 % Tween-20 (TBS-T) for one h at room temperature and then incubated with primary antibody against LDHB, HADHA, CRP, RGN, IDH1, ASL, ACSL5, ACADM, TP11, β -tubulin (Proteintech, Germany), or β -actin (Invitrogen, USA) dissolved in blocking buffer, overnight at 4 °C. The blots were then washed in TBS-T three times and incubated with HRP-labeled secondary antibody (Thermo Scientific, USA) for 1 h at room temperature. After washing in TBS-T three times, chemiluminescent signals were detected using an ECL substrate (Clarity™ Western ECL substrate, Bio-Rad, USA) and visualised with an imaging system (ChemiDoc™ MP, Bio-Rad, USA). The resulting images were analysed with ImageLab Software (Bio-Rad, USA).

2.8. Data visualization

Fig. 2 was created with R (version 4.4.0) utilizing the 'circlize' package. Figs. 1, 3, and 6 were created with the use of BioRender.com.

3. Results

As shown in our previous work [49], no significant differences in fattening parameters were observed in the experiment, and no severe health issues were detected throughout the trial. Changes in biochemical parameters in the case of vitamin D₃ supplementation in the amount of 5000 IU/kg of feed, such as a decrease in GLU ($p = 0.022$), an increase in the level of ALT ($p = 0.028$) and LDH ($p = 0.049$) were noticed. While a significant variation in kidney calcium content was noted between groups, it did not exceed the normal range. The blood calcium levels remained within the normal range for all animals and did not differ significantly between groups. The increasing serum vitamin D concentrations in response to supplementation confirm the successful execution of the feeding experiment. Specifically, the 25(OH) vitamin D concentrations were 34.40 ng/mL in Group A, 108.73 ng/mL in Group B, and 139.97 ng/mL in Group C, with statistically significant differences between groups [49].

3.1. Next-generation sequencing results

After 3'quant mRNA-sequencing, seven liver samples did not result in minimal read counts (set to 10 mln raw reads count) and were no longer subjected to differential expression analysis (SM1). 23 samples (A: $n = 7$, B: $n = 8$, C: $n = 8$) that passed the quality control were analyzed with BlueBee software to compare gene expression between all three dietary groups (A-no supplementation, B-5,000 IU vit. D₃/kg of feed, C-10,000 IU vit. D₃/kg of feed). MA plots and PCA obtained after DESeq2 analysis are presented in SM1. We identified 12 DEGs in the group A vs. group B comparison (downregulated in group B). In the comparison of group A

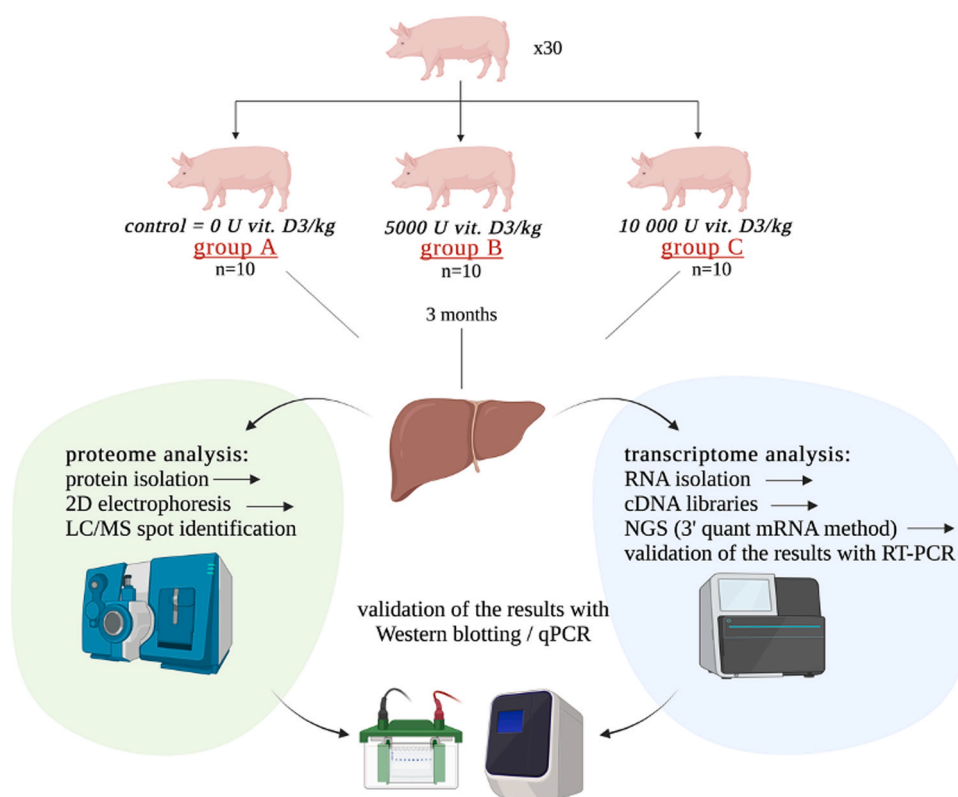


Fig. 1. Experimental design for evaluating the effects of vitamin D₃ supplementation. Doses are given as IU of vitamin D₃ per kg of feed. At the end of the experiment, samples of liver tissue were taken to evaluate the possible changes in gene expression and protein levels.

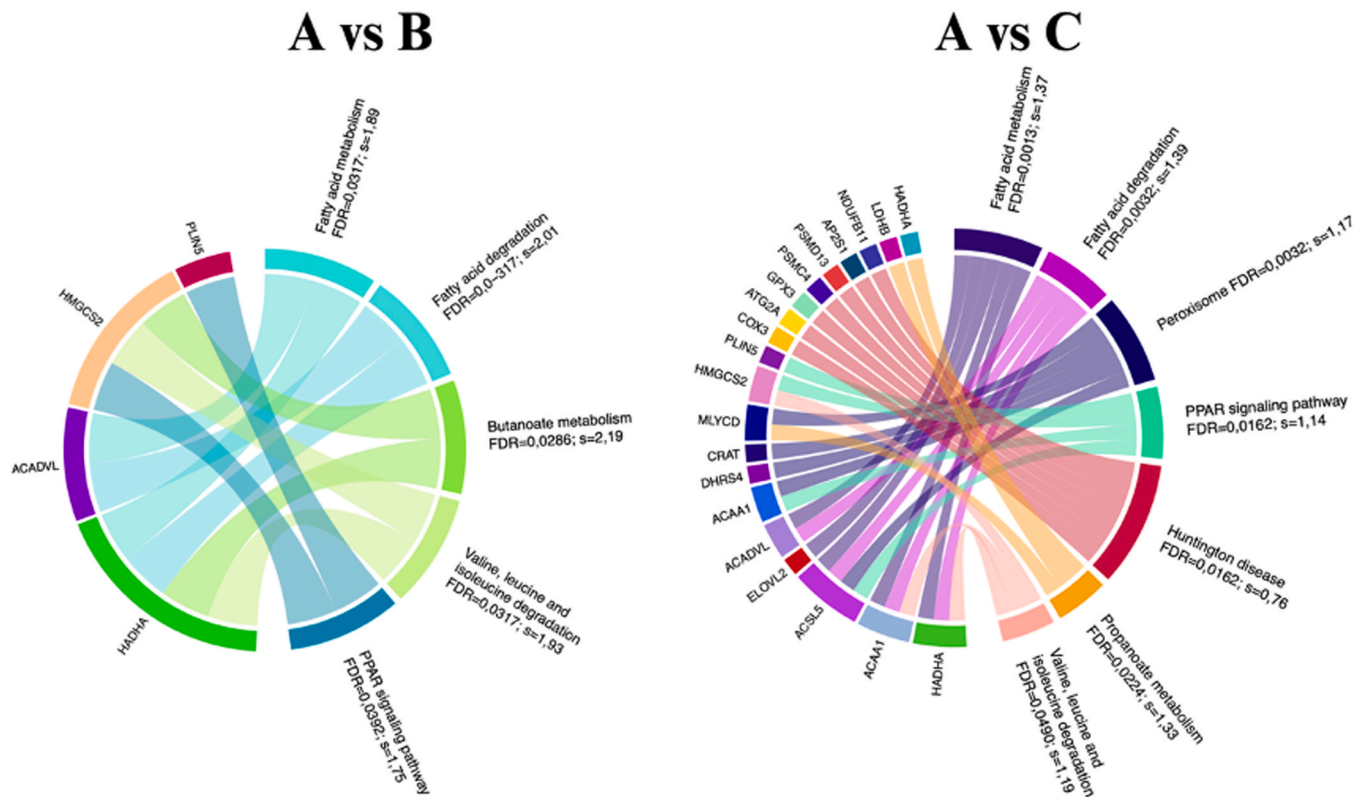


Fig. 2. Enriched biological processes and top associated genes altered by vitamin D₃ supplementation in liver sample. A- no additional supplementation, B- supplementation with 5000 IU vit. D₃/kg of feed, C- supplementation with 10 000 IU vit. D₃/kg of feed. FDR - False Discovery Rate, s - strength. For all the processes, the direction was top, meaning the inhibition of the process. The functional analysis was performed on STRING software, and the data visualization was created with R.

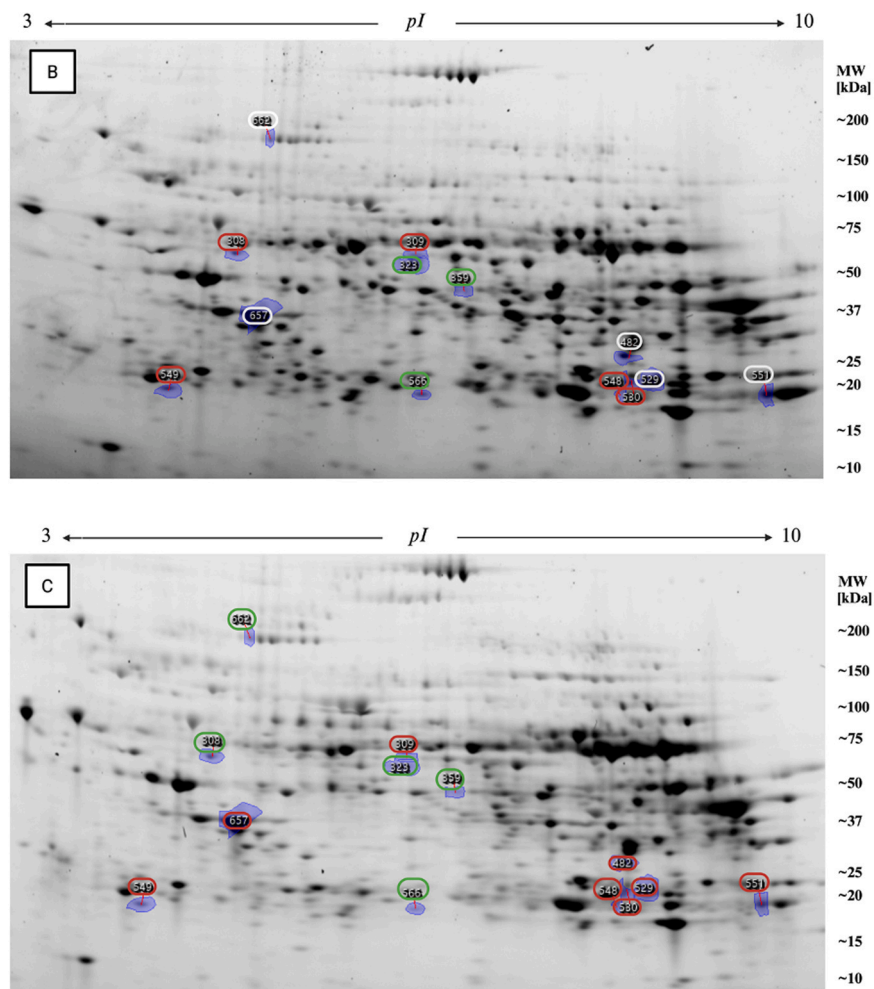


Fig. 3. Representative 2D gel electrophoresis map of liver sample protein extracts for supplemented groups. Numbered spots indicate proteins with a statistically significant differential expression (p -value < 0.05) between groups that were identified using LC/MS. The spots are color-coded to reflect expression changes: green circles indicate upregulation, red circles denote downregulation, and white circles represent proteins with similar expression levels between the groups. Proteins matching ID spot numbers are reported in [Table 4](#).

with group C, 109 DEGs were identified (101 downregulated in group C, and 8 upregulated in group C). In the comparison between group B and group C we identified no DEGs. The top 20 DEGs are listed in [Table 1](#); all DEGs are listed in the SM2.

All gene expression data were submitted to the GEO NCBI database (accession number: will be provided).

Among the identified DEGs, there were 8 genes (*PMM1*, *HADHA*, *PLIN5*, *DNAJB1*, *ACADVL*, *GFUS*, *HMGCS2*, *APOA4*) in common between comparison groups A vs B and groups A vs C.

3.2. Functional analysis of identified DEGs with STRING

Functional analysis of identified DEGs with String software was performed to get insights into the biological processes that may alter upon high doses of vitamin D₃ supplementation. For the A vs C comparison, upregulated and downregulated genes were analyzed separately.

In the A vs B comparison, five enrichments were found ([Table 1](#)). Eight enrichments were found in the A vs. C comparison analyzing downregulated genes ([Table 1](#)). No enrichments were found for the upregulated genes. The biological pathways with top associated genes altered by vitamin D₃ supplementation are shown in [Fig. 2](#).

3.3. Validation with qPCR

To validate the 3'quant mRNA-seq results, qPCR analysis of a few identified DEGs was performed. All 30 samples ($n = 30$) were included in the qPCR step, to assess gene expression consistency across the full set of biological replicates. Although not all selected genes were successfully validated, the most critical ones—particularly those involved in β -oxidation—showed downregulation consistent with the NGS findings. While *ACADM* expression did not differ significantly, a trend toward downregulation was observed with supplementation, yet the lowest value occurred in the 5000 IU group. In the case of *AKR1D1*—one of the few genes found to be upregulated by NGS in the 10,000 IU group—a higher mean was detected in that group, but without reaching statistical significance. The RQ data of chosen analysed genes are at [Table 3](#).

3.4. 2DE

Spot matching for all experimental groups (A: $n = 7$, B: $n = 8$, C: $n = 8$, samples included in the functional analysis of NGS results) revealed 662 spots. One-way ANOVA analysis of the protein spots between control and experimental groups revealed 26 proteins that differed significantly ($p < 0.05$) in relative abundance with fold changes greater than 1.3. With the use of LC/MS, we identified 13 protein spots ([Table 3](#)) cut from the reference gel of the sample from group C ([Fig. 3](#)). Three of the spots contained two co-migrating proteins. Functional

Table 1

Top 20 (all for the group A vs B) DEGs (based on adjusted p-value) from NGS analysis. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D₃/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D₃/kg of feed.

Ensembl ID	Base Mean	Log2 Fold Change	p-adjusted	Gene symbol
A vs B				
ENSSSCG00000002515	368	-2,35	0,0003	<i>SLC25A47</i>
ENSSSCG00000000061	179	-2,29	0001	<i>PMM1</i>
ENSSSCG000000023738	1247	-1,81	0007	<i>COG3</i>
ENSSSCG000000024520	177	-1,74	0007	<i>ABCB4</i>
ENSSSCG000000008571	1227	-1,43	0,0119	<i>HADHA</i>
ENSSSCG000000031698	75	-1,64	0,0119	<i>GFUS</i>
ENSSSCG000000013513	81	-1,84	0,0256	<i>PLIN5</i>
ENSSSCG000000017947	577	-1,49	0,0331	<i>ACADVL</i>
ENSSSCG000000013784	506	-1,58	0,0384	<i>DNAJB1</i>
ENSSSCG000000036808	459	-1,82	0,0384	<i>HMGCS2</i>
ENSSSCG000000040689	5218	-1,97	0,0384	<i>APOA4</i>
ENSSSCG000000036275	145	-1,6	0,0408	<i>NSMCE1</i>
A vs C				
ENSSSCG000000000061	178	-2,67	0,0017	<i>PMM1</i>
ENSSSCG000000011250	1638	-1,93	0,0150	<i>ACAA1</i>
ENSSSCG000000013475	777	-2,17	0,0150	<i>NCLN</i>
ENSSSCG000000002479	765	-1,58	0,0196	<i>SERPINA11</i>
ENSSSCG000000038943	91	-1,91	0,0196	<i>TOM1</i>
ENSSSCG000000002529	121	-2,35	0,0196	-
ENSSSCG000000040735	768	-1,79	0,0222	<i>DDAH1</i>
ENSSSCG000000031450	86	-2,20	0,0222	<i>MLYCD</i>
ENSSSCG000000040689	5202	-2,52	0,0222	<i>APOA4</i>
ENSSSCG000000010742	448	-1,56	0,0231	<i>UROS</i>
ENSSSCG000000002013	881	-1,85	0,0231	<i>DHRS4</i>
ENSSSCG000000027286	88	-1,86	0,0231	<i>DGKQ</i>
ENSSSCG000000034562	213	-1,89	0,0231	<i>TMEM203</i>
ENSSSCG000000024189	227	-1,54	0,0319	<i>SIL1</i>
ENSSSCG000000008571	1243	-1,43	0,0371	<i>HADHA</i>
ENSSSCG000000031698	79	-1,51	0,0371	<i>GFUS</i>
ENSSSCG000000017947	573	-1,59	0,0374	<i>ACADVL</i>
ENSSSCG000000016205	46	-1,61	0,0375	<i>NHEJ1</i>
ENSSSCG000000032642	233	-1,68	0,0375	<i>DDX41</i>
ENSSSCG000000021610	285	-1,69	0,0375	<i>CHPF</i>
ENSSSCG000000003780	403	1,53	0,0402	<i>CRY3</i>
ENSSSCG000000008336	52	1,62	0,0402	<i>ANXA4</i>
ENSSSCG000000026392	195	1,25	0,0413	<i>BSDC1</i>
ENSSSCG000000034292	64	1,69	0,0413	<i>ZMYM1</i>
ENSSSCG000000012742	144	1,43	0,0441	<i>MTM1</i>
ENSSSCG000000025413	251	1,43	0,0441	-
ENSSSCG000000016519	1056	1,59	0,0441	<i>AKR1D1</i>
ENSSSCG000000035133	72	1,20	0,0475	<i>MTMR9</i>

analysis of identified proteins was performed using String software, and the acquired terms were compared with the functional analysis of identified genes from NGS analysis (Fig. 4).

GO biological process enrichment revealed a strong overrepresentation of lipid metabolism and fatty acid oxidation pathways among both DEGs and DEPs. In the transcriptomic dataset (top), key enriched terms included fatty acid oxidation, carboxylic acid catabolic process, and cellular lipid metabolic process, highlighting altered gene expression involved in energy-related lipid processing. Proteomic data (bottom) reinforced these findings, showing enrichment in fatty acid β -oxidation, glutathione metabolism, and oxidant detoxification, suggesting both metabolic imbalance and oxidative stress responses at the protein level. Enrichment strength, gene count, and FDR values are indicated.

3.5. Western blot analysis

Using Western blot analysis, we successfully validated two key proteins in the β -oxidation pathway—HADHA (identified through NGS analysis) and ACADM (identified through 2D-gel analysis)—as having altered expression. Protein validation was performed on all 30 samples to ensure a comprehensive assessment of protein levels across all biological replicates.

Table 2

Biological processes and top associated genes altered by vitamin D₃ supplementation in liver sample. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D₃/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D₃/kg of feed. FDR, false discovery rate. The functional analysis was performed on STRING software.

term description	strength	FDR	matching proteins
A vs B			
PPAR signaling pathway	1.75	0.0392	HMGCS2, PLIN5
Fatty acid degradation	2.01	0.0317	HADHA, ACADVL
Valine, leucine and isoleucine degradation	1.93	0.0317	HADHA, HMGCS2
Fatty acid metabolism	1.89	0.0317	HADHA, ACADVL
Butanoate metabolism	2.19	0.0286	HADHA, HMGCS2
A vs C (downregulated)			
Metabolic pathways	0.51	0.0013	PMM1, LDHB, POMT1, HADHA, ACAA1, COX3, ACSL5, CHPF, DHRS4, HMGCS2, PFKL, GPX3, ELOVL2, MLYCD, TST, DGKQ, ACADVL, NDUFB11, ALG9
Fatty acid metabolism	1.37	0.0013	HADHA, ACAA1, ACSL5, ELOVL2, ACADVL
Peroxisome	1.17	0.0032	ACAA1, ACSL5, DHRS4, CRAT, MLYCD
Fatty acid degradation	1.39	0.0032	HADHA, ACAA1, ACSL5, ACADVL
PPAR signaling pathway	1.14	0.0162	ACAA1, ACSL5, HMGCS2, PLIN5
Huntington disease	0.76	0.0162	COX3, ATG2A, GPX3, PSMC4, PSMD13, AP2S1, NDUFB11
Propanoate metabolism	1.33	0.0224	LDHB, HADHA, MLYCD
Valine, leucine and isoleucine degradation	1.19	0.0490	HADHA, ACAA1, HMGCS2

Table 3

The mean mRNA expression (based on RQ) of chosen genes across experimental groups. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D₃/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D₃/kg of feed.

gene	mean/SD	group			p-value
		A (n = 8)	B (n = 10)	C (n = 10)	
HADHA	mean	2,23	0,92	1,13	0.003
	SD	1,25	0,3	0,46	
APOA4	mean	0,39	0,05	0,07	0.006
	SD	0,27	0,04	0,09	
ACSL5	mean	0,51	0,31	0,41	0.019
	SD	0,5	0,26	0,33	
CRAT	mean	3,5	1,39	1,61	0.028
	SD	2,96	0,41	0,92	
LDHB	mean	0,74	0,29	0,33	0.05
	SD	0,59	0,12	0,24	
HMGCS2	mean	0,78	0,23	0,29	0.072
	SD	0,8	0,2	0,18	
TMLHE	mean	0,69	0,45	0,85	0.075
	SD	0,3	0,18	0,48	
AKR1D1	mean	0,54	0,35	0,64	0.099
	SD	0,32	0,23	0,24	
GC	mean	0,94	0,98	1,27	0.279
	SD	0,25	0,35	0,66	
VDR	mean	2,04	1,59	1,35	0.298
	SD	1,02	0,81	0,76	
ACADM	mean	0,89	0,67	0,75	0.336
	SD	0,41	0,25	0,22	

In the 2DE analysis, three of the spots contained two-comigrating proteins, which highlights a limitation of 2D gel-based analysis and the need for validation with another protein method. For example, spot

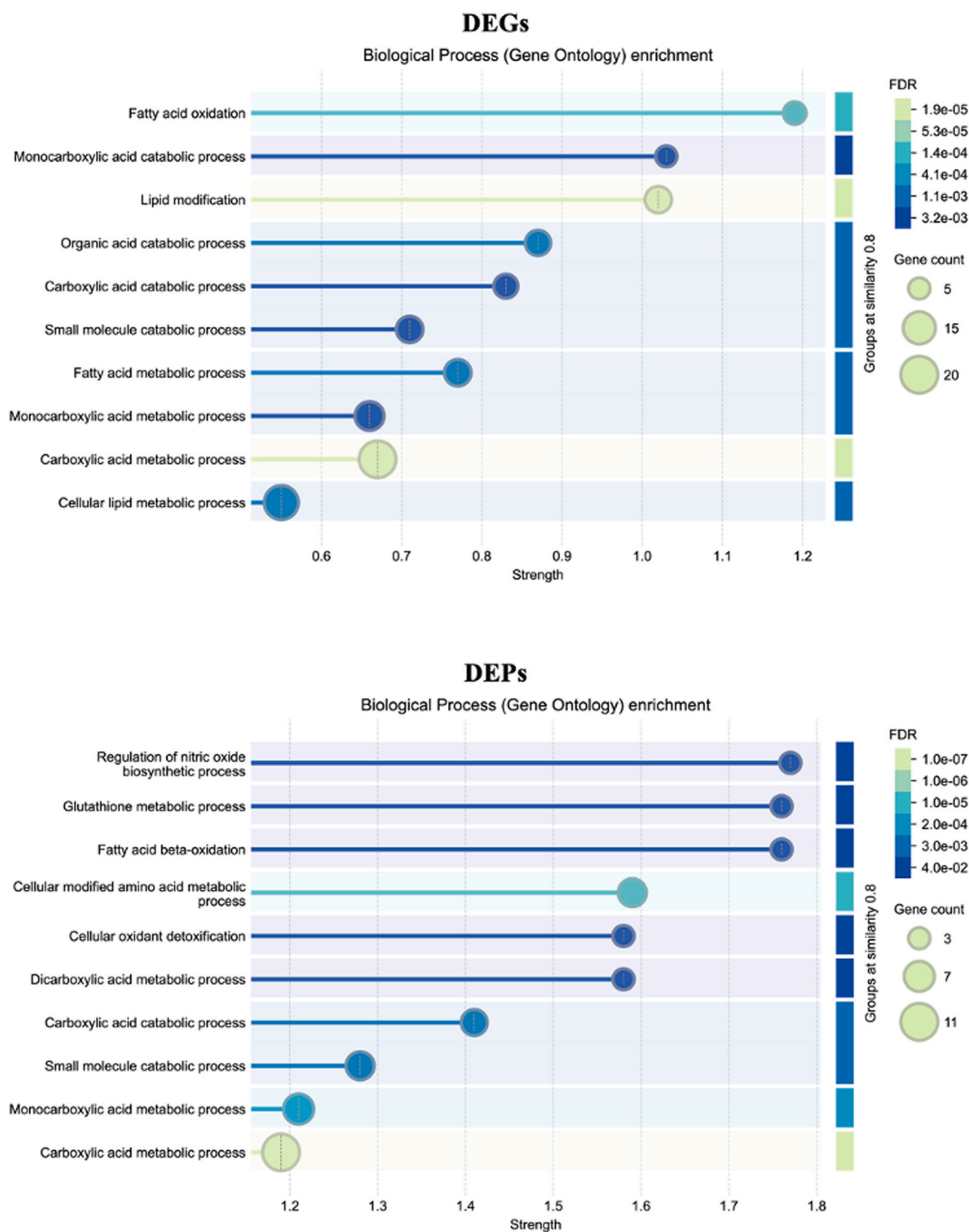


Fig. 4. Functional analysis of DEPs from 2D-gel experiment and DEGs from NGS. FDR – false discovery rate. Analysis was performed on String software.

359, containing both ACADM and IDH1 proteins, was initially classified as upregulated based on the 2D analysis. However, follow-up Western blot validation revealed no statistically significant change in IDH1 expression, while ACADM was downregulated in response to supplementation. This underscores the importance of complementary validation techniques to interpret proteomic data accurately.

We also investigated CRP protein levels, which showed a nonsignificant trend toward upregulation with increasing doses. Attempts to assess several other proteins did not yield statistically significant results, potentially due to large protein modifications and diverse isoforms,

suboptimal antibody specificity, or homology for pig tissues. The example blot membranes and data for HADHA, ACADM, CRP, and LDHB genes are shown in Fig. 6.

4. Discussion

Vitamin D is increasingly recognized for its diverse functions in hepatic lipid metabolism, immune regulation, and detoxification. However, the underlying mechanisms influencing these pathways, especially under high-dose supplementation conditions, are not yet fully

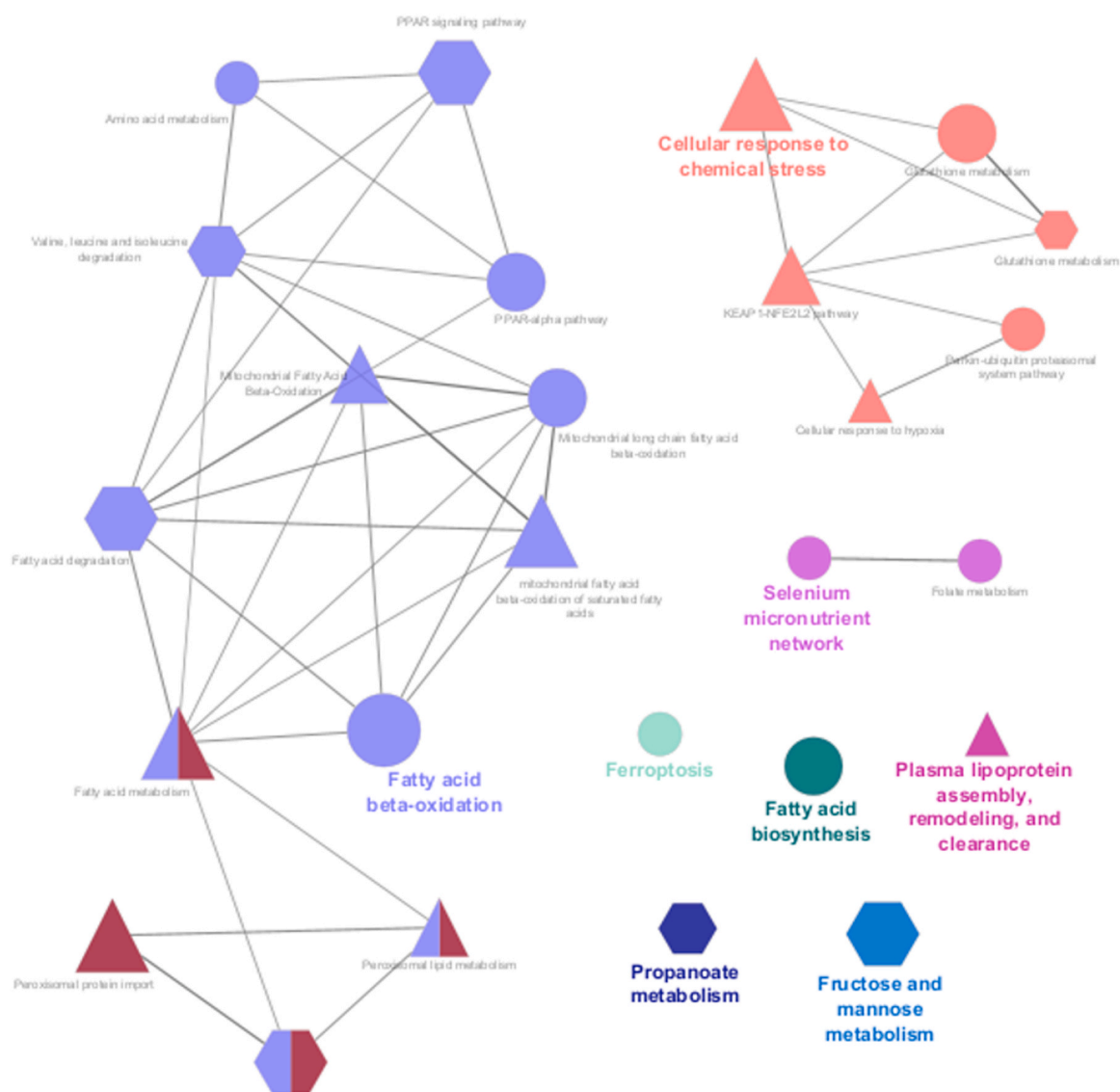


Fig. 5. ClueGO functional pathway enrichment analysis performed in Cytoscape. The network is based on the Homo sapiens database and visualizes enriched pathways with Benjamini–Hochberg correction applied to control for false discovery. Hexagonal nodes represent significantly enriched KEGG pathways, while elliptical nodes correspond to WikiPathways. Only terms with p -values < 0.05 are shown. Node size indicates the statistical significance of enrichment, and edges reflect shared genes between pathways. Functionally related pathways are grouped and color-coded according to biological relevance.

comprehended. In hepatic models, in vitro studies using human liver organoids have shown that calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) activates VDR-dependent pathways, promoting hepatoblast differentiation and inducing a metabolic shift toward glycolysis via HIF-1 and PI3K-AKT signaling (S. [65]). Similarly, UVB-induced endogenous vitamin D synthesis in pigs resulted in repression of genes involved in cholesterol and steroid biosynthesis, as well as altered expression of key fatty acid metabolism genes [21]. In rats, long-term dietary vitamin D_3 supplementation (0, 1000, or 5000 IU/kg) induced modest transcriptional effects. Still, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) revealed significant modulation of pathways related to oxidative stress, metallothionein function, and inflammation, supported by qPCR validation of *Mt1*, *Mt2*, *Orm1*, *Srebp2*, and *Insig2* expression [34]. Proteomic data also highlight the liver as a responsive tissue, with studies showing vitamin D-dependent regulation of fetuin B (FETUB)—a hepatokine linked to metabolic dysfunction—in both animal models and hepatocyte cultures [60].

Expanding upon these earlier findings, our integrative transcriptomic and proteomic analysis revealed a dose-dependent hepatic response to very high doses of dietary vitamin D_3 . While transcriptomic

profiling showed a limited number of differentially expressed genes (DEGs), the observed $\log_2$ fold changes were notably large—often exceeding ± 1.5 —indicating substantial transcriptional downregulation. The lower-dose group (5000 IU/kg of feed) exhibited only 12 DEGs, while the higher-dose group (10,000 IU/kg of feed) showed a markedly stronger response with 109 DEGs. Despite the difference in the magnitude of transcriptional changes, both doses affected similar biological processes, particularly those involved in amino acid catabolism, fatty acid metabolism, butanoate and propanoate metabolism, and PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) signaling. These pathways converge on energy production via the TCA cycle, fueled by substrates such as acetyl-CoA and propionyl-CoA derived from branched-chain amino acids and fatty acid degradation [25,41].

Proteomic profiling further supported these transcriptomic findings, identifying 26 DEPs linked to fatty acid β -oxidation, carboxylic acid metabolism, glutathione detoxification, and nitric oxide biosynthesis. While gene expression data showed a clear trend toward downregulation, the proteomic response was more balanced, potentially reflecting differences in temporal regulation and protein turnover. This

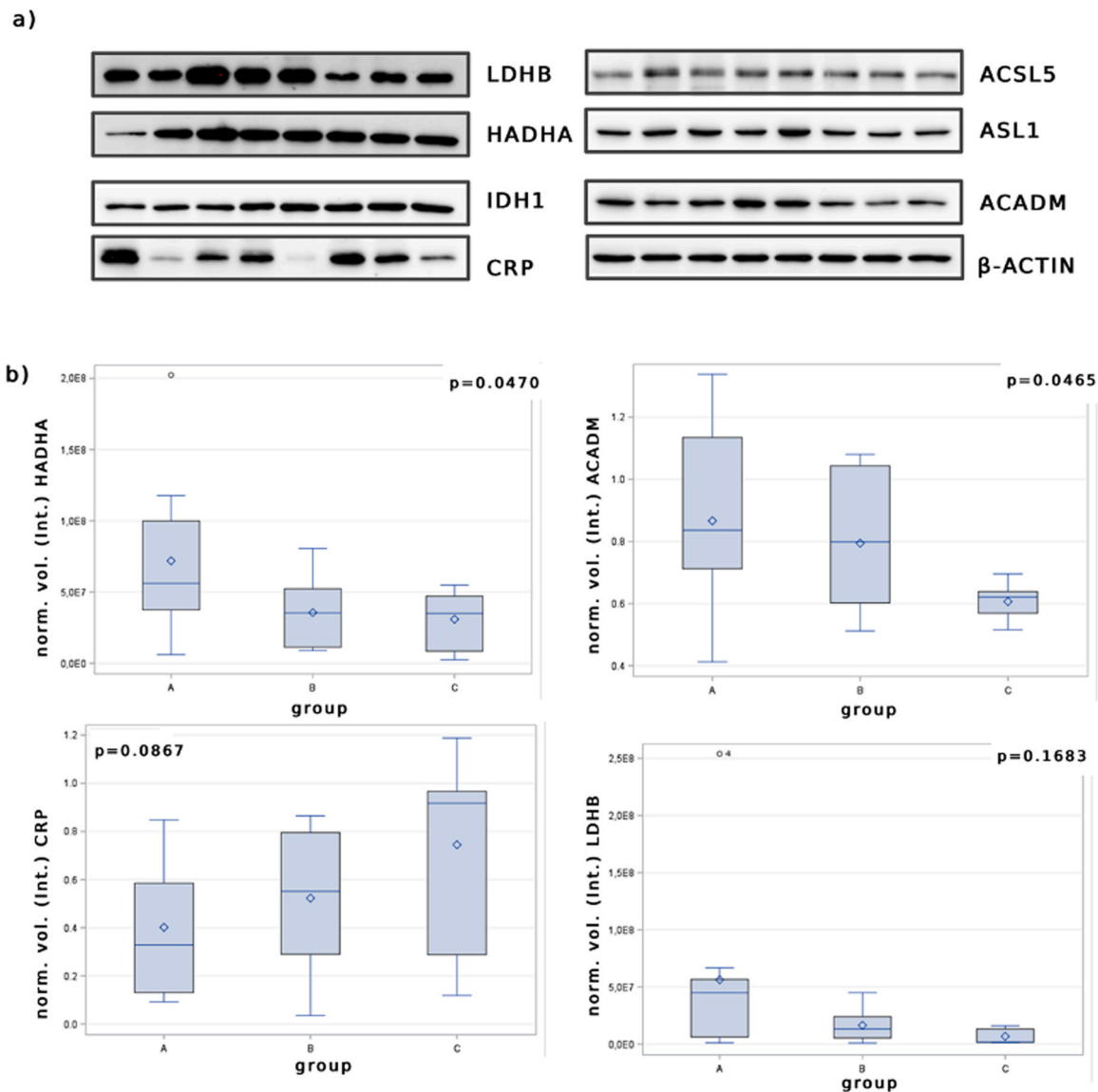


Fig. 6. a) Example western blot membranes; b) mean normalization volumes (intensity)(n = 30) for HADHA, ACADM, CRP, and LDHB proteins normalized to β-actin. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D₃/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D₃/kg of feed. The boxes show the interquartile range (IQR), with the horizontal line representing the median and the diamond shape indicating the mean value. The whiskers extend to the minimum and maximum values within 1.5 times the IQR. Outliers are shown as individual points.

divergence may also result from post-translational modifications, as seen with enzymes like HADHA under nutrient-excess conditions (Y. [67]). Notably, alterations in β-oxidation appeared consistent across transcriptomic and proteomic levels, suggesting a suppression of lipid degradation with high-dose vitamin D₃ supplementation.

4.1. Very high dose vitamin D₃ decreases expression of genes and proteins engaged in fatty acids beta-oxidation

Among the most significantly affected pathways in our study was fatty acid β-oxidation (FAO) (Fig. 7.), a central metabolic process responsible for breaking down fatty acids into acetyl-CoA to fuel the tricarboxylic acid (TCA) cycle and generate ATP. This pathway is especially critical in the liver during fasting, serving as a primary energy source and maintaining metabolic homeostasis [23]. Expression of key genes such as *ACSL5*, *ACADVL*, *HADHA*, and *ACAA1* were significantly downregulated, while proteomic analysis revealed decreased levels of *ACADM*, *ECHDC1*, and *ECHDC2*. P-values from qPCR and Western blot analyses for the validated genes are shown in Table 3, while

protein-level validation results are presented in Fig. 6b. The reduced expression of *ACSL5* suggests impaired activation of long-chain fatty acids into acyl-CoA esters, while decreased *ACADVL* expression may indicate a bottleneck in the initial step of very long-chain fatty acid oxidation. Notably, *HADHA*, which encodes the α-subunit of the mitochondrial trifunctional protein involved in long-chain FAO, was consistently downregulated at both transcript and protein levels and was implicated in all enriched FAO-related pathways. Decreased *ACADM* protein further indicates compromised medium-chain fatty acid oxidation. Together, these changes suggest a diminished hepatic capacity to oxidize fatty acids of various chain lengths via both mitochondrial and peroxisomal pathways, which could impair energy production and metabolic balance [41].

Impairments in FAO are known to have systemic consequences, particularly in energy-demanding tissues such as the liver, heart, and muscle. Disruption of FAO can lead to lipid accumulation, hypoketotic hypoglycemia, cardiomyopathy, and in the liver, promote the development of steatosis and NAFLD [2,22,66].

Our study identified the PPAR signaling pathway as significantly

Table 4
Identified protein spots that were differentially expressed between the control group and supplemented groups. A—no additional supplementation, B—supplementation with 5000 IU vit. D₃/kg of feed, C—supplementation with 10,000 IU vit. D₃/kg of feed. F - the single-fold change value is the mean value of the two calculated values between the control group versus the two supplemented groups.

spot number	protein	protein name	anova (p-value)	F
548	TPI1	Triosephosphate isomerase	0,00008	1,8
530	HBB	Hemoglobin subunit beta	0,0057	1,4
530	ECHDC2	Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 2	0,0057	1,4
309	GATM	Glycine amidinotransferase	0,0085	1,6
309	ASL	Argininosuccinate lyase	0,0085	1,6
551	GSTA1	Glutathione S-transferase alpha	0,0093	2
359	ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	0,0123	1,5
359	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	0,0123	1,5
657	RGN	Regucalcin	0,0144	1,3
662	ALDH1L1	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0,0218	1,7
549	APOA1	Apolipoprotein A-I	0,0219	2
549	PRDX2	Peroxisiredoxin-2	0,0219	2
323	EF1G	Elongation factor 1-gamma	0,0221	1,3
566	CMPK1	UMP-CMP kinase	0,0236	1,9
482	ECHDC1	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	0,0257	1,8
308	TUBB	Tubulin beta chain	0,0313	1,4
529	DHPR	Dihydropteridine reductase	0,0516	1,2

enriched, with associated genes including *ACAA1*, *ACSL5*, *HMGCS2*, and *PLIN5*. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are nuclear transcription factors crucial for liver metabolism and energy balance. The three isoforms—PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ —have distinct roles. PPAR α , abundant in the liver, regulates fatty acid up take and oxidation, boosts mitochondrial and peroxisomal β -oxidation, supports ketogenesis during fasting, and has anti-inflammatory effects. PPAR β/δ aids in fatty acid oxidation and energy use, especially during fasting and exercise. PPAR γ , mainly active in adipose tissue, is also induced in the liver under metabolic stress, promoting lipid storage and influencing insulin sensitivity, notably in NAFLD [9,38,53,61]. This enrichment suggests that very high-dose vitamin D₃ supplementation may influence key regulators of lipid metabolism and energy homeostasis in the liver. The downregulation of these genes—typically involved in fatty acid activation for lipogenesis or β -oxidation (*ACSL5*), peroxisomal β -oxidation (*ACAA1*), ketogenesis (*HMGCS2*), and lipid droplet regulation (*PLIN5*)—may reflect impaired PPAR-mediated transcriptional control, potentially contributing to disrupted lipid processing and storage, and may signal early metabolic imbalance in response to excessive vitamin D₃ intake. Reduced PPAR signaling may further exacerbate lipid storage and oxidative damage [25,41].

Moreover, in our study, the downregulation of FAO-related genes and proteins coincided with decreased expression of antioxidant proteins such as PRDX2 and GSTA1. However, since we did not assess the activity of antioxidant enzymes or measure markers of lipid peroxidation, no definitive conclusions regarding the presence of oxidative stress can be drawn based solely on the expression levels of these two proteins. Yet, these two processes—lipid degradation and oxidative stress—may influence each other, forming a feedback loop that exacerbates metabolic imbalance under excessive vitamin D₃ supplementation. This aligns with prior findings where oxidative stress downregulates FAO gene expression and leads to fatty acid accumulation [50]. Excess fatty acids not fully metabolized by β -oxidation may be redirected into ω -oxidation pathways, producing dicarboxylic acids that can impair mitochondrial respiration, increase reactive oxygen species (ROS) production, and enhance lipid peroxidation [11]. Moreover, post-translational modifications such as hyperacetylation of FAO

enzymes—previously reported for HADHA under high-glucose or nutrient-rich conditions—may contribute to enzyme inactivation and further disrupt lipid metabolism (Y. [67]).

Although downregulation of FAO is generally not favourable, the metabolic implications are complex. For example, while *ACSL5* downregulation impairs long-chain fatty acid activation, its knockout in mice enhances energy expenditure and improves insulin sensitivity [8]. However, the observed upregulation of *AKR1D1*, a gene encoding an enzyme involved in steroid and bile acid metabolism, likely reflects a maladaptive metabolic response. *AKR1D1* overexpression is known to enhance glucocorticoid clearance, potentially reducing glucocorticoid receptor activity and contributing to insulin resistance and hepatic lipid accumulation [32,57].

Overall, our transcriptomic and proteomic findings point toward a coordinated downregulation of β -oxidation, impaired lipid catabolism, and potentially increased oxidative stress under very high-dose vitamin D₃ supplementation. This phenotype mirrors patterns seen in nutrient-excess models and acetylome analyses, such as those in dairy cattle, where vitamin D-regulated pathways—including FAO, the TCA cycle, propionate metabolism, oxidative phosphorylation, and PPAR signaling—were implicated in the progression of hepatic lipid disorders [26].

4.2. High-dose vitamin D₃ may compromise liver health

Vitamin D is increasingly recognized as a modulator of metabolic and inflammatory pathways in the liver, with deficiency commonly associated with chronic liver conditions such as NAFLD, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and viral hepatitis. In vitro studies have demonstrated that vitamin D possesses anti-inflammatory and antifibrotic properties, including suppression of NF- κ B activity and inhibition of collagen synthesis [3,37,4]. In vivo, supplementation has been reported to reduce hepatic steatosis, improve insulin sensitivity, and lower pro-inflammatory cytokines [13,4,63]. Clinically, lower serum levels of 25(OH)D correlate with increased liver disease severity, and intervention studies have demonstrated beneficial outcomes such as improved Child-Pugh scores in alcoholic cirrhosis [44], enhanced sustained virologic response in hepatitis C [6], and restoration of gut microbiota in NAFLD (X.-L. [64]). However, meta-analyses remain inconclusive due to heterogeneity in study design, baseline vitamin D status, and dosing regimens [15,19,51], emphasizing the need for more targeted studies.

Our data, derived from healthy, vitamin D-sufficient pigs, deepen existing concerns regarding the metabolic consequences of high-dose vitamin D₃ supplementation in non-deficient states. Despite vitamin D's generally protective role in pathological contexts, we observed that supplementation with both 5000 and 10,000 IU of vit. D₃/kg of feed led to the downregulation of β -oxidation pathways, which can potentially lead to lipid accumulation. Notably, only the 5000 IU/kg of feed group showed elevated liver enzymes, suggesting either a dose-dependent effect or early saturation of vitamin D storage and metabolism, potentially triggering compensatory mechanisms at higher doses. Furthermore, although serum calcium levels were not significantly altered, kidney calcium content increased in a dose-dependent manner, indicating localized tissue accumulation despite systemic homeostasis. These findings align with previous safety concerns surrounding long-term high-dose vitamin D₃ supplementation, including risks of hypercalcaemia, hypercalciuria, and tissue-level calcification [29,30,39].

It is important to note that the doses of vitamin D₃ used in this study (5000 and 10,000 IU/kg of feed) correspond to approximately 11,400–24,000 IU/day and resulted in serum 25(OH)D₃ concentrations of 110–140 ng/mL, as reported previously [49]. These values significantly exceed physiological levels and fall within the range associated with vitamin D toxicity. Therefore, while the observed hepatic responses are plausible at such exposures, they reflect pharmacological or toxic effects and should not be extrapolated to typical or therapeutic vitamin D dosing in humans or livestock. Future studies are necessary to determine the threshold at which vitamin D₃ supplementation begins to exert

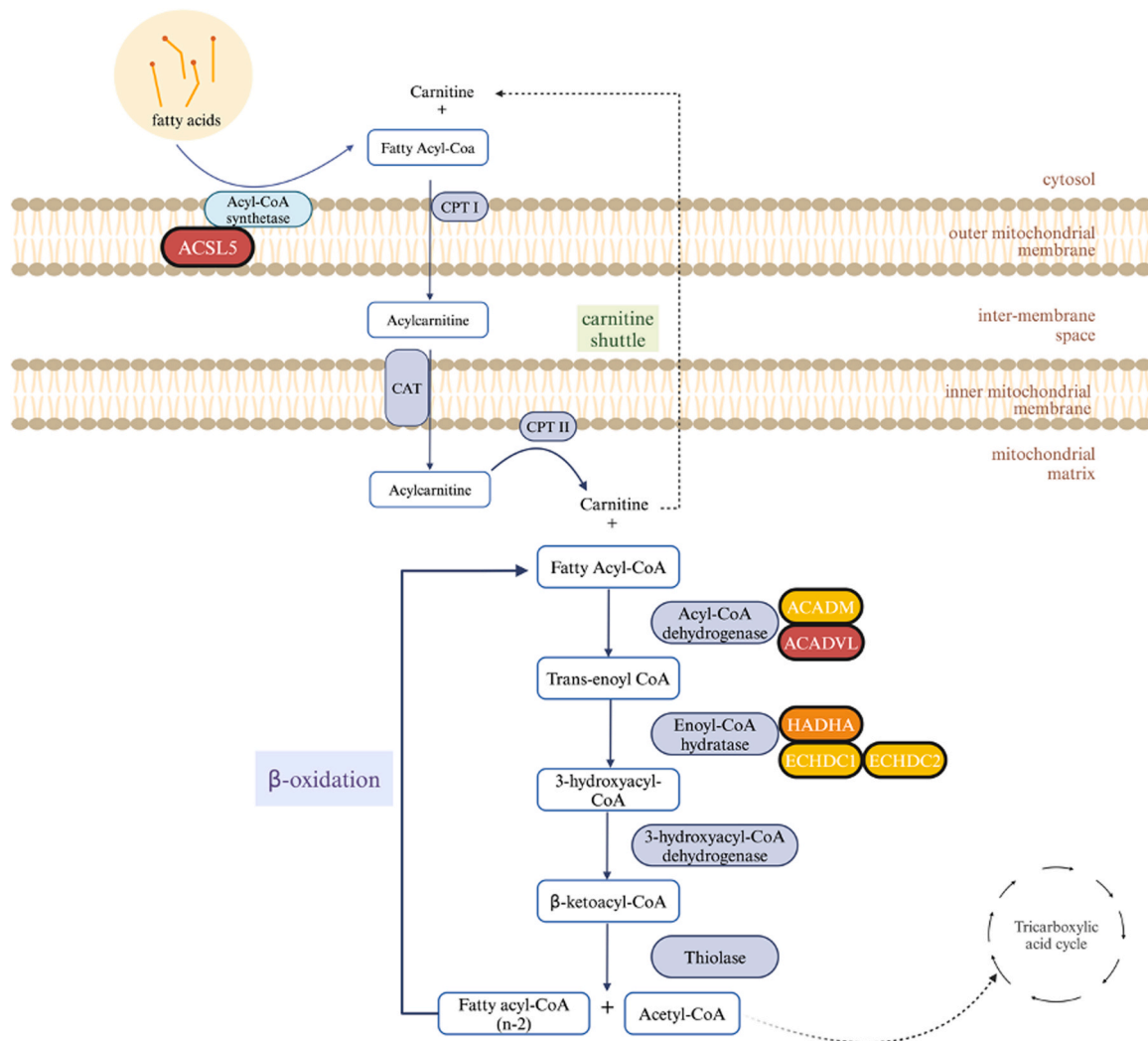


Fig. 7. Simplified β -oxidation pathway within the mitochondria. Fatty acids are first activated in the cytosol by Acyl-CoA synthetase, then transported into the mitochondrial matrix via the carnitine shuttle. Once inside the matrix, β -oxidation proceeds through a series of enzymatic reactions, ultimately producing acetyl-CoA, which enters the tricarboxylic acid cycle (TCA) for further energy production. (CPT I) carnitine palmitoyltransferase I; (CAT) carnitine-acylcarnitine translocase; (CPT II) carnitine palmitoyltransferase II. The genes or proteins whose expression differed between groups with varying doses of vitamin D are highlighted in red (in gene level), orange (in gene and protein level), or yellow (on protein level). These compounds belong to protein families with the enzymatic functions indicated to the left on the diagram and are specific for β -oxidation.

adverse metabolic effects in non-deficient states.

Importantly, our findings also resonate with clinical reports of altered lipid metabolism following supplementation: for example, in hypertensive patients with low baseline vitamin D status, eight weeks of 2800 IU/day increased serum cholesterol, triglycerides, and apolipoproteins B, CII, and CIII [45]. Together, these results suggest that vitamin D₃ oversupply in already sufficient individuals may shift its actions from beneficial to maladaptive, underscoring the need for context-specific dosing and monitoring strategies.

4.3. Vitamin D may regulate hepatic lipid metabolism via non-classical mechanisms

Mechanistically, vitamin D's beneficial effects on hepatic metabolism have been attributed to its ability to downregulate SREBP-1c, thereby reducing de novo lipogenesis while simultaneously enhancing β -oxidation via PPAR α activation [13,40]. Recent findings also suggest that beyond classical 1,25(OH)₂D-VDR signaling, alternative vitamin D metabolites—such as lactone-vitamin D₃—may directly affect hepatic enzymes. Specifically, lactone-vitamin D₃ has been shown to bind to

HADHA. This interaction inhibits the association between HADHA and TMLHE, an enzyme essential for carnitine biosynthesis [31]. As carnitine is required for mitochondrial fatty acid import, this interaction may impair β -oxidation through carnitine deficiency. Supporting this, our qPCR results showed slight *TMLHE* downregulation at 5000 IU/kg of feed and upregulation at 10,000 IU/kg of feed, possibly reflecting dose-dependent feedback mechanisms aimed at preserving FAO. Notably, in high-latitude animals, seasonal peaks in serum vitamin D during summer are thought to promote the formation of lactone-vitamin D₃, which may suppress carnitine biosynthesis and limit lipid oxidation as an adaptive mechanism to conserve energy for winter scarcity [31].

Our results also indicate that vitamin D metabolites may directly regulate β -oxidation by altering the gene expression and protein levels of key β -oxidation enzymes. Notably, these effects do not seem to be mediated through VDR signaling. The liver exhibits relatively low *VDR* expression, and we observed no changes in *VDR* gene ($p = 0.298$) levels, further supporting the hypothesis that the observed metabolic alterations arise from accumulation of vitamin D₃ metabolites rather than classical VDR-driven transcriptional activation. This may also explain why our study predominantly identified downregulation of β -oxidation-

related genes, contrasting with the expected transcriptional activation associated with VDR-dependent pathways.

5. Conclusions

Collectively, our results underscore the dual role of vitamin D in liver health—while it supports lipid metabolism and reduces inflammation in deficiency states or disease conditions, excessive intake in vitamin D-sufficient individuals may impair fatty acid β -oxidation and contribute to metabolic disturbances. The convergence of biochemical, transcriptomic, and proteomic evidence—particularly the downregulation of β -oxidation pathway components—suggests that long-term very high-dose vitamin D₃ supplementation in healthy organisms can lead to potentially adverse effects, beyond hypercalcemia. These effects may stem from the accumulation of vitamin D metabolites, possibly lactone-vitamin D₃, however, as we did not directly measure vitamin D metabolite levels in this study, this hypothesis requires further verification. Interestingly, our results challenge the assumption that higher supplementation directly translates into increased health benefit. Although increasing dietary vitamin D₃ elevated its concentration in pork, the levels were still insufficient to classify pork as a significant dietary source of this nutrient. Furthermore, no improvements in fattening characteristics were observed, indicating limited practical benefits. Given these findings, high-dose vitamin D₃ supplementation beyond standard recommendations should be approached with caution, especially in non-deficient individuals. While the relatively short lifespan of pigs may preclude overt phenotypic consequences, prolonged exposure in longer-lived species—including humans—could be toxic and must be managed under clinical supervision. Human responses to supplementation are highly individualized and influenced by baseline vitamin D status, diet, genetic background, and gut microbiota composition. Our findings should not be interpreted as evidence against moderate vitamin D₃ supplementation in deficient or at-risk individuals. Rather, this investigation provides a new direction in vitamin D research by emphasizing that its effects may be nuanced, dose-sensitive, and highly context-dependent. Importantly, it provides a fresh perspective on the potential adverse consequences of very high-dose supplementation, extending beyond the well-recognized risks of hypercalcemia and tissue calcification.

CRedit authorship contribution statement

Anna Steg: Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Grzegorz Smolucha:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Małgorzata Świątkiewicz:** Conceptualization. **Maria Oczkiewicz:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

Ethics statement

The study was approved by the 1st Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 427/2020, date 22.07.2020). The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to.

Funding

This work was supported by the National Science Centre (2019/35/O/NZ9/03148).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

None

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jsbmb.2025.106835](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2025.106835).

Data Availability

The sequencing data have been submitted to the GEO server (GSE295960).

References

- [1] I. Aggelotopoulou, K. Thomopoulos, A. Mouzaki, C. Triantos, Vitamin D–VDR novel anti-inflammatory molecules—new insights into their effects on liver diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (15) (2022), <https://doi.org/10.3390/ijms23158465>.
- [2] A.U. Amaral, M. Wajner, Recent advances in the pathophysiology of fatty acid oxidation defects: secondary alterations of bioenergetics and mitochondrial calcium homeostasis caused by the accumulating fatty acids, *Front. Genet.* 11 (2020), <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.598976>.
- [3] J.N. Artaza, K.C. Norris, Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells, *J. Endocrinol.* 200 (2) (2009) 207–221, <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0241>.
- [4] I. Barchetta, F.A. Cimini, M.G. Cavallo, Vitamin D supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: present and future, *Nutrients* 9 (9) (2017) 1015, <https://doi.org/10.3390/nu9091015>.
- [5] D. Bartolini, L. Zadini, A. Migni, T. Frammartino, A. Guerrini, S. Garetto, J. Lucci, I. F. Moscardini, G. Marcantonini, A.M. Stabile, M. Rende, F. Galli, Transcriptomics of natural and synthetic vitamin D in human hepatocyte lipotoxicity, *J. Nutr. Biochem.* 117 (2023) 109319, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109319>.
- [6] D. Bitetto, C. Fabris, E. Fornasiere, C. Pipan, E. Fumolo, A. Cussigh, S. Bignulin, S. Cmet, E. Fontanini, E. Falletti, R. Martinella, M. Pirisi, P. Toniutto, Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C, *Transpl. Int.* 24 (1) (2011) 43–50, <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01141.x>.
- [7] G. Bjelakovic, D. Nikolova, M. Bjelaković, C. Gluud, Vitamin D supplementation for chronic liver diseases in adults, *Cochrane Database Syst. Rev.* (11) (2017), <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011564.pub2>.
- [8] T.A. Bowman, K.R. O'Keefe, T. D'Aquila, Q.W. Yan, J.D. Griffin, E.A. Killion, D. M. Salter, D.G. Mashek, K.K. Buhman, A.S. Greenberg, Acyl CoA synthetase 5 (ACSL5) ablation in mice increases energy expenditure and insulin sensitivity and delays fat absorption, *Article 3. Mol. Metab.* 5 (3) (2016) <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.001>.
- [9] Z. Changizi, F. Kajbaf, A. Moslehi, An Overview of the Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptors in Liver Diseases, *J. Clin. Transl. Hepatol.* 11 (7) (2023) 1542–1552, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2023.00334>.
- [10] M. Dastorani, E. Aghadavod, N. Mirhosseini, F. Forozaanfar, S. Zadeh Modarres, M. Amiri Siavashani, Z. Asemi, The effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles and gene expression of insulin and lipid metabolism in infertile polycystic ovary syndrome candidates for in vitro fertilization, *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 16 (1) (2018) 94, <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0413-3>.
- [11] J. Ding, U. Loizides-Mangold, G. Rando, V. Zoete, O. Michielin, J.K. Reddy, W. Wahli, H. Riezman, B. Thorens, The peroxisomal enzyme L-PBE is required to prevent the dietary toxicity of medium-chain fatty acids, *Cell Rep.* 5 (1) (2013) 248–258, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.032>.
- [12] B. Dong, Y. Zhou, W. Wang, J. Scott, K. Kim, Z. Sun, Q. Guo, Y. Lu, N.M. Gonzales, H. Wu, S.M. Hartig, R.B. York, F. Yang, D.D. Moore, Vitamin D receptor activation in liver macrophages ameliorates hepatic inflammation, steatosis, and insulin resistance in mice, *Hepatology* 71 (5) (2020) 1559–1574, <https://doi.org/10.1002/hep.30937>.
- [13] T. Du, L. Xiang, J. Zhang, C. Yang, W. Zhao, J. Li, Y. Zhou, L. Ma, Vitamin D improves hepatic steatosis in NAFLD via regulation of fatty acid uptake and β -oxidation, *Front. Endocrinol.* 14 (2023) 1138078, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1138078>.
- [14] M. Gascon-Barré, C. Demers, A. Mirshahi, S. Neron, S. Zalzal, A. Nanci, The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells, *Hepatology* 37 (5) (2003) 1034, <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50176>.
- [15] X. Guo, C. Wang, T. Yang, S. Li, K. Li, D. Li, Vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Food Funct.* 11 (9) (2020) 7389–7399, <https://doi.org/10.1039/D0FO01095B>.
- [16] J.G. Haddad, The Vitamin D Binding Protein and Its Clinical Significance, in: In.M. F. Holick (Ed.), *Vitamin D: Molecular Biology, Physiology, and Clinical*

- Applications, Humana Press, 1999, pp. 101–107, https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2861-3_6.
- [17] A. Hanel, H.-R. Malmberg, C. Carlberg, Genome-wide effects of chromatin on vitamin D signaling, *J. Mol. Endocrinol.* 64 (4) (2020) R45–R56, <https://doi.org/10.1530/JME-19-0246>.
 - [18] R.W.J. Hangelbroek, A.M.M. Vaes, M.V. Boekschoten, L.B. Verdijk, G.J.E. J. Hooiveld, L.J.C. van Loon, L.C.P.G.M. de Groot, S. Kersten, No effect of 25-hydroxyvitamin D supplementation on the skeletal muscle transcriptome in vitamin D deficient frail older adults, *BMC Geriatr.* 19 (2019) 151, <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1156-5>.
 - [19] M. Hariri, S. Zohdi, Effect of vitamin D on non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review of randomized controlled clinical trials, *Int. J. Prev. Med.* 10 (1) (2019) 14, <https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM.499.17>.
 - [20] M. Hasan, M. Oster, H. Reyer, K. Wimmers, D.-C. Fischer, Efficacy of dietary vitamin D3 and 25(OH)D3 on reproductive capacities, growth performance, immunity and bone development in pigs, *Br. J. Nutr.* 130 (8) (2023) 1298–1307, <https://doi.org/10.1017/S0007114523000442>.
 - [21] M. Hasan, H. Reyer, M. Oster, N. Trakooljul, S. Ponsuksilli, E. Magowan, D.-C. Fischer, K. Wimmers, Exposure to artificial ultraviolet-B light mediates alterations on the hepatic transcriptome and vitamin D metabolism in pigs, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 236 (2024) 106428, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106428>.
 - [22] J. Heeren, L. Scheja, Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism, *Mol. Metab.* 50 (2021) 101238, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>.
 - [23] S.M. Houten, S. Violante, F.V. Ventura, R.J.A. Wanders, The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders, *Annu. Rev. Physiol.* 78 (1) (2016) 23–44, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>.
 - [24] Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. (2011). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D (A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, & H. B. Del Valle, Eds.). National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/>.
 - [25] S. Kersten, S. Mandard, P. Escher, F.J. Gonzalez, S. Tafuri, B. Desvergne, W. Wahli, The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15 (11) (2001) 1971–1978, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0147com>.
 - [26] Z. Le-tian, H. Cheng-zhang, Z. Xuan, Q. Zhang, Y. Zhen-gui, W. Qing-qing, W. Sheng-xuan, X. Zhong-jin, L. Ran-ran, L. Ting-jun, S. Zhong-qu, W. Zhong-hua, S. Ke-rong, Protein acetylation in mitochondria plays critical functions in the pathogenesis of fatty liver disease, *Article 1. BMC Genom.* 21 (1) (2020) <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06837-y>.
 - [27] B. Li, S.-Y. Cai, J.L. Boyer, The role of the retinoid receptor, RAR/RXR heterodimer, in liver physiology, *Article 5. Biochim. Et. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* 1867 (5) (2021) <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2021.166085>.
 - [28] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (4) (2001) 4, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> (San Diego, Calif.).
 - [29] Z. Malihi, Z. Wu, C.M.M. Lawes, R. Scragg, Adverse events from large dose vitamin D supplementation taken for one year or longer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 188 (2019) 29–37, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.12.002>.
 - [30] Z. Malihi, Z. Wu, C. MM Lawes, R. Scragg, Noncalcemic adverse effects and withdrawals in randomized controlled trials of long-term vitamin D2 or D3 supplementation: a systematic review and meta-analysis, *Nutr. Rev.* 75 (12) (2017) 1007–1034, <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux059>.
 - [31] A. Mendoza, Y. Takemoto, K.T. Cruzado, S.S. Masoud, A. Nagata, A. Tantiapanjarn, S. Okuda, F. Kawagoe, R. Sakamoto, M. Odagi, S. Mototani, M. Togashi, M. Kawatani, H. Aono, H. Osada, H. Nakagawa, T. Higashi, A. Kittaka, K. Nagasawa, M. Uesugi, Controlled lipid β -oxidation and carnitine biosynthesis by a vitamin D metabolite, *Cell Chem. Biol.* 29 (4) (2022) 660–669.e12, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.08.008>.
 - [32] N. Nikolaou, L.L. Gathercole, L. Marchand, S. Althari, N.J. Dempster, C.J. Green, M. van de Bunt, C. McNeil, A. Arvaniti, B.A. Hughes, B. Sgromo, R.S. Gillies, H.-U. Marschall, T.M. Penning, J. Ryan, W. Arlt, L. Hodson, J.W. Tomlinson, AKR1D1 is a novel regulator of metabolic phenotype in human hepatocytes and is dysregulated in non-alcoholic fatty liver disease, *Metabolism* 99 (2019) 67–80, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.153947>.
 - [33] NRC. (2012). Nutrient Requirements of Swine. National Academies Press.
 - [34] M. Oczkiewicz, B. Szymczyk, M. Świątkiewicz, A. Wierzbicka, A. Steg, T. Szmatoła, Effect of vitamin D3 supplementation on blood parameters and liver gene expression in female rats, *Mol. Biol. Rep.* 51 (2024), <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09408-6>.
 - [35] Y. Pasing, C.G. Fenton, R. Jorde, R.H. Paulsen, Changes in the human transcriptome upon vitamin D supplementation, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 173 (2017) 93–99, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.016>.
 - [36] S. Petta, S. Grimaudo, V.D. Marco, C. Scazzone, F.S. Macaluso, C. Cammà, D. Cabibi, R. Pipitone, A. Craxi, Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients, *J. Viral Hepat.* 20 (7) (2013) 486–493, <https://doi.org/10.1111/jvh.12072>.
 - [37] J.J. Potter, X. Liu, A. Koteish, E. Mezey, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human $\alpha 1(I)$ collagen expression and type I collagen formation, *Liver Int.* 33 (5) (2013) 677–686, <https://doi.org/10.1111/liv.12122>.
 - [38] L.L.C. Poulsen, M. Siersbæk, S. Mandrup, PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism, *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (6) (2012) 631–639, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>.
 - [39] M.S. Razzaque, Can adverse effects of excessive vitamin D supplementation occur without developing hypervitaminosis D? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 180 (2018) 81–86, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.006>.
 - [40] D. Reda, G.E. Elshopakey, T.A. Albukhari, S.J. Almhadi, B. Refaat, E.F. Risha, H. A. Mahgoub, M.E. El-Boshy, F.M. Abdelhamid, Vitamin D3 alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats by inhibiting hepatic oxidative stress and inflammation via the SREBP-1-c/PPAR α -NF- κ B/IR-S2 signaling pathway, *Front. Pharmacol.* 14 (2023), <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1164512>.
 - [41] J.K. Reddy, M. Sambasiva Rao, Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (5) (2006) G852–G858, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00521.2005>.
 - [42] F. Saponaro, A. Saba, R. Zucchi, An Update on Vitamin D Metabolism, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18) (2020) 6573, <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>.
 - [43] S. Sarkar, Molecular crosstalk between vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease, *Explor. Res. Hypothesis Med.* (2023), <https://doi.org/10.14218/ERHM.2023.00019>.
 - [44] Z. Savić, N. Milic, D. Nićforović, D. Damjanov, R. Pellicano, M. Medic-Stojanoska, L. Abenavoli, Vitamin D supplementation in patients with alcoholic liver cirrhosis: a prospective study, *Minerva Med.* 109 (2018), <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.18.05723-3>.
 - [45] V. Schwetz, H. Scharnagl, C. Trummer, T. Stojakovic, M. Pandis, M.R. Grubler, N. Verheyen, M. Gaksch, A. Zittermann, F. Aberer, E. Lerchbaum, B. Obermayer-Pietsch, T.R. Pieber, W. März, A. Tomaschitz, S. Pilz, Vitamin D supplementation and lipoprotein metabolism: a randomized controlled trial, *J. Clin. Lipidol.* 12 (3) (2018) 588–596.e4, <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.03.079>.
 - [46] M. Siddiqui, J.S. Manansala, H.A. Abdulrahman, G.K. Nasrallah, M.K. Smatti, N. Younes, A.A. Althani, H.M. Yassine, Immune modulatory effects of vitamin D on viral infections, *Article 9. Nutrients* 12 (9) (2020) <https://doi.org/10.3390/nu12092879>.
 - [47] G. Smolucha, A. Steg, M. Oczkiewicz, The role of vitamins in mitigating the effects of various stress factors in pigs breeding, *Article 8. Animals* 14 (8) (2024) <https://doi.org/10.3390/ani14081218>.
 - [48] S. Spedding, S. Vanlint, H. Morris, R. Scragg, Does Vitamin D sufficiency equate to a single serum 25-Hydroxyvitamin D level or are different levels required for non-skeletal diseases?, *Article 12. Nutrients* 5 (12) (2013) <https://doi.org/10.3390/nu5125127>.
 - [49] A. Steg, M. Oczkiewicz, M. Świątkiewicz, Effects of high-dose vitamin D3 supplementation on pig performance, vitamin D content in meat, and muscle transcriptome in pigs, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (2024), <https://doi.org/10.1111/jpn.14066>.
 - [50] R. Sun, Z. Man, J. Ji, S. Ji, K. Xu, Y. Pu, L. Yu, J. Zhang, L. Yin, Y. Pu, L-Carnitine protects against 1,4-benzoquinone-induced apoptosis and DNA damage by suppressing oxidative stress and promoting fatty acid oxidation in K562 cells, *Article 10. Environ. Toxicol.* 35 (10) (2020) <https://doi.org/10.1002/tox.22939>.
 - [51] R. Tabrizi, M. Moosazadeh, K.B. Lankarani, M. Akbari, S.T. Heydari, F. Kolahdooz, M. Samimi, Z. Asemi, The effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles and liver function in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Diabetes Metabolic Syndrome Clinical Research Reviews* 11 (2017) S975–S982, <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.07.025>.
 - [52] J.A. Tamblin, L.E. Jeffery, R. Susarla, D.M. Lissauer, S.L. Coort, A.M. Garcia, K. Knoblich, A.L. Fletcher, J.N. Bulmer, M.D. Kilby, M. Hewison, Transcriptomic analysis of vitamin D responses in uterine and peripheral NK cells, *Reprod. (Camb. Engl.)* 158 (2) (2019) 211–221, <https://doi.org/10.1530/REP-18-0509>.
 - [53] S. Todisco, A. Santarsiero, P. Convertini, G. De Stefano, M. Gilio, V. Iacobazzi, V. Infantino, PPAR Alpha as a Metabolic Modulator of the Liver: Role in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH), *Biology* 11 (5) (2022), <https://doi.org/10.3390/biology11050792>. Article 5.
 - [54] E. Tourkochristou, A. Mouzaki, C. Triantos, Gene polymorphisms and biological effects of vitamin D receptor on nonalcoholic fatty liver disease development and progression, *Article 9. Int. J. Mol. Sci.* 24 (9) (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms24098288>.
 - [55] E. Tourkochristou, E.P. Tsounis, H. Tzoupis, I. Aggeletopoulou, A. Tsintoni, T. Lourida, G. Diamantopoulou, K. Zisimopoulos, T. Kafentzi, A.-L. de Lastic, M. Rodi, T. Tselios, K. Thomopoulos, A. Mouzaki, C. Triantos, The influence of single nucleotide polymorphisms on vitamin D receptor protein levels and function in chronic liver disease, *Article 14. Int. J. Mol. Sci.* 24 (14) (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms241411404>.
 - [56] E. Trépo, R. Ouziel, P. Pradat, Y. Momozawa, E. Quertinmont, C. Gervy, T. Gustot, D. Degré, V. Vercruysse, P. Deltenre, L. Verset, B. Gulbis, D. Franchimont, J. Deviere, A. Lemmers, C. Moreno, Marked 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with poor prognosis in patients with alcoholic liver disease, *J. Hepatol.* 59 (2) (2013) 344–350, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.024>.
 - [57] L. Valanejad, C. Nadolny, S. Shiffka, Y. Chen, S. You, R. Deng, Differential feedback regulation of $\Delta 4$ -3-oxosteroid 5 β -reductase expression by bile acids, *PLOS ONE* 12 (1) (2017) e0170960, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170960>.
 - [58] P.G. Vaughan-Shaw, J.P. Blackmur, G. Grimes, L.-Y. Ooi, A.M. Ochocka-Fox, K. Dunbar, A. von Kriegsheim, V. Rajasekaran, M. Timofeeva, M. Walker, V. Svinti, F.V.N. Din, S.M. Farrington, M.G. Dunlop, Vitamin D treatment induces in vitro and ex vivo transcriptomic changes indicating anti-tumor effects, *FASEB J.* 36 (1) (2022) e22082, <https://doi.org/10.1096/fj.202101430RR>.
 - [59] R. Vieth, M.F. Holick, Chapter 57B - The IOM—endocrine society controversy on recommended vitamin D targets: in support of the endocrine society position, in: D. Feldman (Ed.), *Vitamin D*, Fourth ed., Academic Press, 2018, pp. 1091–1107, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00059-8>.

- [60] G.E. Walker, A. Follenzi, V. Brusca, M. Manfredi, S. Bellone, E. Marengo, L. Maiuri, F. Prodham, G. Bona, Fetuin B links vitamin D deficiency and pediatric obesity: Direct negative regulation by vitamin D, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 182 (2018) 37–49, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.009>.
- [61] Y. Wang, T. Nakajima, F.J. Gonzalez, N. Tanaka, PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (6) (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21062061>. Article 6.
- [62] S.J. Wimalawansa, Physiology of Vitamin D—Focusing on disease prevention, *Nutrients* 16 (11) (2024), <https://doi.org/10.3390/nu16111666>.
- [63] Y. Yin, Z. Yu, M. Xia, X. Luo, X. Lu, W. Ling, Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism, *Eur. J. Clin. Invest.* 42 (11) (2012) 1189–1196, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x>.
- [64] X.-L. Zhang, L. Chen, J. Yang, S.-S. Zhao, S. Jin, N. Ao, J. Yang, H.-X. Liu, J. Du, Vitamin D alleviates non-alcoholic fatty liver disease via restoring gut microbiota and metabolism, *Front. Microbiol.* 14 (2023) 1117644, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117644>.
- [65] S. Zhang, L. Liu, X. Li, T. Zhou, Q. Shi, D. Li, X. Ju, Transcriptomic and proteomic sequencing unveils the role of vitamin D and metabolic flux shifts in the induction of human hepatic organoids, *Stem Cell Res. Ther.* 15 (1) (2024) 478, <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04101-8>.
- [66] T. Zhang, Z. Yu, L. Hu, C. Zhang, H. Miao, R. Yang, M. Qi, B. Wu, X. Huang, A comprehensive LOVD database for fatty acid oxidation disorders in chinese populations, *Hum. Mutat.* 2023 (1) (2023) 5493978, <https://doi.org/10.1155/2023/5493978>.
- [67] Y. Zhang, F. Zhou, M. Bai, Y. Liu, L. Zhang, Q. Zhu, Y. Bi, G. Ning, L. Zhou, X. Wang, The pivotal role of protein acetylation in linking glucose and fatty acid metabolism to β -cell function, *Article 2*, *Cell Death Dis.* 10 (2) (2019), <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1349-z>.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice, 19.08.2025
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **mgr Anna Steg**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Oczkowicz, M., Smołucha, G. (2022), **Omics as a Tool to Help Determine the Effectiveness of Supplements**. Nutrients, 14(24), 5305., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, przeglądzie literatury, przygotowaniu oryginalnej wersji tekstu oraz korekcji i edycji manuskryptu.

Anna Steg
(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice 22.08.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr hab. Maria Oczkiewicz prof. IZ**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Oczkiewicz, M., Smołucha, G. (2022), **Omics as a Tool to Help Determine the Effectiveness of Supplements**. *Nutrients*, 14(24), 5305., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, uzyskaniu finansowania, recenzji i poprawie manuskryptu.

Oczkiewicz

(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Bolice, 19.08.2015
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr Grzegorz Smołucha**

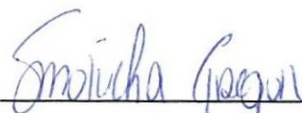
Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Oczkowicz, M., Smołucha, G. (2022), **Omics as a Tool to Help Determine the Effectiveness of Supplements**. *Nutrients*, 14(24), 5305., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy oraz poprawie i recenzji manuskryptu.


(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice, 19.08.2025
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **mgr Anna Steg**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Oczkowicz, M., Świątkiewicz, M. (2024), **Effects of High-Dose Vitamin D3 Supplementation on Pig Performance, Vitamin D Content in Meat, and Muscle Transcriptome in Pigs**. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 109: 560-573., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii, pobraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu badań eksperymentalnych – NGS, RT-PCR, analizie statystycznej i zarządzaniu danymi, wizualizacji wyników, przygotowaniu oryginalnej wersji tekstu oraz korekcji i edycji manuskryptu.


(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Żalice 22.08.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr hab. Maria Oczkowicz prof. IZ**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Oczkowicz, M., Świątkiewicz, M. (2024), **Effects of High-Dose Vitamin D3 Supplementation on Pig Performance, Vitamin D Content in Meat, and Muscle Transcriptome in Pigs**. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 109: 560-573., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, zarządzaniu projektem, pobraniu materiału badawczego, opracowaniu metodologii transkryptomicznej, zapewnieniu narzędzi analitycznych, opiece merytorycznej oraz korekcji i edycji manuskryptu.

Oczkiewicz

(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Aleksandrowice, 19.08.2025

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

Afiliacja: **Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

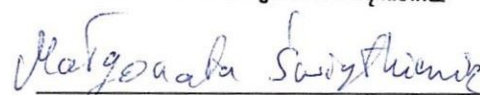
Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Oczkowicz, M., Świątkiewicz, M. (2024), **Effects of High-Dose Vitamin D3 Supplementation on Pig Performance, Vitamin D Content in Meat, and Muscle Transcriptome in Pigs**. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 109: 560-573., mój udział polegał na:

opracowaniu doświadczenia żywieniowego, zapewnieniu narzędzi analitycznych oraz korekcie i edycji manuskryptu.

Prof. Dr Hab. Małgorzata Świątkiewicz

A handwritten signature in blue ink, reading 'Małgorzata Świątkiewicz', written over a horizontal line.

(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice, 19.08.2025
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **mgr Anna Steg**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Smołucha, G., Świątkiewicz, M., Oczkiewicz, M. (2025), **Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 254, 106835., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badań eksperymentalnych – NGS, elektroforeza dwuwymiarowa, RT-PCR, western blot, analizie statystycznej oraz zarządzaniu danymi, wizualizacji wyników, przygotowaniu oryginalnej wersji tekstu oraz korekcji i edycji manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Bolesław, 19.08.2025
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr Grzegorz Smolucha**

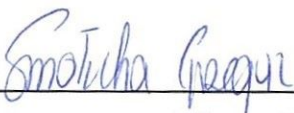
Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Smolucha, G., Świątkiewicz, M., Oczkiewicz, M. (2025), **Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 254, 106835., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii proteomicznej, opiece naukowej, pomocy w analizach, oraz recenzji i edycji manuskryptu.


(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Aleksandrowice, 19.08.2025

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

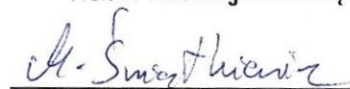
Afiliacja: **Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Smołucha, G., Świątkiewicz, M., Oczkiewicz, M. (2025), **Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 254, 106835., mój udział polegał na:
opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy.

Prof. Dr Hab. Małgorzata Świątkiewicz



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice 22.08.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr hab. Maria Oczkiewicz prof. IZ**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Steg, A., Smołucha, G., Świątkiewicz, M., Oczkiewicz, M. (2025),

Very high-dose vitamin D₃ supplementation reduces the expression of genes and proteins engaged in β -oxidation in healthy pigs. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 254, 106835., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, uzyskaniu finansowania, zarządzaniu projektem i danymi, opracowaniu metodologii, opiece naukowej, oraz recenzji i edycji manuskryptu.

Oczkiewicz

(czytelny podpis współautora)

Aneks do rozprawy

A. Steg, A. Wierzbicka, M. Świątkiewicz, M. Oczkiewicz. Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D₃ alter transcriptome of adipose tissue? Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, str. 268, 2022, ISBN: 978-90-8686-937-4

Session 17

Poster 29

Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D3 alter transcriptome of adipose tissue?

A.S. Steg¹, A.W. Wierzbicka¹, M.O. Oczkiewicz¹ and M.Ś. Świątkiewicz²

¹National Research Institute of Animal Production, Department of Animal Molecular Biology, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa, Poland, ²National Research Institute of Animal Production, Department of Animal Nutrition and Feed Science, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa, Poland; anna.steg@iz.edu.pl

While vitamin D functions related to the maintenance of skeletal function and the immune system are well documented, there are also indications for the role of vitamin D in obesity prevention. While studies on adipocytes indicate some changes in genes due to vitamin D supplementation, there are no studies on the effect of this compound on the entire transcriptome *in vivo* in pigs. The aim of our study is to check whether supplementation with high doses of vitamin D₃ in the pigs' diet causes changes in the transcriptome of the adipocyte tissue. In the experiment, 30 pigs were divided into three dietary groups, differing in the content of vitamin D₃ in the feed (no supplementation, supplementation with 5,000 U/kg of feed, and supplementation with 10,000 U/kg of feed). Following three months of supplementation, adipose tissue was collected. Isolated RNA after preparing 3' quant mRNA libraries (Lexogen) was subjected to next-generation sequencing (NGS) on NextSeq5500 (Illumina). After filtering and mapping, analysis was performed with DeSeq2 software. The analysis showed that in the case of adipose tissue, there were no significant changes (Differentially Expressed Genes-DEGs) in the transcriptome, regardless of the dose of vitamin D₃ used (p adjusted>0.05). In order to verify in depth whether supplementation with high doses of vitamin D₃ has any effect on a specific signalling pathway or functional groups of genes, the gene set enrichment analysis (GSEA) was performed with the use of STRING software analysis. From the whole dataset, genes with a baseMean value of less than 10 were removed, and by ranking the genes by the P-value, a list of genes with their corresponding log2FoldChange values was created. Analysis showed two KEGG pathway enrichments: oxidative phosphorylation (enrichment score=1,96, FDR=0.00052) and non-alcoholic fatty liver disease (enrichment score=1,53, FDR=0.00052). In conclusion, our results show that vitamin D supplementation, even with high doses, has little effect on adipose transcriptome in pigs.

Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D3 alter transcriptome of adipose tissue?

A. Steg¹, A. Wierzbicka¹, M. Świątkiewicz², M. Oczkiewicz¹

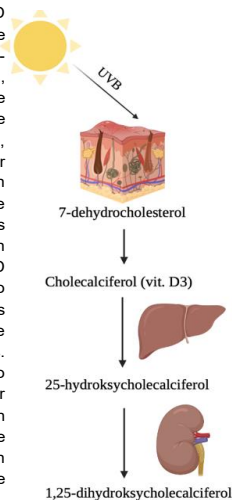
¹Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, Balice, Poland

²Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Balice, Poland



INTRODUCTION

While vitamin D functions related to the maintenance of calcium-phosphate homeostasis, skeletal function and the immune system are extensively documented, there are also indications for the role of vitamin D in obesity prevention. While studies on adipocytes indicate some changes in genes due to vitamin D supplementation, there are no studies on the effect of this compound on the entire transcriptome *in vivo* in pigs. The aim of our study is to check whether supplementation with high doses of vitamin D3 in the pigs' diet causes changes in the transcriptome of the adipocyte tissue.



RESULTS

The analysis showed that in the case of adipose tissue, there were no significant changes (Differentially Expressed Genes-DEGs) in the transcriptome, regardless of the dose of vitamin D3 used (p adjusted > 0.05).

In order to verify in depth whether supplementation with high doses of vitamin D3 has any effect on a specific signaling pathway or functional groups of genes, the gene set enrichment analysis (GSEA) was performed with

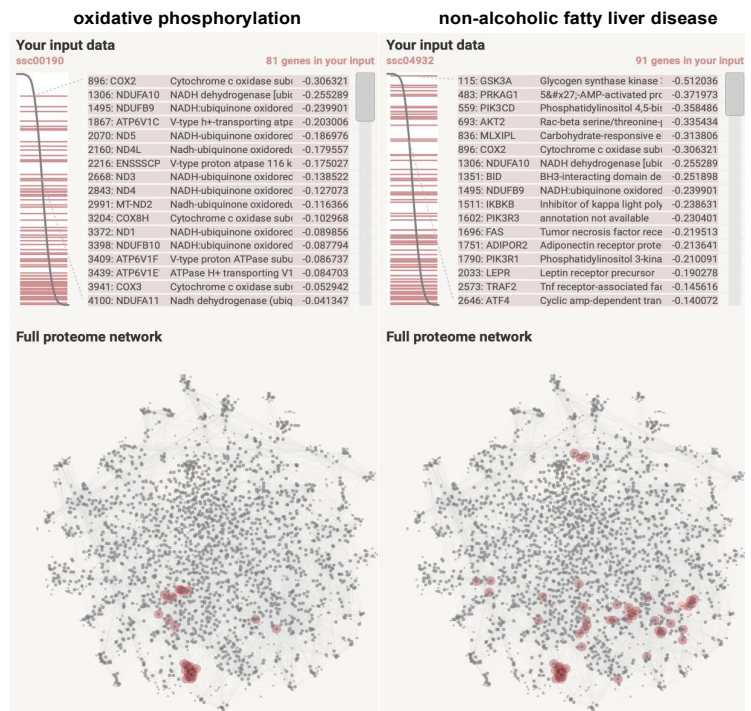
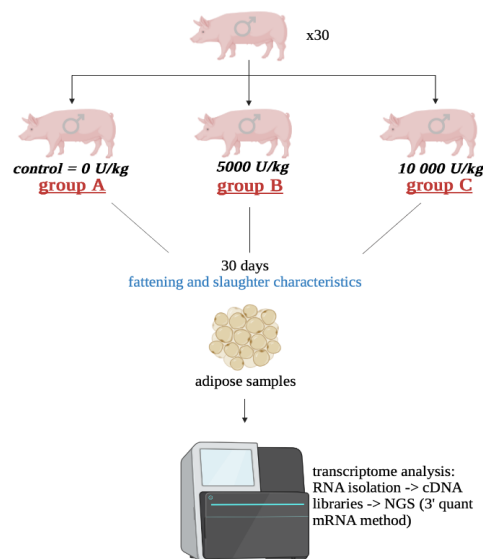
the use of STRING software analysis. From the whole dataset, genes with a baseMean value of less than 10 were removed, and by ranking the genes by the p value, a list of genes with their corresponding log2FoldChange values was created. Analysis showed two KEGG pathway enrichments: oxidative phosphorylation pathway (enrichment score=1.96, FDR=0.00052) and non-alcoholic fatty liver disease (enrichment score=1.53, FDR=0.00052).

term description	genes mapped	enrichment score	direction	false discovery rate
Oxidative phosphorylation	81	1.96292	bottom	0.00052
Non-alcoholic fatty liver disease	91	1.52489	bottom	0.00052

METHODOLOGY

In the experiment, 30 pigs were divided into three dietary groups, differing in the content of vitamin D3 in the feed (no supplementation, supplementation with 5000 U/kg of feed, and supplementation with 10000 U/kg of feed). Following three months of supplementation, adipose tissue was collected.

Isolated RNA after preparing 3' quant mRNA libraries (Lexogen) was subjected to next-generation sequencing (NGS) on NextSeq5500 (Illumina). After filtering and mapping, differential expression analysis was performed with DeSeq2 software.



In conclusion, our results show that vitamin D supplementation, even with high doses, has little effect on adipose transcriptome in pigs.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice, 19.08.25
Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **mgr Anna Steg**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: A. Steg, A. Wierzbicka, M. Świątkiewicz, M. Oczkiewicz. Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D₃ alter transcriptome of adipose tissue? Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, str. 268, 2022., mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, opracowaniu metodologii, pobraniu materiału badawczego, przeprowadzeniu badań eksperymentalnych, analizie statystycznej i zarządzaniu danymi, wizualizacji wyników, przygotowaniu oryginalnej wersji tekstu oraz korekcji i edycji manuskryptu.

Anna Steg

(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

kraków, 23.08.2023

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr inż Alicja Wierzbicka**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: A. Steg, A. Wierzbicka, M. Świątkiewicz, M. Oczkowicz. Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D₃ alter transcriptome of adipose tissue? Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, str. 268, 2022, mój udział polegał na:

udziale w izolacji RNA oraz przygotowaniu bibliotek do sekwencjonowania

Alicja Wierzbicka
(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Aleksandrowice, 19.08.2025

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

Afiliacja: **Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: A. Steg, A. Wierzbicka, M. Świątkiewicz, M. Oczkiewicz. Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D₃ alter transcriptome of adipose tissue? Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, str. 268, 2022., mój udział polegał na:
opracowaniu doświadczenia żywieniowego, korekcie i edycji doniesienia.

Prof. Dr Hab. Małgorzata Świątkiewicz



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Balice 22.08.2025

Miejscowość i data

Imię i nazwisko: **dr hab. Maria Oczkiewicz prof. IZ**

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki PIB w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: A. Steg, A. Wierzbicka, M. Świątkiewicz, M. Oczkiewicz. Does supplementation of pig diets with high doses of vitamin D₃ alter transcriptome of adipose tissue? Book of Abstracts of the 73rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, str. 268, 2022, mój udział polegał na:

opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy, zarządzaniu projektem, pobraniu materiału badawczego, opracowaniu metodologii, zapewnieniu narzędzi analitycznych, opiece merytorycznej oraz korekcji i edycji doniesienia.

Oczkiewicz

(czytelny podpis współautora)