

UNIVERSITA' DI PISA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Specializzazione in Nefrologia

Tesi di Specializzazione:

**“INFLUENZA DELLA VITAMINA D SUL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA CIRCOLANTE ED
INTRARENALE IN PAZIENTI CON
IPERTENSIONE ARTERIOSA ESSENZIALE”**

Candidato:

Matteo Bernini

Relatore:

Chiar.mo Prof. Adamasco Cupisti

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 3
Vitamina D ed Effetti Cardiovascolari	pag. 3
Vitamina D ed Ipertensione Arteriosa	pag. 6
Vitamina D e Danno Vascolare	pag. 7
BACKGROUND	pag. 10
OBIETTIVI DELLO STUDIO	pag. 12
PAZIENTI E METODI	pag. 13
Pazienti	pag. 13
Protocollo	pag. 15
Misurazioni	pag. 16
Laboratorio	pag. 17
Analisi Statistica	pag. 18
RISULTATI	pag. 19
DISCUSSIONE	pag. 23
BIBLIOGRAFIA	pag. 28
TABELLE	pag. 35
FIGURE	pag. 40

INTRODUZIONE

Vitamina D ed Effetti Cardiovascolari

La scoperta dei recettori della vitamina D (VDR) e del sistema enzimatico per la metabolizzazione della vitamina D a livello cardiovascolare (CV), così come i risultati di ampi studi epidemiologici ed osservazioni ricavati da modelli animali hanno permesso di accertare i noti effetti sul metabolismo calcio/fosforo e sul tessuto osseo ma anche ipotizzare azioni cardioprotettive, antinfiammatorie ed antiaterosclerotiche direttamente esercitate da questa vitamina.

Studi su modelli animali

I primi studi che evidenziarono un link tra vitamina D ed omeostasi CV risalgono a più di 20 anni orsono. Essi, condotti sull'animale da esperimento, enfatizzarono l'associazione tra deficit di 25(OH)D ed alterazione dei livelli serici di calcio, fosforo, PTH da una parte e disfunzione cardiaca (intesa come comparsa di ipertrofia e fibrosi) ed ipertensione arteriosa dall'altra. (1). I possibili meccanismi fisiopatologici emergevano grazie agli studi su topi resi knockout per il VDR o per la α 1-idrossilasi, che contrariamente ai controlli wild-type, sviluppavano precocemente alterazioni cardiache caratterizzate da fibrosi, deposizione di collagene, ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) ed aumento del rapporto cuore-peso corporeo (2,3).

Sicuramente la vitamina D esercita un effetto down-regolatore diretto sui geni coinvolti nello sviluppo dell'ipertrofia miocardica (4) ma è sulle sue azioni immunomodulatorie che si è concentrata l'attenzione di molti ricercatori (5). Esse sono state inizialmente dimostrate grazie ad

esperimenti condotti su cellule T naive CD4+. Quest'ultime rispondevano agli attivatori del VDR sia aumentando la produzione di linfociti Th2, tramite una stimolazione IL-4 mediata, sia riducendo quella dei linfociti Th1, grazie all'inibizione trascrizionale dell'IFN- γ (6). La vitamina D è quindi in grado di promuovere l'azione di fattori antiinfiammatori come l'IL-10 (Th2 mediata) ed inibirne altri pro-infiammatori, come IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ , MMP (Th1 mediata) (7-9). A conferma di quanto detto, studi condotti su colture di fibroblasti provenienti da topi VDR knockout hanno dimostrato una iperproduzione di fattori profibrotici (NF-kB, IL-6, TNF- α) non riscontrabili nel topo wild-type (10). Inoltre, gli attivatori del VDR sono in grado di downregolare l'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) su colture di cellule muscolari lisce di aorta umana (11) ed analoghi risultati sono stati ottenuti da Artaza et al. in cellule mesenchimali multipotenti (12).

La vitamina D agisce anche attraverso altri meccanismi che nell'insieme la caratterizzano per un vero e proprio fattore antiaterosclerotico. Questo in relazione alla sua dimostrata capacità di inibire la fagocitosi del colesterolo da parte dei macrofagi e quindi la formazione delle cellule schiumose, di downregolare la proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, e di ostacolare la disfunzione endoteliale in virtù di capacità antiossidanti (inibizione della perossidazione lipidica) (13,14-17). Inoltre è ampiamente dimostrata l'azione inibitoria nei confronti dei processi di calcificazione intimale vascolare in seguito alla scoperta di VDR anche a livello delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMCs) e la dimostrazione che l'attivazione di questo recettore è in grado di modificare l'espressione di sostanze intimamente legate al processo di ossificazione della media

arteriosa (collagene tipo I, Core Binding Alpha-I, Bone Matrix Protein-2, Matrix Gla Protein) (18-21) .

Un altro meccanismo con cui la vitamina D può esercitare il suo benefico effetto cardiovascolare è rappresentato dalla sua influenza sul sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS). Nei topi VDR knockout vi è un considerevole aumento dell' mRNA della renina con conseguente attivazione del RAAS che risulta indipendente dai livelli serici di PTH. A sottolineare l'importanza del RAAS nella patogenesi del danno CV è stato dimostrato nello stesso modello animale come la terapia con RAAS inibitori sia in grado di far regredire completamente il danno cardiaco (22,23). In accordo con tali risultati anche esperimenti condotti in vitro su cellule juxtaglomerulari hanno dimostrato la capacità da parte della vitamina D od analoghi di sopprimere direttamente il gene della renina (22,24).

Studi sull'uomo

Nell'uomo la relazione tra vitamina D e malattie cardiovascolari venne inizialmente dimostrata nei soggetti affetti da insufficienza renale terminale (ERSD) nei quali, come noto, l'assenza di adeguati livelli di 1,25(OH)₂ D portava allo sviluppo di iperparatiroidismo secondario (SHPT) (25). Quest'ultimo è stato considerato, in prima istanza, il principale effettore della disfunzione CV, molto frequente in questi pazienti, in virtù di azioni dirette ipertensivizzanti ed iperintropizzanti (26) responsabili della comparsa di aritmie, ipertrofia e fibrosi cardiaca (27). A conferma di questo, la somministrazione di varie forme di vitamina D (1,25(OH)D o analoghi) era in grado di ridurre significativamente l'entità della ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) (28) e di mortalità CV (29,30). Risultati sovrapponibili sono

stati poi ottenuti a seguito di paratiroidectomia totale in molti, ma non nella totalità, degli studi, ragion per cui vennero supposte azioni protettive non PTH-mediate bensì esercitate direttamente della vitamina D (31,32). Nel corso degli anni diversi lavori hanno confermato la significativa riduzione della mortalità cardiovascolare dei pazienti con CKD in dialisi ed in predialisi a seguito della somministrazione di attivatori del VDR, indipendentemente dal prodotto calcio fosforo e/o dai livelli sierici di PTH (33-35).

Nonostante le premesse fisiopatologiche e gli studi in vitro sull'animale e sull'uomo siano indicativi di un effetto positivo della vitamina D sul sistema CV, l'analisi dei trials randomizzati controllati (RCT) attualmente a disposizione non consente di stabilire con precisione questo rapporto. Infatti se da una parte una recente metanalisi condotta su 6853 pazienti con malattia renale cronica (CKD) ha indicato che la vitamina D è associata, pur modestamente, ad una riduzione della mortalità per tutte le cause (36) e una altra metanalisi di numerosi trials clinici randomizzati ha individuato una associazione statisticamente significativa tra supplementazione di vitamina D e riduzione della mortalità (37), altri lavori molto recenti dimostrano che la terapia con paracalcitolo non altera i parametri cardiaci in pazienti con malattia renale cronica (38).

Vitamina D ed Ipertensione Arteriosa

Sebbene i risultati dei diversi studi osservazionali a disposizione risultino conflittuali, si ritiene che esista una correlazione statisticamente significativa tra ipovitaminosi D ed ipertensione arteriosa (39-43).

A tal proposito, i risultati dello studio NHANESIII condotto su 12644 pazienti dal 1988 al 1994 hanno dimostrato come sia la pressione sistolica

(SBP) sia quella diastolica (DBP) risultino significativamente aumentate nell'ambito dei pazienti con più bassi valori sierici di 25(OH)D (quintile con 25(OH)D < 16.2 ng/ml) (42).

E' stato riportato da Forman et. al. su uno studio osservazionale della durata di 4 anni su più di 1800 pazienti di ambo i sessi un significativo aumento del rischio di sviluppo di ipertensione arteriosa nel gruppo con deficit di 25(OH)D (<15 ng/ml) rispetto a quello con valori nella norma (>30 ng/ml) (44).

Attualmente disponiamo di solo due studi prospettici, randomizzati, controllati.

Uno di questi, condotto su 148 donne di età superiore a 70 anni, ha evidenziato come nel gruppo trattato con vitamina D (800 UI/die) e calcio (1200 mg/die) era osservabile una significativa riduzione dei valori di SBP e della frequenza cardiaca (HR) rispetto a quello in solo trattamento con calcio (1200 mg/die) (45).

È stato proposto che l'effetto antipertensivo vitamina D mediato sia imputabile a diversi fattori quali: soppressione del PTH, azioni reno e vasculo protettive, azioni antinfiammatorie ed antidiabetogene.

Vitamina D e Danno Vascolare

L'associazione tra ipovitaminosi D e arteriopatia obliterante periferica è stata riscontrata valutando più di 4800 pazienti analizzati nell'ambito dello studio NHANES condotto dal 2001 al 2004. Da questo studio è emerso come anche piccole differenze dei valori medi di 25(OH)D condizionassero il rischio di manifestazione di patologia, indipendentemente dall'aggiustamento per età, sesso, diabete, livello di colesterolo, pressione arteriosa, utilizzo di statine, CKD. Inoltre la prevalenza di arteriopatia aumentava notevolmente confrontando i pazienti appartenenti al quintile con valori di vitamina D maggiori (>29.2 ng/ml) e minori (<17.8 ng/ml). Di analogo segno sono risultati altri lavori che hanno preso in esame il rapporto tra livelli sierici di 25(OH)D ed insorgenza di ispessimento medio intimale carotideo (IMT) (46).

Molti studi principalmente prospettici ed osservazionali hanno analizzato con risultati conflittuali il ruolo dell'ipovitaminosi D nella comparsa di infarto del miocardio (MI). Giovannucci et al (47), valutando prospetticamente per circa 10 anni una coorte di 1354 pazienti di sesso maschile appartenenti al Professional Follow-Up Study (HPFS), ha dimostrato come nell'ambito dei 454 pazienti colpiti da MI (fatale e non) i valori sierici di 25(OH)D risultassero statisticamente più bassi rispetto ai 900 controlli nonostante l'aggiustamento per i noti fattori di rischio CV. L'autore concluse che il deficit di vitamina D fosse da considerarsi un fattore di rischio indipendente di comparsa di MI e che valori sierici di 25(OH)D maggiori di 30 ng/ml dimezzassero questo rischio.

Altri studi hanno analizzato l'associazione tra ipovitaminosi D e comparsa di malattia vascolare. Tra questi quello condotto su 1739 pazienti, non affetti da patologie CV o da CKD, appartenenti al Framingham Offspring e valutati prospetticamente per 5.4 anni. L'analisi multivariata provò una correlazione statisticamente significativa tra valori di 25(OH)D inferiore a 15 ng/ml ed un aumentato rischio per comparsa di malattie CV, associazione presente anche dopo aggiustamento per i noti fattori di rischio CV (48). Risultati analoghi vennero ottenuti dallo studio LURIC (Ludwingshafen Risk and Cardiovascular Health) (49) che ha analizzato la relazione tra deficit di vitamina D e mortalità cardiovascolare o da tutte le cause in una coorte di 3258 pazienti sottoposti ad angiografia coronarica. Nel corso dei 7.7 anni di follow-up i pazienti con più bassi valori sierici di 25(OH)D avevano un incremento statisticamente significativo di mortalità anche dopo l'aggiustamento per i noti fattori di rischio CV. Tale associazione inversa si manteneva anche nei pazienti con stenosi coronarica minore del 20%.

Recentemente l'Intermountain Heart Collaborative Study che includeva più di 40000 individui sani ha dimostrato una correlazione tra bassi livelli di 25(OH)D ed aumentato rischio CV in particolare per scompenso cardiaco ed eventi cerebrovascolari (50).

L'associazione tra deficit di vitamina D ed incidenza di CVD è particolarmente significativa nell'ambito dei soggetti con CVD conclamato o con alto rischio di sviluppo di CVD ed inoltre alcuni indicatori suggeriscono

che tale relazione non segua un andamento lineare bensì si manifesti per valori di 25(OH)D inferiori a 15 ng/ml (51).

Ad oggi mancano ancora RCT disegnati per valutare direttamente l'azione della supplementazione di vitamina D sugli outcome CV. La maggior parte dei dati a disposizione sono stati infatti ricavati analizzando studi disegnati per valutare gli effetti muscoloscheletrici mediati dalla vitamina D e per tale ragione molti di questi hanno valutato l'impatto combinato di vitamina D e calcio. Tale approccio risulta limitativo in considerazione del possibile ruolo negativo del solo calcio per quanto concerne l'outcome CV (52,53).

Nel Women's Health Initiative (WHI) comprendente una coorte prospettica di 36282 donne in postmenopausa, 18176 sono state randomizzate a ricevere 500 mg di calcio addizionati a 200 UI di vitamina D3 due volte al giorno e confrontate con 18106 controlli sotto placebo. Dopo un follow-up di 7 anni non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto concerne lo sviluppo di MI, angina, by-pass aorto-coronarico o procedure di rivascolarizzazione percutanee e morte CV. Tale studio presentava comunque una serie di limitazioni come ad esempio la mancata misurazione dei livelli basali di 25(OH)D e la bassa posologia somministrata (solo 400 UI/die) (54).

In letteratura sono al momento disponibili solo due studi che hanno valutato il ruolo esclusivo della vitamina D sulla comparsa di CVD per altro come outcome secondario. Entrambi hanno mostrato nel gruppo trattato con vitamina D (1000 UI/die) un trend alla riduzione del rischio CV che comunque non raggiungeva la significatività statistica (52).

Nel complesso i risultati degli studi attualmente a disposizione sembrerebbero supportare l'ipotesi associativa tra ipovitaminosi D e rischio CV, sono comunque necessari ulteriori studi di intervento prospettici randomizzati per stabilire con certezza l'utilità della supplementazione di questa vitamina al fine di prevenire o curare malattie CV.

BACKGROUND

Uno dei possibili meccanismi che può essere coinvolto nella relazione tra livelli di vitamina D e la morbilità e mortalità cardiovascolare è certamente il RAAS. Infatti studi negli animali (25,55) ed *in vitro* (25) dimostrano chiaramente che la attivazione dei recettori della vitamina D inibisce i livelli di RNAm intra-renale e l' espressione proteica dei componenti chiave del RAAS, come l'angiotensinogeno e la renina, i recettori della renina ed i recettori di tipo 1 dell'angiotensina II, indipendentemente dal metabolismo del calcio.

Purtroppo in letteratura non sono disponibili dati sull'uomo sugli effetti del RAS da parte della vitamina D in condizioni normali e patologiche. Ad oggi, solo due lavori hanno affrontato questo problema sia a medio (56) che a lungo termine (57) ed entrambi non hanno osservato alcuna soppressione del RAAS dopo terapia con vitamina D. Il mancato effetto riportato può trovare numerose giustificazioni, tra cui il tipo di pazienti studiato ed il protocollo sperimentale utilizzato, ma potrebbe essere anche dovuto al fatto che lo studio che abitualmente viene eseguito sul RAAS si basa sulla misura dei parametri circolanti, come la PRA, renina, ALD ed angiotensina II. Sappiamo tuttavia che esistono numerosi RAAS tissutali e, tra questi, quello renale che sembra sottostare a meccanismi regolatori diversi e talvolta divergenti rispetto al RAAS sistemico. Pertanto un effetto soppressivo sul RAAS da parte della vitamina D potrebbe anche esercitarsi, ma solo a livello intra-renale, senza coinvolgere il circolo sistemico e quindi non essere documentabile. Recentemente però è stato approntato un nuovo metodo enzimatico per la determinazione dell'angiotensinogeno

plasmatico ed urinario (58) che, da studi effettuati su pazienti ipertesi (59) e su pazienti con nefropatia cronica (60), sembra essere uno specifico marker dello stato intrarenale del RAAS.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Con questa indagine ci siamo proposti di:

- ❖ valutare le conseguenze della somministrazione a breve e medio termine di vari attivatori dei recettori della vitamina D, a diversi dosaggi, nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale,
- ❖ verificare questi effetti in relazione ad un diverso grado di attivazione del RAAS endogeno,
- ❖ indagare le eventuali differenze di comportamento tra RAAS sistemico e locale intra-renale.

PAZIENTI E METODI

Pazienti

L'indagine in oggetto è stata condotta presso il Centro dell' Ipertensione Arteriosa (Dipartimento di Medicina Interna) dell'Università di Pisa. Al fine di minimizzare la possibilità che l'esposizione solare modificasse i livelli sierici di vitamina D, i pazienti sono stati arruolati tra l'Ottobre ed il Dicembre 2010 e lo studio si è definitivamente concluso entro il Marzo 2011.

La popolazione studiata è stata divisa in tre gruppi che sono stati sottoposti a tre diversi protocolli sperimentali.

Gruppo A: sono stati consecutivamente selezionati 10 pazienti ipertesi essenziali (IE) e 10 controlli normotesi (C). I criteri di esclusione risultavano i seguenti:

- insufficienza renale cronica allo stadio III-V NKF (National Kidney Foundation) oggettivata tramite stima della frazione di filtrazione glomerulare (MDRD <60 ml/min per 1.73 m²),
- ipercalcemia,
- insufficienza epatica,
- malattie granulomatose croniche,
- obesità (BMI > 30 kg/m²), diabete mellito
- assunzione di farmaci antiipertensivi o farmaci interferenti sul metabolismo del calcio-fosforo. Contrariamente ai C, i pazienti sono stati sottoposti ad un regime dietetico a basso contenuto sodico (circa 1.5 gr di sodio die) per l'intera durata dello studio.

Gruppo B: sono stati arruolati 18 pazienti consecutivi con IE (8 donne, 10 uomini, età 47.3 ± 12.5 aa, media \pm DS, BMI 25.5 ± 1.02 Kg/m²). I criteri di esclusione risultavano sovrapponibili a quelli utilizzati per il Gruppo A, fatta eccezione per la possibilità di utilizzare farmaci antagonisti del recettore per l'angiotensina II come unica terapia antiipertensiva. Inoltre i pazienti di questo gruppo, contrariamente ai precedenti, non avevano restrizioni nel contenuto dietetico di sodico da assumere giornalmente.

Gruppo C: tra un gruppo di 26 ipertesi essenziali abbiamo arruolato consecutivamente 15 pazienti (8 maschi e 7 femmine, età media 43.6 aa, range 22-71 aa; BMI 26.4 ± 2.6 Kg/m², media \pm ES) con ipovitaminosi D (25(OH)D < 30 ng/ml) dopo avere escluso quelli con:

- valori di stima della filtrazione glomerulare < 60 mL/min per 1.73 m²,
- ipercalcemia,
- insufficienza epatica,
- obesità (BMI > 30 Kg/m²) e diabete mellito.

➤ rappresentavano criteri di esclusione anche la assunzione di farmaci interferenti sul RAS (ace-inibitori ed antagonisti dei recettori della angiotensina II) e sul SNS (beta-bloccanti o beta-agonisti, clonidina), nonché diuretici ed altri farmaci agenti sul metabolismo calcio-fosforo. Ai pazienti che assumevano questi farmaci (n=13), se le condizioni cliniche lo consentivano, venivano somministrati in alternativa i calcio-antagonisti e/o gli α 1-bloccanti, almeno 15 giorni prima dell'inizio dello studio. Ai pazienti infine veniva richiesto di assumere una dieta con costante contenuto di sodio (~ 3 g/ di sodio al giorno).

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale e ciascun paziente ha fornito il suo assenso scritto dopo avere letto in dettaglio il protocollo sperimentale.

Protocollo

Gruppo A: in considerazione della breve durata dello studio (7 giorni) abbiamo ritenuto opportuno utilizzare un attivatore diretto del recettore della vitamina D, come il calcitriolo (1,25(OH)₂D). A partire dal tempo 0 abbiamo somministrato una dose giornaliera di 0.5 mcg (0.25 mcg due volte die) di calcitriolo (Rocaltrol, Roche, Milano, Italia) per sette giorni consecutivi.

Gruppo B: dal momento che questo gruppo veniva sottoposto ad una indagine a lungo termine (2 mesi), abbiamo preferito utilizzare il colecalciferolo in bolo per mantenere stabilmente i livelli circolanti di 25(OH)D superiori a 30 ng/ml, come consigliato dalle linee guida internazionali (61). Per tale ragione al tempo 0 è stata somministrata una singola dose orale di 300.000 UI di colecalciferolo (Dibase, Abiogen Pharma, Pisa, Italia). Al fine di minimizzare la possibilità che i bassi livelli di renina, frequentemente riscontrati nella popolazione ipertesa essenziale, potessero oscurare l'effetto soppressivo sul RAS esercitato dalla vitamina D, abbiamo somministrato, a partire da 15 giorni antecedenti l'inizio dello studio, farmaci antagonisti recettoriali dell'angiotensina II che, come noto, determinano un aumento dei livelli sierici di renina ed angiotensina II.

Gruppo C: tra i vari attivatori dei recettori della vitamina D abbiamo scelto anche in questo caso il colecalciferolo poichè nei pazienti con normale funzione renale il farmaco si trasforma rapidamente e facilmente nella sua forma attiva, la 25(OH)vitamina D. Al tempo 0, veniva

somministrata una dose orale di 25000 UI una volta alla settimana (3571 UI/die) per 8 settimane. Questa posologia è stata scelta allo scopo di mantenere livelli di 25(OH)vitamina D consistentemente sopra i 30 ng/ml.

Misurazioni

Gruppo A: al tempo 0 ed al termine dello studio (1 settimana) sono stati valutati i seguenti parametri clinico/laboratoristici:

- ✓ pressione arteriosa, secondo le recenti linee guida internazionali ,
- ✓ livelli plasmatici di creatinina, calcio, fosforo, magnesio, 25(OH)D, 1,25(OH)2D, PTH, PRA, renina , aldosterone , angiotensina II,
- ✓ creatinina, sodio ed albumina nelle urine delle 24 ore.

Gruppo B: i parametri sotto riportati sono stati valutati prima dell'assunzione dei farmaci antagonisti del recettore dell'angiotensina II (tempo – 15), al tempo 0 (assunzione del colecalciferolo) e dopo 4 ed 8 settimane:

- ✓ pressione arteriosa, secondo le linee guida internazionali,
- ✓ livelli plasmatici di PRA, renina, aldosterone, angiotensina II.
- ✓ livelli sierici di creatinina, del calcio, del fosforo e del magnesio (solo al tempo 0 ed alla fine dello studio), mentre quelli della 25(OH)D, 1,25(OH)2D e del PTH al tempo 0, dopo 4 ed 8 settimane.

Gruppo C: sono stati valutati i seguenti parametri ematochimici basalmente e dopo 8 settimane di trattamento:

- ✓ pressione arteriosa clinica secondo le linee guida internazionali,
- ✓ livelli plasmatici di creatinina, calcio, fosforo, magnesio, sodio, potassio 25(OH) D, 1,25(OH)2D, PTH,

✓ livelli plasmatici di angiotensinogeno, aldosterone, PRA, renina attiva e angiotensina II,

✓ livelli urinari nelle 24 ore di creatinina, albumina, sodio, ed angiotensinogeno nello spot urinario del mattino.

Laboratorio

La concentrazione sierica di creatinina, calcio, fosforo, potassio, magnesio, sodio è stata determinata attraverso metodiche standard. La concentrazione urinaria della creatinina e dell'albumina è stata valutata con DCA 2000 Analyzer (Bayer). La stima della filtrazione glomerulare è stata ottenuta grazie alla formula MDRD (Modification of Diet in Renal Disease). Uno specifico metodo radioimmunologico è stato utilizzato per la determinazione dei livelli ematici di 25(OH)D e 1,25(OH)2D (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA; intra-assay rispettivamente di 10.5% e 11.3%, inter-assay rispettivamente di 9.6% e 14.9%), PRA (DiaSORin, Saluggia, Italia; inter-assay 7.6%, inter-assay 9.1%, v.n. 0.2-5.7 ng/ml/h), Aldosterone (DiaSORin, Saluggia, Italia; intra-assay 9.7%, inter-assay 11.5%, v.n. 3.5-30.0 ng/dl) e renina attiva (CisBIO, Bedford, MA, USA; intra-assay 1.8%, inter-assay 4.0%, v.n. 5.1-59.4 ng/dl). I livelli plasmatici di PTH sono stati ottenuti grazie ad un dosaggio radioimmunometrico per la determinazione quantitativa del peptide umano attivo PTH 1-84 (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA; intra-assay 2.5%, inter-assay 4.4%, v.n. 13-54pg/ml), mentre i livelli plasmatici di angiotensina II tramite un metodo ELISA (Pantec s.r.l, Torino, Italy; intra-assay 3.1%, interassay 4.3%, v.n 5.5-21.3 pg/ml). Infine la concentrazione plasmatica ed urinaria di AGT è stata determinata grazie ad un recente metodo ELISA (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.,

intra-assay 5.0%, inter-assay 5.3%, v.n. 28-71 μ g/ml nel plasma, 7.1-35 ng/ml nelle urine). Poiché la escrezione urinaria giornaliera di angiotensinogeno è altamente correlata con il rapporto della concentrazione urinaria dell'angiotensinogeno con quella della creatinina (UAGT/UCr) nell'uomo (62), abbiamo raccolto un campione urinario (spot) per analizzare il UAGT/UCr.

Analisi Statistica

Per lo studio statistico abbiamo utilizzato il *t* test di Student per dati appaiati e non appaiati e, quando necessario, l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) mentre il test di Wilcoxon è stato usato per le variabili non parametriche. La correlazione lineare è stata invece adottata per verificare la relazione tra le variabili individuali. I risultati sono stati espressi come media \pm ES e come media \pm DS. E' stato considerato infine statisticamente significativo un $P < 0.05$.

RISULTATI

Gruppo A

Come evidenziato nella Tabella 1, l'età, il sesso ed il BMI dei pazienti selezionati risultavano sovrapponibili.

In condizioni basali, la concentrazione plasmatica di calcio, fosforo, magnesio, creatinina, clearance della creatinina, sodiuria delle 24 ore, microalbuminuria e PTH non presentavano differenze significative tra i due gruppi. I valori serici di 25(OH)D sono risultati in entrambi i gruppi inferiori rispetto ai valori di normalità stabiliti dalle linee guida internazionali (61), anche se valori significativamente più bassi sono stati registrati nel gruppo dei pazienti IE. Come previsto, i livelli pressori sono risultati maggiori nei pazienti IE rispetto ai C (Tabella 2).

La somministrazione di calcitriolo non ha determinato variazioni dei parametri umorali in entrambi i gruppi e la riduzione dei valori pressori sisto/diastolici osservata nel gruppo dei pazienti IE è verosimilmente attribuibile all'ospedalizzazione ed al conseguente consumo controllato di NaCl, come d'altronde confermato dalla riduzione dell'escrezione urinaria di sodio (Tabella 2).

La Figura 1 mostra come in condizioni basali, i valori di PRA e di renina risultavano più bassi nei pazienti IE rispetto ai C, mentre l'aldosterone e l'angiotensina II erano simili. A seguito della somministrazione di calcitriolo non è stato osservato alcun effetto soppressivo sui costituenti del RAS analizzati. Al contrario è stato registrato un incremento, sebbene non significativo, dei valori di PRA, renina ed aldosterone nel gruppo dei

pazienti IE, aumento probabilmente secondario alla riduzione dell'intake sodico dietetico .

Lo studio delle correlazioni non ha mostrato, sia in condizioni basali che dopo assunzione del calcitriolo, alcuna associazione significativa tra i valori plasmatici di 25(OH)D ed 1,25(OH)₂D da una parte e gli altri parametri analizzati, come la pressione arteriosa, il PTH ed i vari costituenti del RAAS dall'altra.

Gruppo B

I valori di calcio, fosforo, magnesio, creatinina e PTH non hanno subito variazioni significative nel corso dello studio, mentre la somministrazione di colecalciferolo ha prodotto l'atteso aumento dei valori serici di 25(OH)D e di 1,25(OH)₂D. A seguito della somministrazione della terapia con antagonisti recettoriali dell'angiotensina II, abbiamo registrato, come previsto, una riduzione della pressione sistole/diastolica che non è stata ulteriormente modificata dall'introduzione in terapia del colecalciferolo (Tabella 3).

I valori plasmatici di PRA, renina ed angiotensina II non hanno subito variazioni in senso soppressivo durante tutta la durata dello studio. Al contrario, è stato osservato un debole incremento di questi ormoni associato ad una lieve riduzione dell'aldosterone, un pattern probabilmente imputabile alla terapia con antagonisti recettoriali dell'angiotensina II (Figura 2).

Anche in questo gruppo non abbiamo potuto documentare né in condizioni basali né dopo terapia con calciferolo una correlazione statisticamente significativa tra valori plasmatici di 25(OH)D ed 1,25(OH)₂D

da una parte e pressione arteriosa ed i principali componenti del RAS testati dall'altra.

Gruppo C

Otto pazienti presentavano livelli di 25(OH)vitamina D < 20 ng/ml (deficienza) e 7 pazienti < 30 ng/ml (insufficienza). Dopo somministrazione del colecalciferolo la 25(OH)vitamina D plasmatica aumentava significativamente ($P < 0.001$) tanto che tutti i pazienti normalizzarono questo parametro. I livelli basali di PTH erano nel range della normalità ed i valori pressori risultarono ben controllati dalla terapia assunta all'inizio dello studio. Questi parametri sono rimasti immutati durante l'indagine (Tabella 4), così come si verificava per i livelli plasmatici di calcio, fosforo, magnesio, sodio, potassio e creatinina (Tabella 5).

Nonostante la costante assunzione di sale documentata dalla sodiuria delle 24 ore (127.6 ± 12.7 mEq/24h vs 125.8 ± 16.1 mEq/24h), la misura dei componenti del RAAS circolante alla fine dello studio (Fig. 3) metteva in evidenza una riduzione della renina attiva (13.6 ± 3.4 pg/ml vs 24.0 ± 5.9 pg/ml, $P < 0.05$) e dell' ALD (21.9 ± 3.0 ng/dl vs 31.3 ± 5.5 ng/dl, $P < 0.05$) ed un decremento, sebbene non significativo, dei livelli della PRA (1.3 ± 0.3 ng/ml/h vs 1.9 ± 0.4 ng/ml/h) e dell' angiotensina II (9.4 ± 1.5 pg/ml vs 13.0 ± 2.5 pg/ml). La somministrazione del colecalciferolo non modificava l'angiotensinogeno plasmatico (42.1 ± 2.1 µg/ml vs 39.0 ± 2.5 µg/ml) ed urinario (16.1 ± 2.6 µg/g di creatinina urinaria vs 14.1 ± 2.3 µg/g di creatinina urinaria) (Fig. 4).

Non è stata documentata alcuna correlazione tra i livelli plasmatici di 25(OH)D o di 1,25(OH)2D e la pressione arteriosa, i vari componenti del RAAS ed i valori del PTH prima e dopo la somministrazione del farmaco.

DISCUSSIONE

In letteratura esistono numerosi studi osservazionali, sia nei soggetti normali che nei pazienti ipertesi, che evidenziano una associazione inversa tra i livelli di PRA e quelli di vitamina D (63-67). Anche recentemente è stato confermato che nei soggetti ipertesi più bassi sono i valori plasmatici di vitamina D e più elevati sono i livelli circolanti di angiotensina II (68). Ovviamente questi studi osservazionali, pur utilissimi perché coinvolgenti un gran numero di soggetti, non sono in grado di stabilire un rapporto di causa-effetto e non danno informazioni fisiopatologiche. Queste sono meglio fornite dagli studi clinici di intervento che verificano se la supplementazione con vitamina D è in grado di sopprimere, in qualche modo, il RAAS nell'uomo. Purtroppo non esistono dati in letteratura a riguardo.

Nel nostro studio su pazienti ipertesi e soggetti normali arruolati consecutivamente, la percentuale della popolazione con ipovitaminosi D risulta molto elevata e, in accordo con i dati della letteratura (69), i livelli di vitamina D sono più bassi negli ipertesi che nei soggetti normali. Inoltre abbiamo osservato che negli ipertesi e normotesi con ipovitaminosi D, la somministrazione a breve termine di calcitriolo non ha effetti sui vari componenti del RAAS sistemico. Le stesse osservazioni sono state ottenute negli ipertesi dopo assunzione a lungo termine di colecalciferolo, somministrato a dosi capaci di normalizzare i livelli di vitamina D.

Pertanto con i due diversi protocolli sperimentali utilizzati abbiamo rilevato che la attivazione dei recettori della vitamina D non è in grado di influenzare la attività del RAAS circolante. Ovviamente esistono limitazioni

dello studio che meritano di essere discusse, soprattutto per quanto riguarda il relativamente piccolo numero dei soggetti studiati. Tuttavia la nostra indagine, da quanto emerge dalla letteratura, sembra essere inedita in quanto è la prima ad esplorare, con un end-point primario prespecificato, la attività del RAAS dopo supplementazione di vitamina D nei soggetti ipertesi. Studi simili (56,57) sono stati effettuati ma in popolazioni diverse, come nei pazienti diabetici, con e senza nefropatia, ed in entrambi i casi gli endpoint primari e secondari erano diversi rispetto alla misurazione dei componenti del RAAS. Nel nostro studio ci siamo concentrati sul tipo e la dose del farmaco da utilizzare, nonché sulla durata del follow-up e sul tempo di campionamento. Poiché nel primo protocollo la indagine aveva una durata di soli 7 giorni, abbiamo preferito utilizzare la forma biologicamente attiva della vitamina D, come il calcitriolo, alle comuni dosi terapeutiche. Nel secondo protocollo invece, abbiamo scelto il colecalciferolo, somministrato in bolo allo scopo di ottimizzare la compliance dei pazienti ed alle dosi capaci di mantenere consistentemente i livelli di vitamina D al di sopra i 30 ng/ml, come consigliato dalle linee guida internazionali (70) e come, in effetti, verificatosi nei nostri pazienti. Un punto critico nella pianificazione dello studio è stato quello di individuare le migliori condizioni per studiare il RAAS dei nostri pazienti. E' noto infatti che gli ipertesi a "bassa renina" sono estremamente frequenti nella popolazione ipertesa ed è anche evidente che un introito non controllato di sale, come comunemente si verifica nei pazienti a domicilio, può influenzare negativamente la secrezione di renina. Proprio per non campionare una popolazione con una possibile soppressione basale di RAAS che avrebbe potuto mascherare l'eventuale effetto inibitorio della

vitamina D, il nostro studio è stato disegnato per attivare il RAAS endogeno. Nel primo protocollo sperimentale (calcitriolo a breve termine), l'obiettivo è stato raggiunto con una dieta controllata a basso contenuto di sodio. Nel secondo invece (colecalfiferolo a lungo termine), tutti i pazienti sono stati volutamente sottoposti ad una terapia con antagonisti dei recettori dell'angiotensina II, a partire da 15 giorni prima dell'inizio dello studio e fino al termine dello stesso, proprio con l'obiettivo di innalzare i livelli endogeni della renina e della angiotensina II. Tuttavia in entrambi gli studi non è stato osservato alcun effetto sul RAAS della vitamina D. I nostri dati confermano quelli rilevati da Sudgen e coll. (56) e da de Zeeuw e coll. (57) i cui risultati, sebbene riferiti a pazienti diabetici, mostravano che nonostante un miglioramento della funzione endoteliale (nel primo) e la riduzione della albuminuria (nel secondo), non era osservabile alcuna influenza sul RAAS dopo supplementazione di vitamina D. Tuttavia negli studi sopracitati ed anche nel nostro, i pazienti erano sotto trattamento con inibitori del RAAS. Pertanto abbiamo pensato che la vitamina D potesse essere stata incapace di sopprimere l'incremento compensatorio della renina che si verifica abitualmente dopo l'uso degli inibitori del RAAS.

Per questo motivo abbiamo programmato un terzo disegno sperimentale nel quale un altro gruppo di ipertesi con ipovitaminosi D era senza terapia o comunque senza farmaci interferenti sul RAAS (ace-inibitori e AT II antagonisti) e sul SNS (betabloccanti, beta-agonisti o clonidina), senza diuretici ed altri farmaci in grado di influenzare il metabolismo calcio-fosforo. Inoltre l' intake sodico sodio di questi pazienti rimaneva costante durante lo studio, come è stato dimostrato dalla escrezione urinaria di sodio. In ultimo, la dose utilizzata era anche in

questo caso capace di mantenere i livelli di 25(OH)D sopra i 30 ng/ml in tutti i pazienti. Ebbene, in queste condizioni sperimentali, tutti i componenti del RAAS circolante si sono ridotti dopo somministrazione del colecalciferolo ed il fenomeno ha raggiunto la significatività statistica per la renina attiva e l'aldosterone.

Questi dati pertanto confermano l'azione inibitoria della vitamina D sul RAAS osservata in numerosi studi su animali (25,55) ed in vitro (25) e sono in linea con gli studi sull'uomo che mettono in evidenza una relazione inversa tra PRA e angiotensina II e le concentrazioni plasmatiche di vitamina D (63-68).

Un secondo obiettivo di questo ultimo protocollo era la valutazione del RAAS intrarenale. E' stato ipotizzato infatti che esso può contribuire allo sviluppo o al peggioramento della funzione renale in alcune condizioni patologiche (62), indipendentemente dal RAAS circolante. Infatti i meccanismi regolatori di questi due RAS sembrano essere diversi e qualche volta anche divergenti (71). Infatti nei topi knockout per i recettori della vitamina D il RAAS intrarenale risulta iperstimolato (25) mentre nell'uomo con una identica mutazione genetica che porta a resistenza degli organi bersaglio alla vitamina D il RAAS circolante è del tutto normale (72). Di questo RAAS intrarenale, l'angiotensinogeno locale appare essere il componente chiave del sistema e dati ottenuti negli ipertesi (59) ed in pazienti con malattia renale cronica (60) hanno permesso di ipotizzare che l'angiotensinogeno urinario può rappresentare uno specifico marker funzionale del RAAS intrarenale. Sulla base di queste conoscenze abbiamo voluto valutare il comportamento dell'angiotensinogeno plasmatico e renale negli ipertesi

in terapia con colecalciferolo, grazie ad un nuovo metodo di dosaggio enzimatico sviluppato per la determinazione dell'angiotensinogeno. Nel nostro studio non abbiamo osservato nessuna variazione dell'angiotensinogeno dopo attivazione dei recettori della vitamina D. Di conseguenza, sulla base dei presenti dati l'angiotensinogeno urinario non sembra essere un marker specifico del RAAS intrarenale ma semplicemente derivare, attraverso il processo di filtrazione glomerulare, dal fegato che è la nota sorgente naturale dell'ormone. Anche recenti osservazioni sembrano confermare quanto sopra detto (73). Anche in questo protocollo ci sono limiti che meritano di essere menzionati. Innanzitutto problemi metodologici che potrebbero in qualche modo spiegare la mancata variazione dell'angiotensinogeno urinario dopo somministrazione di vitamina D. Inoltre il piccolo numero dei soggetti studiati, anche se i nostri pazienti erano ben selezionati e liberi da farmaci interferenti sul RAAS. Infine la entità della ipovitaminosi dei pazienti e la dose del farmaco somministrata che potrebbero essere stati incapaci di mettere in evidenza i reali effetti del colecalciferolo sul RAAS circolante e intra-renale.

In conclusione, in nostri dati indicano che nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale, a dieta controllata e costante di sodio e senza farmaci interferenti sul RAAS, la stimolazione cronica dei recettori della vitamina D riduce l'attività del RAAS sistemico, senza influenzare l'angiotensinogeno urinario.

BIBLIOGRAFIA

1. **Weishaar RE, Kim SN, Saunders DE, Simpson RU.** Involvement of vitamin D3 with cardiovascular function. III. Effects on physical and morphological properties. *Am J Physiol* 1990;258:E134–42.
2. **Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU.** Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:416–19.
3. **Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA.** Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:521–4.
4. **Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, et al.** Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Molecular Nutrition and Food Research* 2010; 54:1103-13.
5. **Zittermann A, Koerfer R.** Protective and toxic effects of vitamin D on vascular calcification: clinical implications. *Mol Aspects Med* 2008;29:423–32.
6. **Boonstra A, Barrat FJ, Crain C et al.** Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4+ T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167:4974-80.
7. **Canning MO, Grotenhuis K, Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA.** 1- α ,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol* 2001;145:351–7.
8. **Müller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K.** 1,25 Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the posttranscriptional level. *Cytokine* 1992;4:506–12.
9. **Andress DL.** Vitamin D in chronic kidney disease: a systematic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 2006; 69:33-43.
10. **Sun J, Kong J, Duan Y, et al.** Increased NK-kB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Metab*;291: 315-22.
11. **Al-Badar W, Martin KJ.** Vitamin D and chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1555-60..
12. **Artaza JN, Norris KC.** Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol* 2009; 200:207-221.

13. **Brewer LC, Michos ED, Reis JP.** Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Current Drug Targets* 2011; 12:54–60.
14. **Oh J, Weng S, Felton SK, et al.** 1,25(OH)₂ vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009;120: 687–698.
15. **Chen S, Law CS, Grigsby CL, et al.** A role for the cell cycle phosphatase Cdc25a in vitamin D-dependent inhibition of adult rat vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010; 122: 326–332.
16. **Martinesi M, Bruni S, Stio M et al.** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule expression in endothelial cells. *Cell Biology International* 2006;30:365–375.
17. **Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, et al.** Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *American Journal of Nephrology* 2009; 29: 465–472.
18. **Bellows CG, Reimers SM, Heersche JNM.** Expression of mRNAs for type-1 collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxy vitamin D₃. *Cell Tissue Res.* 1999;297:249-59.
19. **Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, et al.** 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res.* 2002;274:323-33.
20. **Fraser JD, Otawara Y, Price PA.** 1,25-dihydroxy D₃ stimulates the synthesis of gamma-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins in clonal osteoblastic cell lines. *J Biol Chem.* 1988;263:911-6.
21. **Virdi AS, Cook LJ, Oreffo RO, Triffit JT.** Modulation of bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene expression in osteoblastic cell lines. *Cell Mol Biol.* 1998;44:1237-46.
22. **Xiang W, Kong J, Chen S, et al.** Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2005;288: 125–132.

23. **Zhou C, Lu F, Cao K, et al.** Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney International* 2008;74:170–179.
24. **Li YC, Kong J, Wei M, et al.** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110:229–38.
25. **Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R.** Vitamin D insufficiency in congestive heart failure: why and what to do about it? *Heart Fail Rev* 2006;11:25–33.
26. **Rostand SG, Drueke TB.** Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;56:383–92.
27. **Fitzpatrick LA, Bilezikian JP, Silverberg SJ.** Parathyroid hormone and the cardiovascular system. *Current Osteoporosis Report* 2008;6:77–83.
28. **Park CW, Oh YS, Shin YS, et al.** Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 1999;33:73–81.
29. **Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, et al.** Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1- α -hydroxy vitamin D₃ users in a haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:179–84.
30. **Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, et al.** Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1115–25.
31. **Drüeke T, Fleury J, Toure Y, et al.** Effect of parathyroidectomy on left-ventricular function in haemodialysis patients. *Lancet* 1980;1:112–14.
32. **Gafter U, Battler A, Eldar M, et al.** Effect of hyperparathyroidism on cardiac function in patients with end-stage renal disease. *Nephron* 1985;41:30–3.
33. **Teng M, Wolf M, Lowrie E et al.** Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med.* 2003;349:446-56.
34. **Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, et al.** Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney Int.* 2006;70:1858-65.
35. **Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, et al.** Association of activated vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease. *Arch Intern Med* 2008;168:397-403.

36. **Pilz S, Iodice S, Zittermann A, et al.** Vitamin D status and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of prospective studies. *American Journal of Kidney Diseases* 2011, doi:10.1053/j.ajkd.2011.03.020.
37. **Autier P, Gandini S.** Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine* 2007; 167: 1730–1737.
38. **Thadhani R, Appelbaum E, Pritchett Y, et al.** Vitamin D therapy and cardiac structure and function in Patients With Chronic Kidney Disease 2012; 307(7):674-84.
39. **Duprez D, Buyzere M, Backer T, Clement D.** Relationship between vitamin D3 and the peripheral circulation in moderate arterial primary hypertension. *Blood Press* 1994;3:389–93.
40. **Kristal-Boneh E, Froom P, Harari G, Ribak J.** Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 1997;30:1289–94.
41. **Scragg R, Holdaway I, Singh V, et al.** Serum 25-hydroxycholecalciferol concentration in newly detected hypertension. *Am J Hypertens* 1995;8:429–32.
42. **Scragg R, Sowers MF, Bell C.** Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the third national health and nutrition examination survey. *Am J Hypertens* 2007;20:713–19.
43. **Snijder MB, Lips P, Seidell JC, et al.** Vitamin D status and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure: a population-based study in older men and women. *J Intern Med* 2007;261:558–65.
44. **Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, et al.** Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49:1063–9.
45. **Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, et al.** Effects of a short-term vitamin D3 and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1633–7.
46. **Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al.** Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intimamedia thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol* 2006;65:593–7.
47. **Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB.** 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174–80.

48. **Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al.** Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503–11.
49. **Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al.** Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340–9.
50. **Anderson JL, May HT, Horne BD, et al.** Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *American Journal of Cardiology* 2010, 106, 963–968.
51. **Grandi NC, Breitling LP, Brenner H.** Vitamin D and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Preventive Medicine* 2010, 51, 228–233.
52. **Wang L, Manson JE, Song Y, et al.** Systematic review: vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events 2010. *Annals of Internal Medicine*, 152, 315–323.
53. **Bolland MJ, Grey A, Avenell A, et al.** Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women’s Health Initiative limited access dataset and meta-analysis. *British Medical Journal* 2011, 342, d2040.
54. **Hsia J, Heiss G, Ren H, et al.** Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007;115:846–54.
55. **Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, et al.** Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008, 74: 1394-402.
56. **Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD.** Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med* 2008, 25: 320-5.
57. **De Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al.** Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010, 376: 1543-51.
58. **Katsurada A, Hagiwara Y, Miyashita K, et al.** Novel sandwich, ELISA for human angiotensinogen. *Am J Renal Physiol* 2007; 293:956-60.
59. **Kobori H, Urushihara M, Xu JH, et al.** Urinary angiotensinogen is correlated with blood pressure in men. *J Hypertens* 2010; 28(7):1422-28.

- 60. Kobori H, Ohashi N, Katsurada A, et al.** Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity of chronic kidney diseases. *J Am Soc Hypertens* 2008;2(5):349-5417.
- 61. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al.** 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2007, 25: 1751-62.
- 62. Urushihara M, Kondo S, Kagami S, et al.** Urinary angiotensinogen accurately reflects intrarenal renin angiotensin system activity. *Am J Nephrol* 2010; 31:318-25.
- 63. Resnick LM, Muller FB, Laragh JH.** Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med* 1986, 105: 649-54.
- 64. Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M.** Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens* 1990, 3: 903-5.
- 65. Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, et al.** Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta* 2010, 411: 1354-60.
- 66. Vaidya A, Forman JP, Hopkins PN, et al.** 25-Hydroxyvitamin D is associated with plasma renin activity and the pressor response to dietary sodium intake in Caucasians. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011, 12: 311-9.
- 67. Vaidya A, Sun B, Forman JP, et al.** The Fok1 vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in Caucasians. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011, 74: 783-90.
- 68. Forman JP, Williams JS, Fisher ND.** Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension* 2010, 55: 1283-8.
- 69. Holick MF.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007, 357: 266-81.
- 70. 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.

- 71. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, et al.** The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59:251-87.
- 72. Tiosano D, Schwartz Y, Braver J, et al.** The renin-angiotensin system, blood pressure, and heart structure in patients with hereditary vitamin D-resistance rickets (HVDRR). *J Bone and Mineral Res* 2011;26:2252-60
- 73. Heuvel M, Batenburg WW, Jainandunsing S.** Urinary renin but not angiotensinogen or aldosterone, reflects the renal renin angiotensin aldosterone system activity and the efficacy of renin angiotensin aldosterone system blockade in the kidney. *J Hyperten* 2011; 29: 2147-55.

TABELLE

Tabella 1 – Caratteristiche demografiche degli Ipertesi Essenziali (IE) e dei Controlli (C) del Gruppo A

	IE	C
C N°	10	10
Sesso	5 F / 5 M	6 F / 4 M
Età aa, media \pm DS (range)	43.0 \pm 11.7 (21-57)	41.2 \pm 4.4 (26-59)
BMI kg/mq \pm ES	26.4 \pm 1.0	24.4 \pm 1.3

Tabella 2 – Gruppo A: parametri umorali ed emodinamici (media±ES) degli Ipertesi Essenziali (IE) e dei Controlli (C) prima e dopo somministrazione di calcitriolo.

PARAMETRI	IE (n=10)		C (n=10)	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo
Calcio (mg/dl)	9.5 ± 0.07	9.6 ± 0.04	9.4 ± 0.13	9.3 ± 0.11
Fosforo (mg/dl)	3.2 ± 0.09	3.4 ± 0.08	3.7 ± 0.42	3.8 ± 0.14
Magnesio (mg/dl)	2.1 ± 0.06	2.0 ± 0.05	2.0 ± 0.02	1.96 ± 0.02
Creatinina (mg/dl)	0.86 ± 0.02	0.86 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.91 ± 0.02
Creat. Clearance (ml/min)	99.2 ± 5.2	97.1 ± 4.7	97.6 ± 5.4	98.3 ± 3.8
Sodiuria (mEq/24-h)	131.1 ± 23.7	87.5 ± 18.6 **	134.0 ± 16.5	141.0 ± 15.0
Microalbuminuria (mg/24h)	7.7 ± 0.54	7.8 ± 1.6	9.8 ± 2.9	6.3 ± 0.6
25(OH)D (ng/ml)	12.6 ± 1.6	14.5 ± 2.0	20.1 ± 2.5 **	20.4 ± 2.2
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	28.0 ± 2.4	38.9 ± 11.0	35.4 ± 6.5	24.0 ± 3.9
PTH (pg/ml)	38.2 ± 6.3	30.7 ± 5.6	38.2 ± 8.4	35.3 ± 7.1
PAS (mmHg)	145.0 ± 6.1	133.0 ± 5.3 *	107.0 ± 5.5 §§	110.0 ± 4.9
PAD (mmHg)	90.0 ± 4.5	81.6 ± 4.5 *	65.0 ± 3.5 §	70.2 ± 2.8

PAS/PAD = Pressione sistolica e diastolica; * P<0.05 e ** P< 0.02 vs IE prima; § P<0.001 e §§ P<0.0001 vs IE dopo.

Tabella 3 – Gruppo B: parametri umorali ed emodinamici (media±ES) prima ed alla fine dello studio con colecalciferolo negli Ipertesi Essenziali.

PARAMETRI	IPERTESI ESSENZIALI (n=18)				
	Tempo -15	Tempo 0	4 settimane	8 settimane	P
Calcio (mg/dl)	-	9.6 ± 0.13	-	9.3 ± 0.12	ns
Fosforo (mg/dl)	-	2.8 ± 0.15	-	2.9 ± 0.13	ns
Magnesio (mg/dl)	-	2.1 ± 0.01	-	2.0 ± 0.02	ns
Creatinina (mg/dl)	-	0.82 ± 0.04	-	0.84 ± 0.03	ns
25(OH)D (ng/ml)	-	14.9 ± 1.4	38.0 ± 3.0	27.0 ± 2.3	< 0.001
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	-	27.7 ± 2.4	41.2 ± 6.0	50.2 ± 11.3	< 0.05
PTH (pg/ml)	-	37.3 ± 4.6	34.4 ± 4.3	41.2 ± 3.6	ns
PAS (mmHg)	147.2 ± 3.0	135.0 ± 0.8 **	135.0 ± 1.2	132.0 ± 1.3	ns
PAD (mmHg)	93.2 ± 0.9	85.0 ± 1.1 *	79.0 ± 1.2	79.0 ± 1.4	ns

PAS/PAD = Pressione sistolica e diastolica; *P<0.05 e ** P<0.01 vs Tempo -15

Tabella 4 – Gruppo C: parametri umorali prima e dopo 8 settimane di terapia con colecalciferolo negli Ipertesi Essenziali.

PARAMETRI	Tempo 0	8 settimane	P <
Calcio (mg/dl)	9.4 ± 0.12	9.3 ± 0.11	ns
Fosforo (mg/dl)	2.6 ± 0.14	2.9 ± 0.17	ns
Magnesio (mg/dl)	2.0 ± 0.04	2.0 ± 0.04	ns
Sodio (mEq/l)	141.0 ± 0.45	140.8 ± 0.14	ns
Potassio (mEq/l)	3.9 ± 0.30	4.1 ± 0.47	ns
Creatinina (mg/dl)	0.89 ± 0.04	0.85 ± 0.03	ns

Tabella 5 – Gruppo C: livelli plasmatici di 25(OH)D, 1,25(OH)₂D e PTH e valori pressori prima e dopo 8 settimane di terapia con colecalciferolo negli Ipertesi Essenziali.

PARAMETERS	Tempo 0	8 settimane	P <
25(OH)D (ng/ml)	18.3 ± 2.8	38.4 ± 3.2	0.001
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	22.4±3.6	48.6±2.3	0.001
PTH (pg/ml)	47.7 ± 5.5	38.9 ± 6.0	ns
PAS (mmHg)	137.4 ± 1.8	134.8 ± 2.3	ns
PAD (mmHg)	81.6 ± 1.8	81.0 ± 1.6	ns

FIGURE

Fig. 1 – Gruppo A: Effetti del calcitriolo sulla PRA, renina attiva, angiotensina II ed aldosterone negli Ipertesi Essenziali (IE) e nei controlli.

Fig. 2 – Gruppo B: Effetti del colecalciferolo sulla PRA, renina attiva, angiotensina II ed aldosterone negli Ipertesi Essenziali trattati con antagonisti dell'angiotensina II (tempo – 2 settimane).

Fig. 3 – Gruppo C: Effetti del colecalciferolo sulla PRA, renina attiva, angiotensina II e aldosterone negli Ipertesi Essenziali.

Fig. 4 – Gruppo C: Effetti del colecalciferolo sull'angiotensinogeno plasmatico ed urinario negli Ipertesi Essenziali.

FIGURA 1

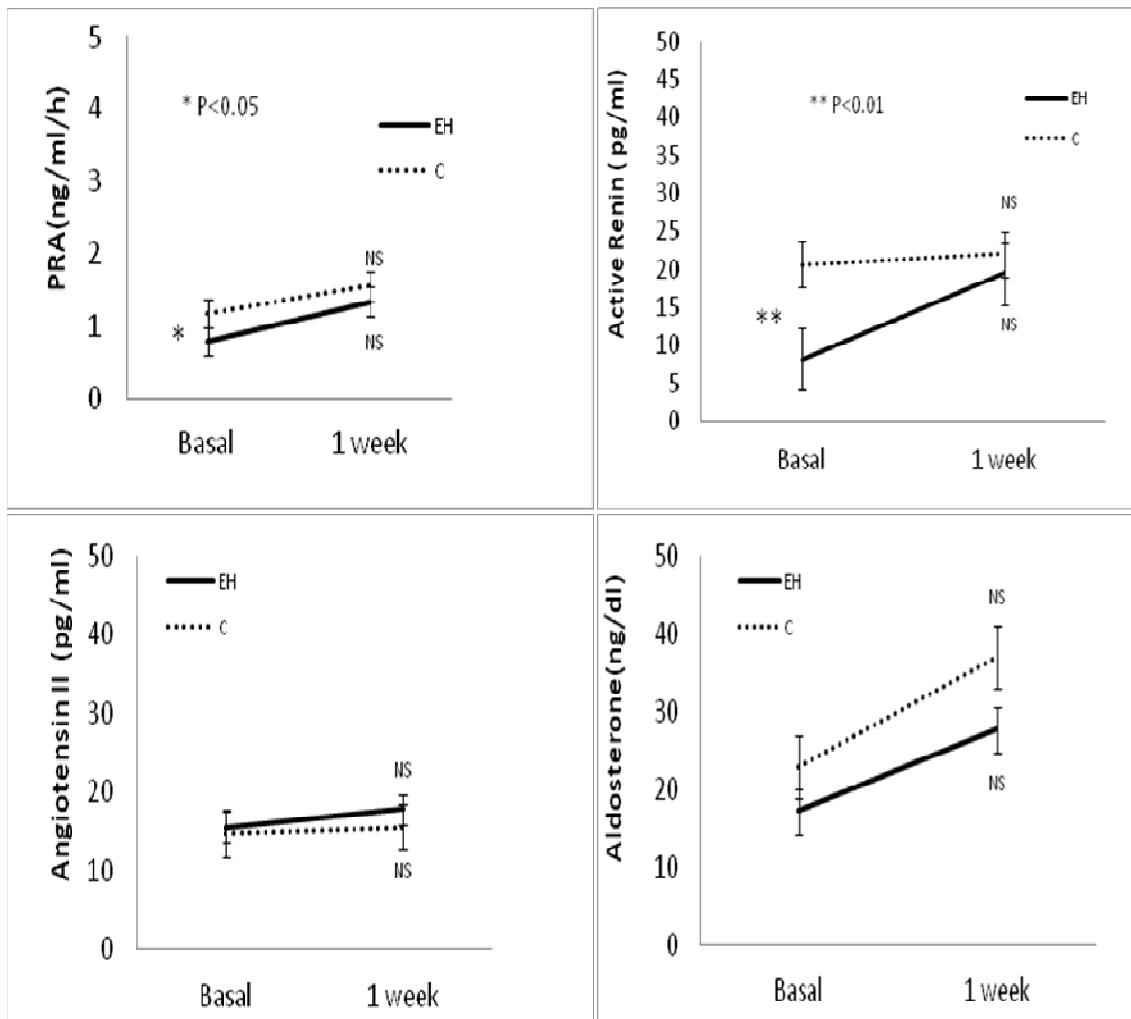


FIGURA 2

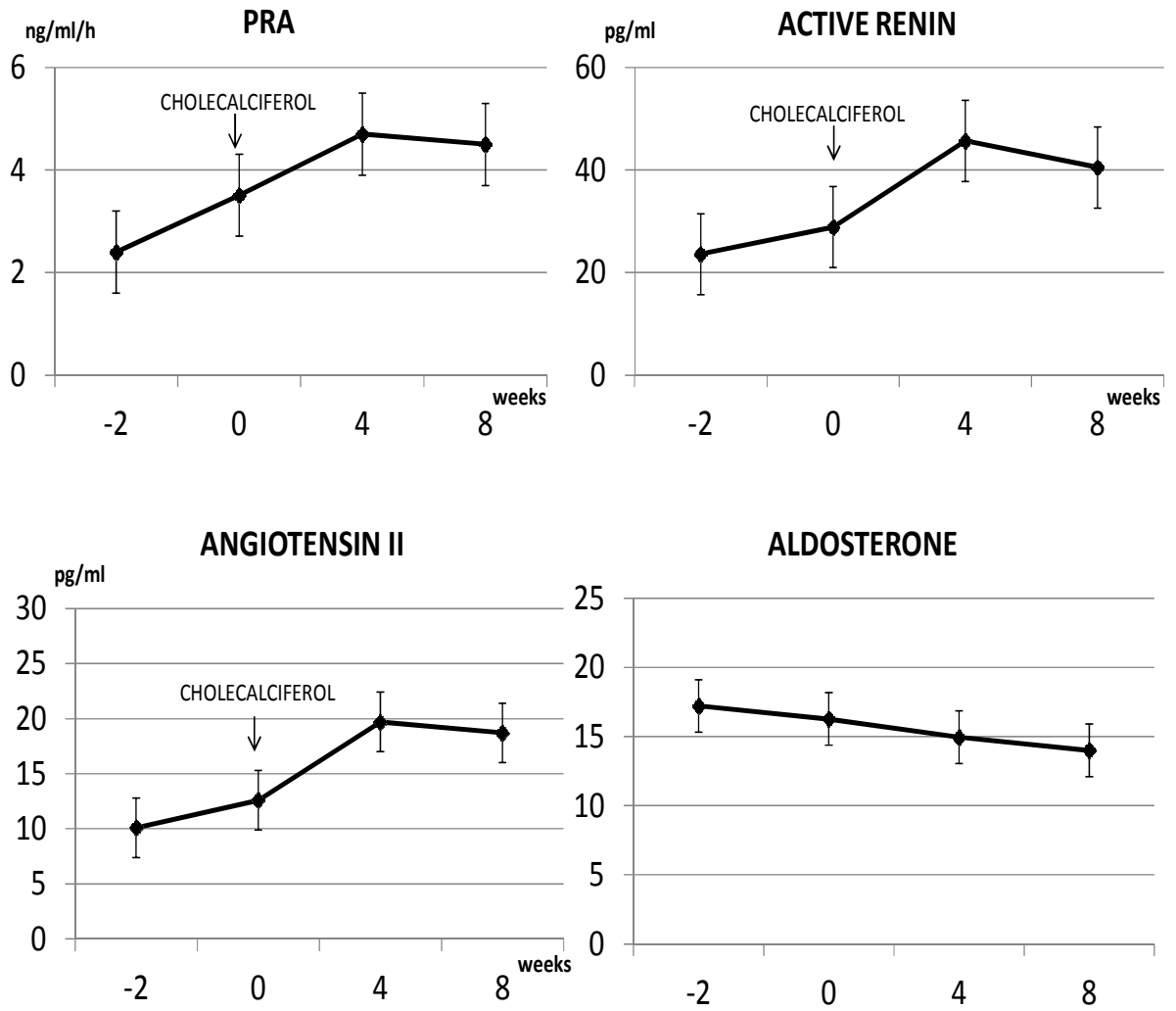


FIGURA 3

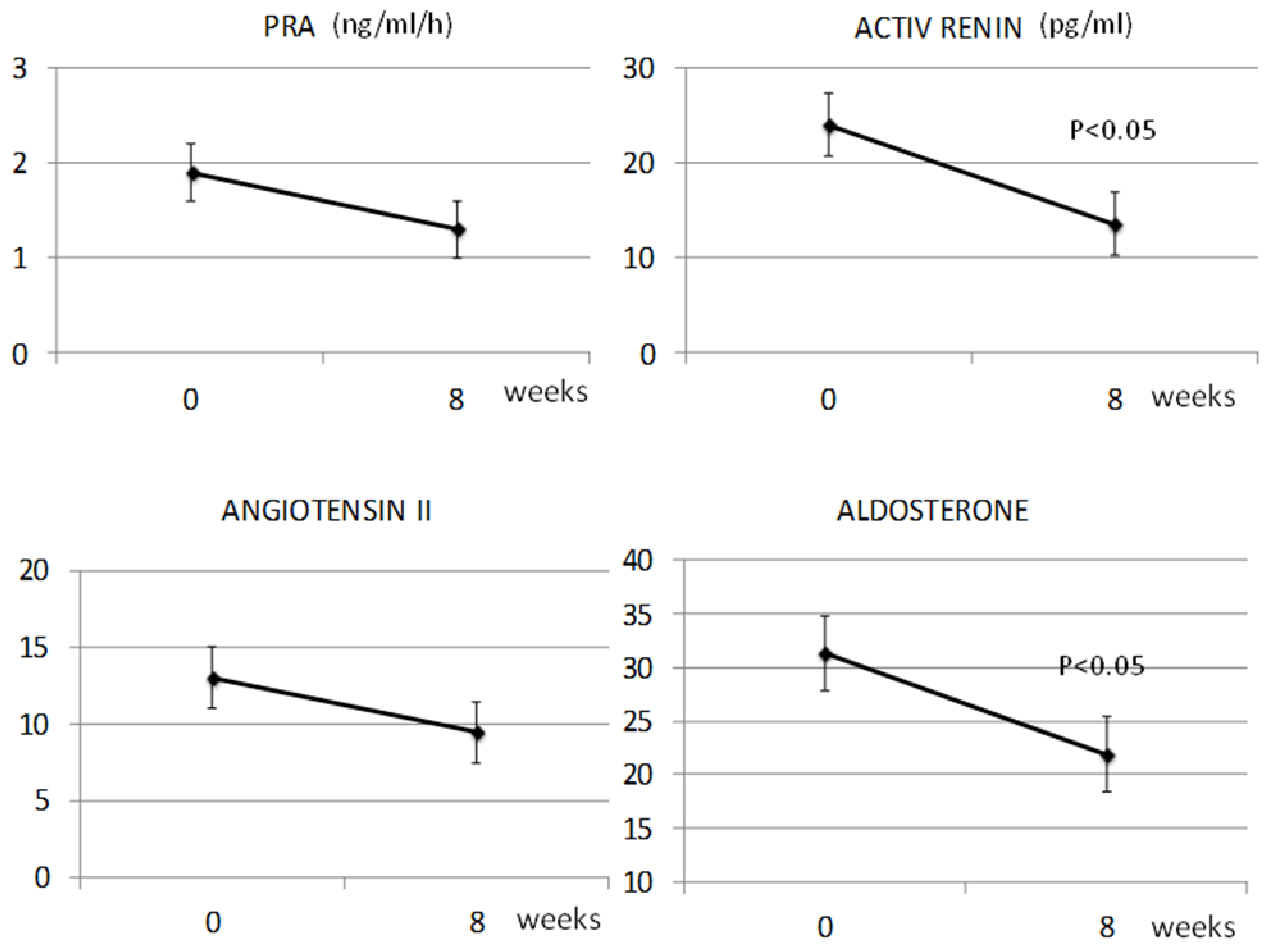


FIGURA 4

