

Vitamina D e malattie cardiovascolari: una valutazione delle prove

Peter F. Schnatz^{1,2,3,4}, JoAnn E. Manson⁵

¹Dipartimenti di Ostetricia e Ginecologia e ²Medicina Interna, The Reading Hospital and Medical Center, Reading, USA

³Dipartimenti di Ostetricia e Ginecologia e ⁴Medicina Interna, Jefferson Medical College of Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA

⁵Dipartimento di Medicina, Divisione di Medicina Preventiva, Brigham and Women's Hospital/Harvard Medical School, Boston, USA

Traduzione a cura di Davide Giavarina

ABSTRACT

Supplementation with vitamin D has received attention as a potential cardioprotective strategy. Biologically plausible mechanisms have been proposed to link vitamin D to coronary heart disease (CHD) prevention, and observational studies suggest an inverse association between serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD) concentrations and CHD. Few randomized clinical trials of vitamin D supplementation and CHD have been conducted, however, and no trial with CHD as the primary prespecified outcome has been completed. A search was conducted in PubMed to find prospective studies of the use of vitamin D supplementation and its relationship to cardiovascular risk factors (RFs) and/or cardiovascular disease (CVD). The exact search query was: ((vitamin D supplement*[Title/Abstract]) AND cardiovascular [Title/Abstract]) AND prospective [Title/Abstract]. This query yielded 42 results. "Randomized Controlled Trial" (article type) was used as a filter in a subsequent query with the same search terms. We review the evidence that vitamin D supplementation modifies coronary RFs, such as blood pressure, lipids, glucose tolerance, and/or affects the development of clinical CHD events. We address potential sources of confounding in observational epidemiologic studies of the relationship between serum 25OHD and CHD. We also address laboratory assay issues relevant to the reliable measurement of 25OHD. Most vitamin D supplementation trials have not demonstrated improvement in CVD, but they have tested relatively low vitamin D doses. Thus, the evidence remains inconclusive, highlighting the need for rigorous randomized trials of higher vitamin D doses with cardiovascular events as prespecified outcomes. While we await the results of ongoing trials, the recommended dietary allowances from the Institute of Medicine remain the best guidepost for nutritional requirements.

INTRODUZIONE

Negli Stati Uniti la malattia coronarica (CHD) rimane la prima causa di morte (1, 2). I principali fattori di rischio per CHD in entrambi i sessi comprendono l'età avanzata, il fumo, il diabete mellito, la dislipidemia, l'ipertensione, la scarsa attività fisica, l'obesità, la sindrome metabolica, una storia familiare di CHD in giovane età (rispettivamente <55 e <65 anni per maschi e femmine) e una storia personale di malattia arteriosa periferica (2-5). Tuttavia, pochi Americani riescono ad avere un controllo ottimale di questi fattori di rischio e, d'altra parte, questi fattori di rischio tradizionali non spiegano molti eventi di CHD (6). Perciò, nuovi approcci per ridurre il rischio di CHD sono di grande interesse.

La vitamina D ha raccolto di recente attenzione per le sue potenziali proprietà cardioprotettive ed è diventata un argomento di notevole interesse sia per la comunità clinica che per la ricerca. Un aumento dell'incidenza di CHD e di iperlipemia alle latitudini più alte è stata ecologicamente correlata a una minore esposizione alla luce solare (7). Altri studi hanno riportato che gli individui con una minore esposizione alla luce ultravioletta hanno minori concentrazioni di vitamina D e di un rischio più alto di CHD, infarto miocardico e ipertensione (8-10). Basse concentrazioni di vitamina D nel siero sono state anche associate a un aumentato rischio di morte cardiaca improvvisa, a malattia arteriosa periferica e a un maggiore spessore intimo-mediale della carotide (11-13). Tuttavia, gli

**Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2014;60:600-9 su permesso dell'Editore.*

Copyright originale © 2013 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.

studi randomizzati relativi a queste relazioni sono stati finora scarsi e i dati ottenuti da questi studi sono stati contraddittori. Le donne in post menopausa, così come gli uomini più anziani, possono essere a rischio particolarmente elevato di deficit di vitamina D a causa delle diminuzioni associate all'età della fotoisomerizzazione a livello cutaneo del 7-deidrocolesterolo e per le minori assunzioni giornaliere di vitamina (14).

PRODUZIONE E OMEOSTASI DELLA VITAMINA D

La vitamina D (calciferolo) è un termine che si riferisce a un gruppo di composti liposolubili con una struttura a 4 anelli tipo colesterolo. Nella pelle la provitamina D è fotoisomerizzata a vitamina D₃ (coleciferolo) dalla luce del sole e da quella ultravioletta. L'altra maggior fonte di vitamina D è l'assorbimento intestinale. La vitamina D₃ viene poi trasportata al fegato, dove è idrossilata a 25-idrossivitamina D (25OHD), che comprende sia 25OHD₂ che 25OHD₃. La 25OHD va poi al rene, dove viene ulteriormente idrossilata a 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)₂D o calcitriolo], la forma fisiologicamente attiva della vitamina D (15-17). La misura più rappresentativa dello stato della vitamina D è la concentrazione nel siero di 25OHD (18, 19). La concentrazione sierica di 25OHD è un eccellente indicatore di sufficienza di vitamina D, perché riflette la quantità totale immagazzinata da fonti sia endogene che esogene (18). Non appena le concentrazioni sieriche di 25OHD si riducono, le concentrazioni di ormone paratiroideo aumentano e influenzano positivamente la conversione di 25OHD a 1,25(OH)₂D, influenzando sull'assorbimento intestinale di calcio. Pertanto, la 1,25(OH)₂D non è rappresentativa delle scorte corporee totali di vitamina D, perché il calcio sierico e le concentrazioni di 1,25(OH)₂D saranno normali o leggermente aumentate durante la carenza di vitamina D, a causa dell'iperparatiroidismo secondario (18, 20).

FATTORI DI RISCHIO PER LA CARENZA DI VITAMINA D

I fattori di rischio per lo sviluppo di carenza o di basse concentrazioni nel siero di vitamina D includono un'età >65 anni (21) una pigmentazione scura della pelle, l'obesità [per l'accumulo nel tessuto adiposo (22)], patologie del rene o del fegato (23), disturbi che interessano l'assorbimento di grassi (ad es., celiachia, malattia di Crohn, colite ulcerosa, alcuni tipi di chirurgia bariatrica) e l'insensibilità d'organo alla 1,25(OH)₂D. Inoltre, la carenza di 25OHD può essere correlata a variabili ambientali che portano alla riduzione dell'esposizione alla luce ultravioletta, come, ad es., l'istituzionalizzazione, la ridotta attività fisica all'aperto e una condizione di debolezza e fragilità (24).

MECCANISMI POTENZIALI DI ASSOCIAZIONE TRA CARENZA DI VITAMINA D E CHD

Recettori per la vitamina D (VDR) sono stati identificati in molti tessuti, tra cui le cellule della muscolatura liscia dei vasi, i cardiomiociti e le arterie coronarie (25-27). Data la presenza di VDR nel sistema vascolare, comprese le arterie coronarie, ci sono diverse ipotesi biologicamente plausibili per spiegare come la vitamina D potrebbe portare a un miglioramento della salute cardiovascolare. L'attivazione dei VDR, per esempio, ha dimostrato di inibire la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia vascolare, fenomeno che si ritiene essere cardioprotettivo (28). Alcuni studi hanno associato concentrazioni di 25OHD più elevate e/o la supplementazione di vitamina D con uno stato antinfiammatorio sistemico attraverso un effetto su interleuchine, proteina C reattiva e citochine antiinfiammatorie, una situazione che, ancora una volta, si crede favorisca la cardioprotezione (29-31). La vitamina D può controllare la pressione sanguigna attraverso i suoi effetti regolatori sul sistema renina-angiotensina-aldosterone (32). Ricerche limitate hanno suggerito che la supplementazione di vitamina D possa ridurre l'incidenza di diminuita tolleranza al glucosio e diabete mellito (33, 34), associandosi a un miglioramento dei valori dei parametri lipidici (35). Inoltre, i risultati di vari studi hanno suggerito un legame tra la vitamina D e una minore probabilità di patologie autoimmuni, quali artrite reumatoide (36), diabete (sia di tipo 1 che di tipo 2) (37, 38) e sclerosi multipla (39).

DATI OSSERVAZIONALI

Gran parte dell'entusiasmo relativo alla correlazione tra carenza di vitamina D e CHD deriva da dati osservazionali. Ad esempio, Giovannucci et al. (9) hanno seguito 18.000 soggetti sani di sesso maschile per 10 anni. Gli individui con carenza di vitamina D, definiti in base a concentrazioni di 25OHD nel siero ≤ 15 $\mu\text{g/L}$ (38 nmol/L), avevano un maggior rischio di infarto miocardico rispetto ai soggetti con concentrazioni di 25OHD ≥ 30 $\mu\text{g/L}$ (75 nmol/L), con un rischio relativo di 2,42 [intervallo di confidenza (CI) al 95%, 1,53-3,84; $P < 0,001$]. Il "Framingham Offspring Study", un'analisi prospettica di 1739 individui con concentrazioni di 25OHD < 15 $\mu\text{g/L}$, ha fornito un rischio relativo aggiustato per un primo episodio di evento cardiovascolare pari a 1,6 (95% CI, 1,11-2,36; $P = 0,01$). I partecipanti che avevano ipertensione associata al deficit di 25OHD avevano un rischio relativo per un primo evento cardiovascolare di 2,1 (95% CI, 1,3-3,5; $P = 0,003$) (18). Una metanalisi di studi prospettici osservazionali su 25OHD ed eventi cardiovascolari ha dimostrato un'associazione lineare inversa fino a 24 $\mu\text{g/L}$ (60 nmol/L), ma non ha rivelato ulteriori riduzioni di rischio cardiovascolare per concentrazioni più elevate di 25OHD (40).

Limiti dei dati osservazionali

Nonostante i dati rilevanti che dimostrano un'associazione tra la carenza di vitamina D e gli esiti cardiovascolari avversi, una certa cautela è raccomandabile nell'interpretazione dei dati da studi osservazionali. In studi non randomizzati, fattori confondenti derivanti dallo stile di vita e da "bias" nella definizione dei "soggetti sani" possono giocare un ruolo influente sulle prove che suggeriscono un'associazione. Ad esempio, l'età deve essere attentamente controllata nell'analisi, perché l'età avanzata aumenta sia il rischio di carenza di vitamina D che il rischio di infarto miocardico (21, 41). La diminuita assunzione con la dieta e uno stato nutrizionale carente possono entrambi portare a carenza nutrizionale di vitamina D. L'assunzione più bassa potrebbe essere dovuta ad altre malattie o a una malnutrizione generale, condizioni che potrebbero aumentare il rischio di CHD. La ridotta esposizione alla luce ultravioletta può essere dovuta a una minore attività fisica all'aperto e quindi portare a un aumento del rischio di CHD e di bassa 25OHD. Un altro fattore di rischio confondente è l'obesità, che aumenta il rischio di CHD e abbassa le concentrazioni di 25OHD, perché questa vitamina può essere sequestrata nei tessuti adiposi (22).

Pochi studi osservazionali sono in grado di prendere in considerazione pienamente questi fattori confondenti. Pertanto, tutti questi fattori di rischio, che hanno maggiori probabilità di essere associati con bassi livelli di 25OHD, possono confondere il rapporto tra 25OHD e CHD negli studi non randomizzati. Come abbiamo evidenziato in precedenza, la vitamina D è stata associata a una situazione di anti-infiammazione sistemica. Anche se meccanismi rilevanti possono spiegare una benefica interazione tra vitamina D e proteina C reattiva, interleuchine e/o citochine (29-31), è stato anche suggerito che la carenza di vitamina D sia una diretta conseguenza di una condizione o di uno stato infiammatorio (42).

STUDI RANDOMIZZATI CONTROLLATI

Sono stati condotti pochi studi clinici prospettici randomizzati che valutano gli effetti della supplementazione di vitamina D sulla CHD e al momento nessuno degli studi prospettici ha predefinito la CHD come "outcome" primario (43-45). Tra i pochi studi che hanno valutato la CHD - o i fattori di rischio di CHD - come "outcome" secondario o terziario, nessuna correlazione è stata identificata con la CHD e pochi studi ne hanno trovata per i fattori di rischio di CHD (Tabella 1) (46-58). In uno studio su 327 uomini e donne di età oltre 65 anni, gli individui che avevano ricevuto vitamina D₃ in realtà mostravano un aumentato rischio di morte coronarica ($P < 0,001$) (58). In uno studio clinico in doppio cieco, controllato e randomizzato, condotto nel Regno Unito su 2686 uomini e donne di età tra 65 e 85 anni, i partecipanti avevano ricevuto una supplementazione di 100.000 IU di vitamina D₃ ogni 4 mesi (equivalente a

~833 IU/die) per 5 anni (46). Non è stato possibile attribuire alcun effetto benefico sulla CHD alla vitamina D (46). Dati aggiuntivi provenienti dalla "Women's Health Initiative" suggeriscono che le donne in menopausa che ricevevano 400 IU/die di vitamina D₃ per via orale in associazione con 1 g/die di calcio non avevano alcuna riduzione del loro di rischio di CHD o di ictus (50). In un altro studio prospettico (da una subanalisi della "Women's Health Initiative") si è trovato che la supplementazione di calcio e vitamina D non migliorava la pressione arteriosa (49) né il "calcium score" delle arterie coronariche (53). Inoltre, non vi era alcuna diminuzione nella frequenza di ipertensione (59) o una qualsiasi prevenzione o miglioramento della sindrome metabolica o del diabete (47). In uno studio prospettico di 8 settimane su 151 adulti, uomini e donne, carenti di vitamina D, randomizzati a ricevere 50.000 UI di vitamina D₃ o placebo, non è stato trovato alcun miglioramento nei parametri lipidici (48). Due piccoli studi prospettici, che hanno valutato la funzione endoteliale, hanno prodotto risultati contrastanti, con uno che non mostrava alcun effetto (51) e l'altro che mostrava un miglioramento a breve termine nei pazienti colpiti da ictus con ipertensione ben controllata; tuttavia, l'effetto non era mantenuto al termine dello studio, dopo 16 settimane (52).

Molti piccoli studi prospettici hanno evidenziato qualche miglioramento nei fattori di rischio di CHD (55) e nell'infiammazione (30, 56). Altri dati non hanno mostrato alcun effetto sul controllo glicemico (54, 57). Un recente studio prospettico randomizzato, in doppio cieco contro placebo, ha valutato il cambiamento della pressione sistolica e diastolica in una popolazione nera sana, trattata con placebo oppure 1000, 2000 o 4000 IU/die di vitamina D₃ per 3 mesi (60). I risultati di questo studio dimostravano una riduzione di 1,4 mmHg nella pressione sistolica per ogni incremento della dose di vitamina D₃ pari a 1000 IU/die ($P=0,04$). Sebbene i ricercatori non abbiano trovato alcun effetto statisticamente significativo della vitamina D₃ somministrata per via orale sulla pressione diastolica, il loro studio ha rivelato una diminuzione di 0,2 mmHg per ogni aumento di 1 µg/L (2,5 nmol/L) della 25OHD ($P=0,02$). Nonostante il significativo effetto della vitamina D₃ sulla pressione sistolica, pareva esserci un effetto soglia, con individui che ricevendo 2000 o 4000 IU/die di vitamina D₃ avevano risultati simili. Inoltre, chi aveva una concentrazione di partenza ≥ 20 µg/L (50 nmol/L) mostrava un beneficio minore dalla supplementazione, confrontato con quello ottenuto dai partecipanti con una concentrazione di partenza < 20 µg/L, che avevano una diminuzione della pressione sistolica di 2,2 mmHg ($P=0,03$). Inoltre, l'aggiustamento per le differenze basali nella pressione arteriosa attenuava i risultati dello studio. Mentre questa sperimentazione era progettata per valutare i cambiamenti nella pressione del sangue, è da notare che gran parte degli altri studi sono stati disegnati per valutare lo stato di salute ossea. Gli "outcome" cardiovascolari non erano "end point" primari predefiniti per gran parte degli studi.

Tabella 1
Studi prospettici randomizzati di supplementazione di vitamina D ed eventi per malattia cardiaca coronarica (CHD) o fattori di rischio cardiovascolare

Disegno	"Outcome" primario	"Outcome" dello studio	Sintesi dello studio, dimensione del campione, età dei soggetti, via/dose di trattamento	Lunghezza e "follow-up"	"Outcome" relativi a CHD o a fattori di rischio per CHD	Condizioni preesistenti o malattie	Riferimento bibliografico
DB, PC, RCT	Prevenzione del cancro del colon-retto	Cambiamenti nella SBP e DBP	Neri (n=283; 30-80 anni; mediana, 51 anni) randomizzati per 3 mesi a placebo, 1000, 2000 o 4000 IU/die VitD ₃ , seguiti da trattamento per ulteriori tre mesi	6 mesi	Un cambiamento di -1,4 mmHg nella SBP per ogni 1000 IU/die di VitD ₃ aggiuntiva (P=0,04). Non significativi effetti sulla DBP. Ogni aumento di 1 µg/L di 25OHD si accompagnava a un cambiamento di -0,2 mmHg in SBP (P=0,02)	Soggetti apparentemente sani. Sono stati esclusi pazienti con disordini preesistenti delle paratiroidi o del metabolismo del calcio; pazienti con DM di tipo I, sarcoidosi, tumori o patologie della tiroide	Forman et al. (60)
DB, PC, RCT	Cambiamenti della FMV dell'arteria brachiale, della PWV e dell'indice di aumento aortico	Lo stesso dell'"outcome" primario	Donne in post-menopausa [n=114; età media (DS), 63,9 (3) anni] con concentrazioni sieriche di 25OHD >10 and <60 µg/L; somministrazione giornaliera di 2500 IU VitD ₃ o placebo	4 mesi	La supplementazione di VitD ₃ non ha migliorato la funzione endoteliale, la rigidità arteriosa o l'infiammazione	Donne ambulatoriali apparentemente sane, residenti in comunità; escluse pazienti con CVD	Gepner et al. (51)
DB, PC, RCT	Cambiamenti nel numero di particelle "small LDL"	Altre frazioni lipidiche	Maschi e femmine adulti (n=151) carenti di VitD ₃ (25OHD ≤20 µg/L) con somministrazione settimanale di 50.000 IU VitD ₃	8 settimane	La supplementazione di VitD ₃ ha fallito nel migliorare il profilo lipidico	Rischio aumentato di CVD (con almeno uno dei fattori di rischio conosciuto di CVD)	Ponda et al. (48)

DB, PC, RCT	BP, FMV dell'arteria brachiale, colesterolo e altri "marker" di salute vascolare	Lo stesso	Soggetti (n=58; età media, 67 anni) con somministrazione orale unica iniziale di 100.000 IU di VitD ₂ o placebo	16 settimane di "follow-up"	Alte dosi di supplementazione orale di VitD non hanno migliorato la BP, ma hanno prodotto un miglioramento a breve termine nella funzione endoteliale in pazienti con ictus e pressione ben controllata all'arruolamento; l'effetto non è stato confermato alla fine dello studio	Storia di ictus con concentrazioni basali di 25OHD <75 nmol/L	Witham et al. (52)
DB, PC, RCT	Frattura dell'anca	CAC "score"	Studio Ca/D all'interno dello studio ormonale WHI (estrogeni nelle donne sottoposte a isterectomia). Donne (n=754; età, 50-59 anni) con somministrazione giornaliera di carbonato di calcio (1000 mg di calcio) e VitD ₃ (400 UI)	7 anni	I gruppi di trattamento e in placebo non erano diversi per CAC "score" alla fine dello studio	Donne in post-menopausa in condizioni generali di buona salute	Manson et al. (53)
DB, PC, RCT	Lipidi sierici a digiuno, BP, test di tolleranza al glucosio	Lo stesso	Pazienti obesi o sovrappeso (n=438; 21-70 anni) con somministrazione di VitD ₃ (40.000 o 20.000 IU/settimana) o placebo; tutti hanno ricevuto 500 mg calcio/die; 330 pazienti hanno completato lo studio	1 anno	Nessun effetto significativo della VitD ₃ su tolleranza al glucosio, BP o lipidi sierici	Pazienti obesi o in sovrappeso	Jorde et al. (56)
PC, RCT	Controllo glicemico in pazienti con DM tipo 2	Lo stesso	Pazienti (n = 36) con somministrazione di VitD ₃ (40.000 IU/settimana) o placebo	6 mesi	Nessun effetto significativo della VitD ₃ sul metabolismo degli zuccheri	Diabetici di tipo 2 trattati con metformina e insulina alla sera	Jorde et al. (54)

DB, PC, RCT	Perdita di peso e fattori di rischio per CVD tradizionali e non	Lo stesso dell'“outcome” primario (PTH, TG e marcatori di infiammazione)	Soggetti (n=200; media basale di 25OHD, 30 nmol/L) hanno ricevuto 3320 IU/die di VitD o placebo mentre erano arruolati in un programma di riduzione del peso	12 mesi	Non effetti avversi della VitD sulla perdita di peso, ma significativa diminuzione di PTH, TG, TNF (sebbene le LDL fossero aumentate) nei soggetti in sovrappeso con stato vitaminico D inadeguato, mentre stavano partecipando a un programma di riduzione del peso	Sovrappeso Zittermann et al. (55)
DB, PC, RCT	Frattura dell'anca	Incidenza di DM	WHI studio Ca/D su donne in post-menopausa (n=36.282; età, 50-79 anni); somministrazione di 1000 mg di calcio elementare + 400 IU di VitD ₃ al giorno	7 anni di “follow up”	Nessun effetto benefico di riduzione dell'incidenza di DM o sindrome metabolica	Donne in post-menopausa in buona salute DeBoer et al. (47)
DB, PC, RCT	Frattura dell'anca	Cambiamenti nella BP e sviluppo di ipertensione	WHI studio Ca/D su donne in post-menopausa (n=36.282); somministrazione di 1000 mg di calcio elementare + 400 IU di VitD ₃ al giorno	7 anni di “follow up”	Nessun effetto benefico significativo su BP o sulla riduzione dell'incidenza di ipertensione	Donne in post-menopausa in buona salute Margolis et al. (49)
DB, PC, RCT	Frattura dell'anca	Rischio di CHD	WHI studio Ca/D su donne in post-menopausa (n=36.282; età, 50-79 anni); somministrazione di 500 mg di calcio carbonato + 200 IU di VitD ₃ due volte al giorno	7 anni di “follow” up	Nessun effetto benefico su CHD	Donne in post-menopausa in buona salute Hsia et al. (50)

DB, PC, RCT	Percentuale di sopravvivenza, variabili biochimiche e profilo citochinico	Lo stesso dell'“outcome” primario	I partecipanti (n=123) hanno ricevuto 2000 IU di VitD ₃ e 500 mg di calcio al giorno (gruppo D+) oppure placebo e 500 mg di calcio al giorno (gruppo D-); 93 soggetti hanno completato lo studio	9 mesi di intervento, 15 mesi di “follow-up”	La VitD ₃ ha ridotto lo stato infiammatorio nei soggetti con CHF; aumento di interleuchina 10, ma significativo miglioramento nel PTH e TNF; nessuna differenza nella sopravvivenza	CHF	Schleithoff et al. (56)
DB, PC, RCT	Incidenza di fratture e mortalità totale conseguente	Lo stesso dell'“outcome” primario; dati aggiuntivi valutano la CVD	2686 partecipanti (2037 maschi; età, 65–85 anni) randomizzati per ricevere un supplemento di 100.000 IU di VitD ₃ ogni 4 mesi	5 anni	Nessun effetto benefico su CVD	Soggetti reclutati nella popolazione generale; esclusi se con storia di calcoli renali, sarcoidosi o neoplasia	Trivedi et al. (46)
DB, PC, RCT	Fratture	Mortalità coronarica	327 soggetti (57 maschi; >65 anni; media, 79,5 anni) che hanno ricevuto giornalmente tutte le possibili combinazioni di 3 g carbonato di calcio, 1000 IU VitD ₃ , 2,5 mg di metandienone e/o placebo	9 mesi	Mortalità coronarica più alta tra coloro che assumevano tutte e 3 le sostanze attive; aumento significativo di morte coronarica, maggiormente nei soggetti che ricevevano VitD ₃ e metandienone		Inkovaara et al. (58)

DB, doppio cieco; PC, placebo controllato; RCT, studio controllato randomizzato; SBP, pressione arteriosa sistolica; DBP, pressione arteriosa diastolica; VitD₃, vitamina D₃; DM, diabete mellito; FMV, vasodilatazione flusso-mediata; PWV, velocità dell'onda del polso carotido-femorale; CVD, malattia cardiovascolare; BP, pressione sanguigna; CAC, calcio coronarico; WHI, “Women's Health Initiative”; PTH, ormone paratiroideo; TG, trigliceridi; TNF, “tumor necrosis factor”; CHF, insufficienza cardiaca congestizia.

METANALISI DI STUDI RANDOMIZZATI

Diverse metanalisi hanno valutato sia la mortalità sia il rischio di CHD in riferimento alla loro relazione con la supplementazione di vitamina D. Una metanalisi di 18 studi clinici randomizzati, che comprendeva 57.311 individui, è stata pubblicata nel 2007 (61). Quest'analisi ha rilevato una diminuzione statisticamente significativa del 7% di tutte le cause di morte nei soggetti che ricevevano una supplementazione di vitamina D. Una metanalisi seguente (62), che comprendeva 24 studi randomizzati di pazienti che ricevevano una supplementazione di vitamina D, con o senza calcio per os, ha mostrato risultati simili, ma con le seguenti importanti variazioni. Sebbene i pazienti che ricevevano supplementazione di vitamina D e calcio avessero una riduzione del 7% in tutte le cause di mortalità, come era stato visto nello studio precedente (61), i soggetti che ricevevano la vitamina D da sola non mostravano alcuna significativa diminuzione della mortalità. Questi risultati sollevano una serie di questioni, incluso il ruolo che il calcio può avere in ogni effetto potenzialmente benefico associato alla supplementazione di vitamina D. Per valutare il ruolo della supplementazione di vitamina D, un'altra revisione sistematica e metanalisi ha identificato gli studi randomizzati pubblicati fino all'agosto 2010, nei quali i pazienti erano randomizzati per supplementazione di vitamina D o placebo (63). Gli "outcome" valutati includevano la mortalità, gli eventi cardiovascolari e i fattori di rischio di CHD. Sono stati selezionati un totale di 51 studi. Da notare che l'analisi non è stata in grado di identificare alcuna differenza significativa per nessuno degli "outcome", compresi infarto del miocardio, ictus, mortalità per ogni causa o fattori di rischio di CHD come le frazioni lipidiche, il glucosio e la pressione arteriosa sistolica e diastolica. Tuttavia, gran parte degli studi valutava dosi relativamente basse di vitamina D.

Sebbene l'associazione tra carenza di 25(OH)D e obesità non sia nuova (22), i risultati di una recente ampia metanalisi suggeriscono che un indice di massa corporea più alto porti a più basse concentrazioni plasmatiche di 25(OH)D, il che implica una relazione causale. Di contro, concentrazioni più basse di 25(OH)D non sembrano condurre a un maggiore indice di massa corporea (64). Se questi risultati fossero confermati, le strategie per diminuire l'obesità potrebbero anche portare a diminuire la prevalenza di carenza di 25(OH)D.

RACCOMANDAZIONI

L'"Institute of Medicine" (IOM) (44) e l'"Agency for Healthcare Research and Quality" (AHRQ) (43) hanno rivisto la letteratura relativa alla vitamina D e agli "outcome" correlati. Entrambi hanno concluso che sebbene esistano prove sufficienti per sostenere un ruolo per calcio e vitamina D nella salute dello scheletro, mancano quelle per supportare effetti salutari su "outcome" non legati all'osso (44, 45). L'IOM ha raccomandato una disponibilità nella dieta di 600 IU/die

per individui fino a 70 anni di età, con 800 IU/die raccomandate per gli individui oltre i 70 anni (18, 61). I rapporti dell'IOM e dell'AHRQ hanno generato qualche controversia e alcuni ricercatori hanno dichiarato che dovrebbe essere incoraggiata una maggiore disponibilità della vitamina nella dieta. L'"International Osteoporosis Foundation" (IOF), per esempio, raccomanda 800-1000 IU/die come dose di supplementazione media per raggiungere un'appropriate concentrazione plasmatica di 25OHD (65). L'IOF aggiunge che gli individui a rischio più elevato possono richiedere dosi fino a 2000 IU/die per raggiungere concentrazioni appropriate (65). La "National Osteoporosis Foundation" (NOF) raccomanda 400-800 IU/die di vitamina D₃ per os negli adulti <50 anni di età e 800-1000 IU/die per gli over 50 (66). In linea con le linee guida IOF, NOF specifica che alcuni soggetti possono aver bisogno di dosi più alte di vitamina D₃, con 4000 IU/die come dose limite di sicurezza (66). Similmente, la linea guida clinica della Società di Endocrinologia americana raccomanda almeno 600 IU/die per gli adulti tra 19 e 50 anni di età e 600-800 IU/die per gli over 50. Anche questa chiarisce che una dose di 1500-2000 IU/die potrebbe essere richiesta per tutti gli adulti per aumentare consistentemente le concentrazioni di 25OHD oltre 30 µg/L (>75 nmol/L) (67). Sebbene la concentrazione da usare come cut-off per la deficienza o la carenza di vitamina D sia tutt'altro che definita, l'IOM suggerisce che una concentrazione sierica di 25OHD di almeno 20 µg/L (50 nmol/L) soddisfi il fabbisogno di vitamina D per più del 97,5% della popolazione canadese e statunitense (68). Come discusso sopra, i risultati del recente studio che ha valutato l'effetto della vitamina D₃ per os sulla pressione arteriosa (60) supportano una concentrazione ≥20 µg/L come adeguata; solamente gli individui con concentrazioni basali di 25OHD <20 µg/L mostravano un significativo miglioramento della pressione sistolica in seguito alla supplementazione di vitamina D₃ (60).

ESAMI DI LABORATORIO

I dosaggi attualmente disponibili per la misura della 25OHD comprendono metodi immunochimici e di cromatografia liquida. Le metodologie per l'analisi della 25OHD plasmatica sono molto cambiate nel corso degli anni. I primi metodi usavano dosaggi con legame proteico competitivo, che erano difficili da eseguire e mancavano di robustezza. L'introduzione delle prime tecniche di cromatografia liquida negli anni '70 permise, per la prima volta, di riconoscere 25OHD₂ e 25OHD₃ separatamente. Mentre i dosaggi di cromatografia liquida erano perfezionati, negli anni '80 venivano introdotti i dosaggi basati sull'uso degli anticorpi. Più recentemente, i dosaggi immunologici sono stati modificati per adattarli alle micropiastre multipozzetto, che hanno reso questi dosaggi piuttosto popolari. Uno svantaggio significativo di questo approccio è l'incapacità di distinguere tra 25OHD₂ e 25OHD₃. È da notare che gran parte della ricerca relativa alle concentrazioni plasmatiche di vitamina D svolta nel

passato è stata eseguita con tecnologie basate su anticorpi. La varietà dei metodi di analisi e le questioni circa l'affidabilità dei test si aggiungono quindi alla complessità interpretativa delle precedenti ricerche. Più recentemente, i metodi di cromatografia liquida sono stati migliorati sostanzialmente con l'incorporazione dello spettrofotometro di massa tandem [cromatografia liquida-spettrometria tandem massa (LC-MS/MS)]. Questa innovazione produce risultati con sensibilità e specificità molto elevate, assieme a una straordinaria riproducibilità (44).

Poiché la maggior parte dei risultati sono stati prodotti con dosaggi immunochimici, è importante evidenziare i dubbi sull'inconsistenza dei metodi di dosaggio. Lo studio che ha incorporato confronti interlaboratorio suggerisce un elevato e preoccupante grado di variabilità (44). Questi risultati hanno condotto a programmi di VEQ, che utilizzano per la calibrazione una tecnica LC-MS/MS (69). Un materiale di riferimento e una soluzione di calibrazione sono oggi disponibili attraverso il NIST per aiutare ad assicurare l'accuratezza e l'affidabilità delle misure di 25OHD (44).

Uno studio ha confrontato i risultati ottenuti con DiaSorin Liaison con quelli ottenuti con un dosaggio LC-MS/MS (scelto come gold "standard" nominale) sugli stessi campioni e ha trovato che la percentuale di carenza di vitamina D era dal 16% al 29% più alta in funzione del metodo di laboratorio utilizzato. Inoltre, è stato visto che DiaSorin RIA produce valori sierici di 26OHD più bassi rispetto al metodo LC-MS/MS (70). Il metodo LC-MS/MS, che è considerato intrinsecamente più accurato, con le sue elevate sensibilità, specificità e riproducibilità tende a produrre valori di 25OHD che sono leggermente più alti di quelli ottenuti con tecniche RIA (70). Qualcuno ha ipotizzato che i risultati con LC-MS/MS potrebbero necessitare di essere corretti verso il basso attraverso una formula matematica, mentre altri hanno proposto che i risultati DiaSorin RIA possano essere corretti verso l'alto. A prescindere da queste argomentazioni, l'importanza di utilizzare un metodo di laboratorio consistente e affidabile è quindi centrale e la LC-MS/MS è al momento il metodo di laboratorio preferito.

Per la verifica di qualità, è di importanza critica che le valutazioni dei metodi siano eseguite su campioni di riferimento, con l'inclusione del materiale NIST. I campioni devono essere protetti dalla luce solare per assicurare accuratezza nei dosaggi (30, 44, 71). Il nuovo materiale di riferimento NIST offre la speranza che le misure della 25OHD possano raggiungere una migliore affidabilità ed esattezza e che così possano diminuire le variabilità tra risultati e tra laboratori viste in passato (44).

DIREZIONE DELLA RICERCA FUTURA

Sebbene la nostra conoscenza sulla carenza di vitamina D e le sue ramificazioni si stia rapidamente espandendo, c'è ancora molto da imparare. Sono stati condotti molti studi randomizzati su larga scala sulla

supplementazione, da moderata a elevata, di vitamina D nella prevenzione della malattia cardiovascolare (CVD). A titolo di esempio, lo studio VITAL ("Vitamin D and Omega-3 Trial") è uno studio controllato randomizzato in doppio cieco con placebo condotto su 20.000 uomini e donne statunitensi di oltre 50 anni di età. Valuta l'effetto della somministrazione di 2000 IU/die di vitamina D₃ per os e di acidi grassi ω -3 in un disegno fattoriale 2 x 2, con CVD e cancro come "outcome" primari predefiniti (72). I risultati sono attesi per il 2017. Mentre aspettiamo i risultati dello studio VITAL e di altri studi randomizzati sulla vitamina D in corso, è anche importante sottolineare che molti studi analizzeranno gli effetti della supplementazione di vitamina D₃ in una popolazione generale di soggetti carenti e non carenti di 25OHD. Ci potrebbe essere interesse, quindi, nello stratificare per le concentrazioni di base e successivamente analizzare i risultati nei soggetti con deficit di vitamina D (73).

Sebbene alcuni dati hanno suggerito che la concentrazione di VDR possa essere inversamente correlata con il grado di aterosclerosi coronarica (26), il legame o la relazione con la concentrazione plasmatica di 25OHD rimane non chiarito. Uno studio recente suggerisce che gli individui con le concentrazioni più alte di 25OHD₃ e con la più bassa densità di VDR abbiano il grado più elevato di aterosclerosi delle arterie coronarie (27), ma questi risultati hanno bisogno di essere confermati. Se lo fossero, essi suggerirebbero una possibile finestra terapeutica, poiché alte concentrazioni di 25OHD₃ potrebbero essere pregiudizievoli oltre un certo limite superiore (18). Altri dati hanno suggerito un forte legame tra la carenza di 25OHD₃ ed etnia/ereditabilità (74-78). Uno studio recente ha dimostrato che le differenze individuali nelle concentrazioni di 25OHD sono associate sia a fattori genetici che ambientali e che il contributo relativo sugli esiti CHD rimane non chiarito (75). In questo particolare studio, la variabilità attribuibile alla genetica era principalmente evidente in inverno, quando l'esposizione ai raggi ultravioletti era minima, mentre non era evidente nei mesi estivi, dimostrando implicitamente che i fattori ambientali (principalmente l'esposizione al sole) possono compensare la carenza di vitamina D associata alla genetica (76).

Come questa rassegna dimostra, abbiamo chiaramente bisogno di studi prospettici randomizzati ben disegnati e di adeguata potenza statistica con supplementazione di vitamina D e CHD o biomarcatori di CHD come "outcome" primari. Sarà importante determinare se la supplementazione causa una differenza clinicamente significativa per il rischio di CHD e se la concentrazione basale di 25OHD modifica la risposta. Questi studi aiuteranno a chiarire se le concentrazioni basse di vitamina D rappresentano un marcatore per altri processi, se sono indicatori di una predisposizione genetica alla malattia o se sono causalmente correlate al rischio. Partendo dal presupposto che la supplementazione di vitamina D sia davvero di valore per la prevenzione della CVD, qual è la dose ottimale e quale ruolo gioca la supplementazione

di calcio nell'equazione? Ancora, esiste il fenomeno della finestra terapeutica per cui non solo le concentrazioni basse ma anche le concentrazioni molto elevate possono essere dannose? Di contro, l'esame degli studi prospettici randomizzati e controllati con placebo completati (Tabella 1) mostra che la maggiore debolezza di molti di questi è che hanno valutato dosi di vitamina D più basse di quelle attualmente proposte per essere efficaci su "outcome" extra-scheletrici. Quale ruolo giocano i VDR, potrebbe un VDR agonista essere di beneficio o ci sono vie per prevenire la perdita di VDR e quindi ritardare lo sviluppo dell'aterosclerosi coronarica? Mentre aspettiamo i risultati delle ricerche in corso, attendiamo con ansia risposte a queste domande.

CONCLUSIONI

La revisione dello IOM suggerisce che concentrazioni più elevate di vitamina D non hanno mostrato di ridurre le malattie croniche al di là degli stabiliti benefici per l'osso, ma raccomanda che una ricerca maggiormente mirata continui a esplorare il ruolo della supplementazione di vitamina D nella prevenzione della CVD e di altre malattie croniche. Nonostante un plausibile meccanismo biologico per un ruolo della vitamina D come fattore cardioprotettivo, una relazione causa-effetto non è ancora stata dimostrata. Sebbene studi osservazionali abbiamo descritto una potenziale associazione, questi dati sono disturbati da fattori confondenti e di selezione. Una correlazione trovata in uno studio osservazionale non prova la causalità e parimenti i dati di studi randomizzati disponibili non hanno ancora dimostrato un chiaro beneficio. Perciò, in linea con IOM e AHRQ, ulteriori ricerche sono necessarie per far procedere le nostre conoscenze su questo tema. Nell'attesa dei risultati degli studi randomizzati in corso, compreso lo studio VITAL e molti altri nel mondo, i clinici devono essere prudenti per evitare non solo il sovratattamento con dosi elevate di supplementazione di vitamina D, ma anche un trattamento insufficiente, finché non conosceremo i veri rischi e benefici.

CONFLITTO DI INTERESSI

Fondi di ricerca: J.E. Manson, National Institutes of Health (CA138962) for VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL), uno studio randomizzato sulla supplementazione di vitamina D e omega-3 nella prevenzione del cancro e della malattia cardiovascolare.

BIBLIOGRAFIA

- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. AHA statistical update: heart disease and stroke statistics—2011 update; a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:e18–209.
- Mosca L, Barrett-Connor E, Kass Wenger N. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation* 2011;124:2145–54.
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, et al. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 1999;353:89–92.
- Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation* 2007;115:1481–501.
- Mosca L, Grundy SM, Judelson D, et al. AHA/ACC scientific statement: consensus panel statement. Guide to preventative cardiology for women. American Heart Association/American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1751–5.
- Kones R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey. *Drug Des Devel Ther* 2011;5:325–80.
- Grimes DS, Hindle E, Dyer T. Sunlight, cholesterol and coronary heart disease. *Q J Med* 1996;89:579–89.
- Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension* 1997;30:150–6.
- Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, et al. 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men. *Arch Intern Med* 2008;168:1174–80.
- Forman JP, Giovannucci E, Homes MD, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49:1063–9.
- Pilz S, Marz W, Wellnitz B, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3927–35.
- Melamed ML, Munter P, Michos ED, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1179–85.
- Targher G, Bertolini L, Padvoani R, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol* 2006;65:593–7.
- Tsai KS, Wahner HW, Offord KP, et al. Effect of aging vitamin D stores and bone density in women. *Calcif Tissue Int* 1987;40:241–3.
- Henry HL, Norman AW. Studies on calciferol metabolism. IX. Renal 25-hydroxy-vitamin D3–1 hydroxylase. Involvement of cytochrome P-450 and other properties. *J Biol Chem* 1974;249:7529–35.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–81.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29:726–76.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503–11.
- Manson JE, Bassuk SS. Vitamin D and cardiovascular disease. *Menopause Manag* 2009;18:28–31.
- Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, et al. Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. *Endocrinology* 2008;149:3656–67.
- Paula B, Ghetu MV, Langan R. Recognition and management of vitamin D deficiency. *Am Fam Physician* 2009;80:841–6.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690–3.
- Scragg R. Seasonality of cardiovascular disease mortality

- and the possible protective effect of ultraviolet radiation. *Int J Epidemiol* 1981;10:337–41.
24. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, et al. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 2002;112:659–62.
 25. Merke J, Milde P, Lewicka S, et al. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest* 1989;83:1903–15.
 26. Schnatz PF, Nudy M, O'Sullivan DM, et al. The quantification of vitamin D receptors in coronary arteries and their association with atherosclerosis. *Maturitas* 2012;73:143–7.
 27. Schnatz PF, Nudy M, O'Sullivan DM, et al. Coronary artery vitamin D receptor expression and plasma concentrations of vitamin D: their association with atherosclerosis. *Menopause* 2012;19:967–73.
 28. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, et al. Effects of vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2006;186:20–8.
 29. Rostkowska-Nadolska B, Sliupkas-Dyrda E, Potyka J, et al. Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures. *Adv Med Sci* 2010;55:86–92.
 30. Schnatz PF, Vila-Wright S, Jiang X, et al. The association between plasma 25OHD₃ concentrations, C-reactive protein levels, and coronary artery atherosclerosis in postmenopausal monkeys. *Menopause* 2012;19:1074–80.
 31. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 1998;128:68–72.
 32. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, et al. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89:387–92.
 33. Gedik O, Akalin S. Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* 1986;29:142–5.
 34. Muscogiuri G, Sorice GP, Ajjan R, et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:81–7.
 35. Schnatz PF, Nudy M, O'Sullivan DM, et al. Identification of a mechanism for increased cardiovascular risk among individuals with low vitamin D concentrations. *Menopause* 2011;18:994–1000.
 36. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, et al. Vitamin D: intake is inversely associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:72–7.
 37. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 2008;93:512–7.
 38. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2006;29:650–6.
 39. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;296:2832–8.
 40. Wang L, Song Y, Manson JE, et al. Circulating 25-hydroxy-vitamin D and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:819–29.
 41. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest* 1985;76:1536–8.
 42. Reid D, Toole BJ, Knox S, et al. The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after elective knee arthroplasty. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1006–11.
 43. Chung M, Balk EM, Brendel M, et al. Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. Evidence report no. 183 (prepared by the Tufts Evidence-based Practice Center under contract no. HHSA 290–2007–10055–I). AHRQ publication no. 09–E015. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; 2009.
 44. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, et al. IOM. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, eds. Washington, DC: National Academies Press; 2011. http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=13050&page=R1.
 45. IOM. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D [Report Brief]. 2010 Nov. <http://www.iom.edu/~media/Files/Report%20Files/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D/Vitamin%20D%20and%20Calcium%202010%20Report%20Brief.pdf>.
 46. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D₃ (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *Br Med J* 2003;326:469–75.
 47. De Boer IH, Tinker LF, Connelly S, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of incident diabetes in the Women's Health Initiative. *Diabetes Care* 2008;31:701–7.
 48. Ponda MP, Dowd K, Finkelstein D, et al. The short-term effects of vitamin D repletion on cholesterol: a randomized, placebo-controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2510–5.
 49. Margolis KL, Ray RM, Van Horn L, et al., for the Women's Health Initiative Investigators. Effect of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Hypertension* 2008;52:847–55.
 50. Hsai J, Heiss G, Ren H, et al. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007;115:846–54.
 51. Gepner AD, Ramamurthy R, Krueger DC, et al. A prospective randomized controlled trial of the effects of vitamin D supplementation on cardiovascular disease risk. *PLoS One* 2012;7:e36617.
 52. Witham MD, Dove FJ, Dryburgh M, et al. The effect of vitamin D replacement on markers of vascular health in stroke patients - a randomised controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:864–70.
 53. Manson JE, Allison MA, Carr JJ, et al. Calcium/vitamin D supplementation and coronary artery calcification in the Women's Health Initiative. *Menopause* 2010;17:683–91.
 54. Jorde R, Figenschau Y. Supplementation with cholecalciferol does not improve glycaemic control in diabetic subjects with normal serum 25-hydroxyvitamin D levels. *Eur J Nutr* 2009;48:349–54.
 55. Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr* 2009 89:1321–7.
 56. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83:754–9.
 57. Jorde R, Sneve M, Torjesen P, et al. No improvement in cardiovascular risk factors in overweight and obese subjects after supplementation with vitamin D₃ for 1 year. *J Intern Med* 2010;267:462–72.
 58. Inkovaara J, Gothoni G, Halttula R, et al. Calcium, vitamin

- D and anabolic steroid in treatment of aged bones: double-blind placebo-controlled long-term clinical trial. *Age Ageing* 1983;12:124–30.
59. Prentice RL, Pettinger MB, Jackson RD, et al. Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporos Int* 2013;24:567–80.
60. Forman JP, Scott JB, Ng K, et al. Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. *Hypertension* 2013;61:779–85.
61. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality. *Arch Intern Med* 2007;167:1730–7.
62. Rejnmark L, Avenell A, Masud T, et al. Vitamin D with calcium reduces mortality: patient level pooled analysis of 70,528 patients from eight major vitamin D trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2670–81.
63. Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1931–42.
64. Vimalaswaran KS, Berry DJ, Lu C, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bidirectional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 2013;10:e1001383.
65. International Osteoporosis Foundation (IOF). IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults - position paper. http://www.natap.org/2010/HIV/072310_01.htm.
66. National Osteoporosis Foundation. Calcium and vitamin D: what you need to know. <http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>.
67. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911–30.
68. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:53–8.
69. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, et al. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2012;243:32–40.
70. Graham DC. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011;12:19–28.
71. Lewis JG, Elder PA. Serum 25-OH vitamin D2 and D3 are stable under exaggerated conditions. *Clin Chem* 2008;54:1931–2.
72. Manson JE, Bassuk SS, Li I, et al. The VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL): rationale and design of a large randomized control trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemp Clin Trials* 2012;33:159–71.
73. Pilz S, Rutters F, Dekker JM. Disease prevention: vitamin D trials. *Science* 2012;338:883.
74. Ginde AA, Liu MC, Camargo CA. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988–2004. *Arch Intern Med* 2009;169:626–32.
75. Hunter D, De Lange M, Snieder H, et al. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *J Bone Miner Res* 2001;16:371–8.
76. Karohl C, Su S, Kumari M, et al. Heritability and seasonal variability of vitamin D concentrations in male twins. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1393–8.
77. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180–8.
78. Gutiérrez OM, Farwell WR, Kermah D, et al. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int* 2011;22:1745–53.