



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Direttore Prof. Mario Petrini

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area
Critica
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in
Medicina e Chirurgia
Direttore Prof. Giulio Guido

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

**Effetti della somministrazione di Vitamina D sul Sistema
Renina Angiotensina Aldosterone in pazienti con Ipertensione
Essenziale e Ipovitaminosi D**

RELATORE

Chiar.mo Prof. *Giampaolo Bernini*

CANDIDATO

Francesca Gervasi

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

Tutti dicono che il cervello sia l'organo più complesso del corpo umano, da medico potrei anche acconsentire. Ma come donna vi assicuro che non vi è niente di più complesso del cuore, ancora oggi non si conoscono i suoi meccanismi. Nei ragionamenti del cervello c'è logica, nei ragionamenti del cuore ci sono le emozioni.

Rita Levi Montalcini

INDICE

Indice	3
Riassunto	5
Introduzione	8
Vitamina D ed Effetti Cardiovascolari	8
Vitamina D ed Ipertensione Arteriosa	14
Vitamina D e Danno Vascolare	17
Studio Clinico	22
Background	22
Obiettivi dello studio	25
Pazienti e Metodi	26
Pazienti	26
Protocollo.....	28
Misurazioni	29
Laboratorio	30
Analisi statistica	31
Risultati.....	32
Conclusioni	34
Tabelle	39
Figure	41
Bibliografia	46

RIASSUNTO

Negli ultimi 10 anni, la vitamina D ha suscitato un notevole interesse per i suoi possibili effetti sul sistema cardiovascolare.

Infatti, essa è conosciuta principalmente per il ruolo chiave che svolge sul metabolismo calcio/fosforo e sul tessuto osseo, ma ultimamente stanno emergendo nuove funzioni extra-scheletriche e, tra queste, azioni cardioprotettive, antinfiammatorie ed anti-aterosclerotiche.

Numerosi studi osservazionali hanno mostrato una relazione inversa fra livelli plasmatici di vitamina D e prevalenza di malattie cardiovascolari. Tale associazione è stata inoltre validata da studi in vitro e sull'animale, che hanno individuato numerosi meccanismi fisiopatologici in grado di rafforzare questa correlazione.

È stato dimostrato che la somministrazione di vitamina D è in grado di modulare in senso negativo l'attività del sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS), di migliorare l'attività del sistema dell'ossido nitrico, di ridurre gli effetti deleteri dei prodotti di glicosilazione terminale sull'endotelio e di ridurre i livelli dei mediatori dell'infiammazione.

E' sul sistema RAA che abbiamo concentrato la nostra attenzione.

Lo studio ha avuto i seguenti obiettivi:

- verificare l'esistenza di una relazione tra i valori plasmatici di vitamina D e il sistema RAA in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale;
- valutare gli effetti emodinamici e biumorali sul RAAS della somministrazione di colecalciferolo in pazienti ipertesi essenziali e con ipovitaminosi D.

La popolazione valutata nella nostra indagine è composta da un gruppo di 26 pazienti con ipertensione arteriosa essenziale.

Di questi, ben 15 sono stati ammessi all'indagine in quanto hanno mostrato livelli plasmatici di 25(OH)vitamina D < 30 ng/ml.

I pazienti reclutati, oltre ad essere ipertesi essenziali e ipovitaminosici, sono liberi da terapie interferenti con il sistema RAA (inibitori diretti della renina, ACE-inibitori e antagonisti del recettore di tipo 1 dell'angiotensina II), con il sistema nervoso simpatico (beta-bloccanti o beta-agonisti e clonidina) o con il metabolismo del calcio e del fosforo (diuretici).

Lo studio ha previsto la somministrazione di 25000 UI di colecalciferolo una volta la settimana per otto settimane e un intake di sodio costante nella dieta per tutta la durata dell'indagine.

In condizioni basali e alla fine dello studio sono stati valutati i componenti del RAAS (angiotensinogeno plasmatico, renina, PRA, angiotensina II, aldosterone e angiotensinogeno urinario), la pressione arteriosa e i livelli di vitamina D (25(OH)vitamina D).

Dopo la somministrazione di colecalciferolo tutti i pazienti mostravano valori plasmatici di 25(OH)vitamina D normali.

Alla fine dello studio è stata osservata una riduzione significativa ($p < 0,005$) della renina plasmatica e dell'aldosterone e un decremento apprezzabile, seppur non rilevante ai fini statistici, di PRA e angiotensina II.

Nessuna differenza è stata trovata nei valori di angiotensinogeno plasmatico e urinario.

In conclusione, i nostri dati indicano che nei pazienti con ipertensione essenziale e con ipovitaminosi D, a dieta costante di sodio e liberi da terapie interferenti sul RAAS, la stimolazione cronica del recettore della vitamina D riduce l'attività del sistema RAA.

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), unitamente ai risultati di studi epidemiologici ed osservazioni ricavate su animali, ha permesso di accertare i noti effetti sul metabolismo calcio/fosforo e sul tessuto osseo e di ipotizzare azioni cardioprotettive, antinfiammatorie ed anti-aterosclerotiche direttamente esercitate da questa vitamina.

Studi su modelli animali

I primi studi che evidenziarono un legame 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 sierici 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 che, resi knockout per il Recettore della Vitamina D (VDR) o per la 1 α -idrossilasi, 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 immuno-modulatorie 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 della trascrizione dell'IFN- γ . ⁶

La vitamina D è quindi in grado di promuovere l'azione di fattori antiinfiammatori come l'IL-10 (Th2 mediata) e di inibirne altri pro-infiammatori, come IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ , MMP (Th1 mediata). ^{7, 8, 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 down-regolare 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 come un vero e proprio fattore anti-aterosclerotico. Questo grazie alla sua dimostrata capacità di inibire la fagocitosi del colesterolo da parte dei macrofagi e quindi la formazione delle cellule schiumose, di down-regolare 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, 15, 16, 17}

Altra funzione ampiamente dimostrata è l'effetto inibitorio che la vitamina D esercita nei confronti dei processi di calcificazione intimale vascolare in seguito all'identificazione 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 tonaca media delle arterie (collagene tipo I, Core Binding Alpha-I, Bone Matrix Protein-2, Matrix Gla Protein).^{18, 19, 20, 21}

Un altro meccanismo con cui la vitamina D può esercitare un benefico effetto cardiovascolare è rappresentato dalla sua influenza sul sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS).

Nei topi knockout per il gene VDR vi è un considerevole aumento dell'mRNA della renina con conseguente attivazione del RAAS che risulta indipendente dai livelli sierici di PTH.

L'importanza del RAAS nella patogenesi del danno CV è dimostrata da esperimenti, condotti sullo stesso modello animale, nei quali è stato osservato che, in seguito alla somministrazione di inibitori del RAAS, il danno cardiaco tende a regredire completamente.^{22, 23}

In accordo con tali risultati, anche esperimenti condotti in vitro su cellule juxtaglomerulari hanno dimostrato la capacità da parte della vitamina D (o di analoghi) di sopprimere direttamente il gene della renina.^{22, 24}

Studi sull'uomo

Nell'uomo la relazione tra vitamina D e malattie cardiovascolari è stata inizialmente dimostrata nei soggetti affetti da insufficienza renale terminale (ERSD), nei quali, come noto, l'assenza di adeguati livelli di 1,25(OH)₂D portava allo sviluppo di iperparatiroidismo secondario (SHPT).²⁵ Quest'ultima è stata considerata, in prima istanza, il principale effettore della disfunzione CV frequente in questi pazienti, in virtù di azioni dirette ipertensivizzanti e di effetti inotropi²⁶ 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)₂D o analoghi) è stata in grado di ridurre significativamente l'entità della ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) ²⁸ e della mortalità CV. ^{29, 30}

Molti, ma non la totalità, degli studi effettuati su pazienti sottoposti a paratiroidectomia totale hanno dato risultati sovrapponibili, ragion per cui sono state supposte azioni protettive non PTH-mediate bensì esercitate direttamente dalla vitamina D. ^{31, 32}

Nel corso degli anni, diversi lavori hanno confermato una significativa riduzione della mortalità cardiovascolare dei pazienti con malattia renale cronica (CKD), in dialisi ed in pre-dialisi, a seguito della somministrazione di attivatori del VDR, indipendentemente dal prodotto calcio fosforo e/o dai livelli sierici di PTH. ^{33, 34, 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), in questo momento a disposizione, non consente di stabilire con precisione questo rapporto.

Infatti, se da una parte una recente metanalisi condotta su 6853 pazienti con CKD ha indicato che la vitamina D è associata, pur modestamente, ad una riduzione della mortalità per tutte le cause ³⁶ e un'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

E' ormai noto che esiste una correlazione statisticamente significativa tra ipovitaminosi D ed ipertensione arteriosa ^{39, 40, 41, 42, 43} sebbene i risultati dei diversi studi osservazionali a disposizione risultino conflittuali.

Una relazione di causa-effetto è supposta sulla base di evidenze sperimentali e traslazionali che dimostrano un effetto di modulazione della vitamina D sul RAAS.

Ad esempio, studi condotti su soggetti normotesi e ipertesi rivelano una relazione inversa tra metaboliti della vitamina D e l'attività della renina plasmatica, indipendentemente dai livelli di renina basale o dall'intake di sodio. ^{44, 45}

L'attivazione del sistema RAA e la successiva sintesi dell'angiotensina II sono note per aumentare il tono vascolare e determinare una rigidità arteriosa, che può precedere e contribuire allo sviluppo di ipertensione; essi sono anche forti predittori di rischio complessivo CVD. ⁴⁶

L'evidenza finale indica che la carenza di vitamina D può promuovere la disfunzione vascolare e può sostenere l'attivazione RAAS, mentre livelli sufficienti possono determinare una inibizione endogena.

Purtroppo, ad oggi, stabilire l'associazione di causa-effetto esistente tra la carenza di vitamina D e l'incidenza di malattie cardiovascolari è cosa complicata, dal momento che bassi livelli di 25(OH)vitamina D possono essere una conseguenza dei disturbi cardiovascolari piuttosto che la causa della malattia.

La "Third National Health and Nutrition Examination" (NHANES III) ha condotto uno studio sulla relazione tra vitamina D e Ipertensione nel quale sono stati presi in esame 12644 pazienti dal 1988 al 1994; i risultati hanno dimostrato come sia la pressione arteriosa sistolica (PAS) sia quella diastolica (PAD) risultano significativamente aumentate nell'ambito dei pazienti con valori sierici di 25(OH)D più bassi (quintile con 25(OH)D < 16.2 ng/ml).⁴²

Tra le ricerche fatte a tal riguardo è degna di nota quella diretta da Forman et al., uno studio osservazionale della durata di 4 anni su più di 1800 pazienti di ambo i sessi, nel quale si è riscontrato un significativo aumento del rischio di sviluppo di ipertensione arteriosa nel gruppo di pazienti con deficit di 25(OH)D (< 15 ng/ml) rispetto a quello con valori nella norma (> 30 ng/ml).⁴⁷

Al momento disponiamo solo di due studi prospettici, randomizzati, controllati.

Uno di questi, condotto su 148 donne di età superiore a 70 anni, ha evidenziato come nel gruppo di pazienti trattato con vitamina D (800UI/die) e calcio (1200mg/die) era osservabile una significativa riduzione dei valori di PAS e della frequenza cardiaca (HR) rispetto a quello in solo trattamento con calcio (1200 mg/die).⁴⁸

Il possibile effetto antipertensivo vitamina D-mediato potrebbe essere determinato da diversi fattori e tra questi, in modo particolare, dalla soppressione del PTH e del RAAS, da azioni reno e vasculo protettive, 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 condizionino 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 aumenta notevolmente se si considerano i pazienti appartenenti al quintile con valori di vitamina D minori di 7.8 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).⁴⁹

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.⁵⁰, valutando prospetticamente per circa 10 anni una coorte di 1354 pazienti di sesso maschile appartenenti al Professional Follow-Up Study (HPFS), ha dimostrato come i valori sierici di 25(OH)D risultassero statisticamente più bassi nei 454 pazienti colpiti da infarto

del miocardio, rispetto ai restanti 900 controlli, nonostante l'aggiustamento per i noti fattori di rischio CV.

L'autore conclude che il deficit di vitamina D sia da considerarsi un fattore di rischio indipendente dalla comparsa di MI e che valori sierici di 25(OH)D maggiori di 30 ng/ml dimezzino questo rischio.

Altri studi hanno analizzato l'associazione tra ipovitaminosi D e comparsa di malattia vascolare. Tra questi, è degno di nota 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 ha provato 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 CV⁵¹.

Risultati analoghi sono stati ottenuti dallo studio LURIC (Ludwingshafen Risk and Cardiovascular Helth)⁵², che ha analizzato la relazione tra deficit di vitamina D e mortalità cardiovascolare in una coorte di 3258 pazienti sottoposti ad angiografia coronarica.

Nel corso dei 7,7 anni di follow-up i pazienti con valori sierici di 25(OH)D più bassi mostravano una evidente riduzione dei livelli plasmatici di renina e angiotensina II.

Recentemente, l'Intermountain Heart Collaborative Study, che includeva più di 40.000 individui sani, ha dimostrato una correlazione tra bassi livelli di 25(OH)D ed un aumentato rischio CV in particolare per scompenso cardiaco ed eventi cerebrovascolari.⁵³

L'associazione tra deficit di vitamina D ed incidenza di CVD è particolarmente significativa nell'ambito dei soggetti con CVD conclamata o con alto rischio di sviluppo di CVD ed inoltre alcuni indicatori suggeriscono l'ipotesi che tale relazione non segua un andamento lineare bensì si manifesti per valori di 25(OH)D inferiori a 15 ng/ml.⁵⁴

Ad oggi mancano ancora studi di intervento disegnati per valutare direttamente l'azione della supplementazione di vitamina D sugli outcome CV e sulla pressione arteriosa.

La maggior parte dei dati a disposizione sono stati 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.^{55, 56}

Nel Women's Health Initiative (WHI), comprendente una coorte prospettica di 36.282 donne in post-menopausa, 18.176 sono state randomizzate a ricevere 500 mg di calcio addizionati a 200 UI di vitamina D3 due volte al giorno e confrontate con 18.106 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 infarto del miocardio, angina, by-pass aorto-coronarico o procedure di rivascularizzazione percutanee e morte CVD.

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).⁵⁷

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.⁵⁵

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.

STUDIO CLINICO

Background

Numerose osservazioni suggeriscono una stretta relazione tra vitamina D e malattia cardiovascolare nell'uomo.

I livelli plasmatici di vitamina D sono inversamente correlati con la pressione arteriosa ⁵⁸ e la mortalità cardiovascolare ^{59, 51} e studi di intervento indicano che la supplementazione con vitamina D migliora il profilo di rischio cardiovascolare. ^{60, 61, 48, 62}

Inoltre la vitamina D influenza positivamente la progressione della malattia renale cronica in pazienti con nefropatia diabetica ^{63, 64} e non diabetica. ⁶⁵

Uno dei possibili meccanismi che può essere coinvolto nella relazione tra livelli di vitamina D, la morbilità e mortalità cardiovascolare è certamente il RAAS.

Nonostante il fatto che non ci siano dati univoci su una relazione esistente tra la vitamina D e gli eventi cardiovascolari ⁶⁶, il legame tra questa vitamina e le malattie cardiovascolari è solido.

Infatti studi su animali ^{24, 25, 67} ed *in vitro*⁶⁸ dimostrano chiaramente che l'attivazione dei recettori della vitamina D inibisce i livelli di mRNA 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 sugli effetti da parte della vitamina D sul RAAS nell'uomo in condizioni normali e patologiche; tra i pochi studi sugli esseri umani, riportati in letteratura, nessun effetto soppressivo sul RAAS sistemico è stato trovato in pazienti acutamente⁶⁹ o cronicamente⁶³ trattati con vitamina D.

Ad oggi, solo due lavori hanno affrontato questo problema, sia a medio che a lungo termine, ed entrambi non hanno osservato alcuna soppressione del RAAS dopo terapia con vitamina D. ^{63, 70, 61}

Tuttavia, in entrambi gli studi sopra riportati,^{63, 69} i pazienti erano sotto trattamento con inibitori RAAS.

Così la vitamina D, alle dosi utilizzate, potrebbe non essere stata in grado di sopprimere l'incremento compensatorio della renina plasmatica associata all'uso di bloccanti del RAAS.

Il mancato effetto riportato può trovare numerose giustificazioni, tra cui il tipo di paziente studiato ed il protocollo sperimentale utilizzato, ma potrebbe essere dovuto anche al fatto che lo studio abitualmente eseguito sul RAAS si basa sulla misura dei parametri circolanti, come la PRA, renina, ALD ed angiotensina II.

Un'altra possibilità è che il “fallimento” del beneficio previsto (ossia inibizione RAAS) possa essere solo apparente e possa effettivamente verificarsi a livello del RAAS locale (intra-renale), senza influenzare la circolazione sistemica, come recentemente riportato da Vaidya et al.⁷¹

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 ^{72,73} che, da studi effettuati su pazienti ipertesi⁷⁴ e su pazienti con nefropatia cronica⁷⁵, sembra essere uno specifico marker dello stato intrarenale del RAAS.

Obiettivi dello studio

- ✓ Verificare l'esistenza di una relazione tra i livelli plasmatici di vitamina D e sistema RAA in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale;

- ✓ Valutare gli effetti emodinamici e biumorali sul RAAS della somministrazione di vitamina D nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale e ipovitaminosi D.

Pazienti e Metodi

Pazienti

Lo studio in oggetto è stato condotto presso il Centro di Ipertensione Arteriosa (Dipartimento di Medicina Interna) dell'Università di Pisa.

I soggetti sono stati reclutati durante il periodo autunno-inverno, al fine di ottenere, per quanto possibile, livelli di vitamina D più omogenei in seguito alla minore esposizione alla luce solare.

La popolazione valutata è composta da un gruppo di 26 pazienti ambulatoriali con ipertensione arteriosa essenziale.

Di questi, 11 hanno mostrato livelli plasmatici di vitamina D (25(OH)D) superiori a 30 ng/ml e per questo motivo sono stati esclusi dallo studio.

I rimanenti 15 pazienti con ipovitaminosi D (25(OH)D <30 ng/ml) sono stati ammessi all'indagine.

I criteri di esclusione applicati sono stati:

- valore di filtrazione glomerulare (eGFR) < 60 ml/min per 1,73 m² (IRC stadio III-IV NKF);
- ipercalcemia;
- iperfosforemia;
- malattie paratiroidee;
- insufficienza epatica;

- obesità (indice di massa corporea (BMI) > 30 kg/m²);
- diabete mellito;
- malattia granulomatosa cronica;
- assunzione di farmaci antiipertensivi interferenti con il RAAS (inibitori diretti della renina, ACE-inibitori e antagonisti del recettore di tipo 1 dell'angiotensina II), con il sistema nervoso simpatico (SNS) (beta-bloccanti o beta-agonisti e clonidina) o con il metabolismo del calcio e del fosforo (diuretici).

Quando i pazienti erano in terapia con questi farmaci ($n = 13$), questi ultimi venivano sostituiti con i calcio-antagonisti e/o $\alpha 1$ -bloccanti almeno un mese prima dell'inizio dello studio.

Tutti i pazienti mantenevano un costante introito di sale nella dieta (~3 g/di NaCl al giorno).

L'indagine è stata approvata dal Comitato Etico Locale e ogni soggetto ha fornito il consenso scritto, dopo aver letto una descrizione dettagliata del protocollo sperimentale.

Protocollo

In considerazione del tipo di pazienti reclutati, ovvero con funzione renale normale, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare come attivatore del recettore della vitamina D il colecalciferolo perché facilmente trasformabile nella sua forma attiva, 1,25(OH)₂vitaminaD.

Inoltre tale farmaco presenta un maggiore profilo di sicurezza e consente una migliore compliance (assunzione settimanale), al contrario del calcitriolo o paracalcitolo (assunzione giornaliera).

Al tempo 0 veniva somministrata una dose di 25.000 unità internazionali (UI) di vitamina D per via orale una volta alla settimana per otto settimane (dose cumulativa 200.000 UI).

Questo regime posologico è stato adottato al fine di mantenere i valori di 25(OH)vitamina D costantemente superiori a 30 ng/ml.

Misurazioni

Al tempo 0 e al termine dello studio (dopo otto settimane) sono stati analizzati i seguenti parametri clinico/laboratoristici:

- pressione arteriosa, secondo le recenti linee guida internazionali;⁷⁶
- valori plasmatici di creatinina, calcio, fosforo, magnesio, sodio, potassio, 25(OH)vitamina D, 1,25(OH)₂vitamina D, paratormone (PTH);
- livelli plasmatici di angiotensinogeno (AGT), aldosterone (ALD), attività reninica plasmatica (PRA), renina e angiotensina II;
- valori di creatinina, albumina e sodio nelle urine delle 24 ore (h), mentre per AGT un campione di urine spot.

I campioni di sangue per il dosaggio dei componenti del RAAS sono stati prelevati in condizioni di digiuno, al mattino (8:00-9:00), seduti, dopo almeno 2 ore di ortostatismo.

Laboratorio

I livelli sierici di creatinina, calcio, fosforo, magnesio, sodio e potassio sono stati analizzati con metodiche standard.

La concentrazione urinaria di creatinina e dell'albumina è stata valutata con un DCA 2000 Analyzer.

La stima della filtrazione glomerulare è stata calcolata mediante la formula MDRD (Modification of diet in renal disease).

Specifici metodi radioimmunologici sono stati utilizzati per la misurazione dei valori ematici di 25(OH)vitamina D e 1,25 (OH)₂ vitamina D (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; intra-assay del 7,6% e inter-assay 9,1%, valori normali (v.n.) 0,2-5,7 ng/ml/h), ALD (DiaSorin, Saluggia, Italia; intra-assay 9,7% e inter-assay 11,5%, v.n. 3,5-30,0 ng/dl) e renina attiva (CisBIO, Bedford, MA, Stati Uniti d'America; intra-assay 1,8% e inter-assay al 4,0%, v.n. 5,1-59,4 pg/ml).

I livelli di PTH plasmatici sono stati valutati mediante dosaggio radioimmunometrico (RIA) per la determinazione quantitativa del peptide umano attivo PTH 1-84 (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, Stati Uniti d'America; intra-assay 2,5% e inter-assay 4,4%, v.n. 13-54 pg/ml), anche la misurazione dell'angiotensina II plasmatica è stata eseguita con

metodica RIA (Pantec srl, Torino, Italia; intra-assay del 3,1% e inter-assay al 4,3%, v.n. 5,5-21,3 pg/ml).

Infine la concentrazione plasmatica ed urinaria di AGT è stata saggiata grazie ad un recente metodo ELISA (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.; intra-assay 5,0% e inter-assay 5,3%, v.n. 28-71 µg/ml in plasma e 7,1-35 ng/ml nelle urine).

Poiché l'escrezione urinaria giornaliera di AGT nell'uomo è fortemente correlata con il rapporto tra la concentrazione urinaria dell'AGT e quella della creatinina urinaria (UAGT/UCr), per analizzare tale rapporto abbiamo raccolto campioni di urina (spot).⁷⁷

Analisi statistica

Per l'analisi statistica sono stati impiegati il test *t*-Student per i dati appaiati e il test di Wilcoxon per le variabili non parametriche (componenti RAAS).

La correlazione lineare è stata utilizzata per verificare la relazione tra le variabili individuali.

I risultati sono stati espressi come media ± SEM e media ± DS.

E' stato considerato statisticamente significativo un $P < 0.05$.

Risultati

I pazienti selezionati erano ipertesi essenziali, liberi da farmaci interferenti con il RAAS ed a dieta controllata di sale e non mostravano altre comorbidità, ad eccezione di ipercolesterolemia in due casi (trattati con statine) ed iperuricemia in un paziente.

In condizioni basali, otto pazienti avevano livelli di vitamina D:

- < 20 ng/ml (deficit)

e sette pazienti livelli ormonali:

- < 30 ng/ml (insufficienza).

Dopo la somministrazione di colecalciferolo è significativamente aumentata ($p < 0,001$), come atteso, la concentrazione plasmatica di 25(OH)vitamina D e questo ormone è risultato normalizzato in tutti i casi ($> 30\text{ng/ml}$).

I livelli basali di PTH erano nel range della normalità, con valori di pressione arteriosa diastolica e sistolica ben controllati dalla terapia somministrata all'inizio dell'indagine.

Questi parametri sono rimasti invariati per tutto lo studio ([Tabella 1](#)).

I valori plasmatici di calcio, fosforo, magnesio, sodio, potassio, creatinina, eGFR e quelli della sodiuria non hanno subito alcuna variazione significativa. ([Tabella 2](#)).

Nonostante la dieta con un apporto costante di sale, documentata da valori della sodiuria delle 24h sovrapponibili ($125,8 \pm 16,1$ mEq/24h vs $126,7 \pm 12,7$ mEq/24h), la misura dei componenti del RAAS al termine dello studio ([Figura 1](#)) ha mostrato una riduzione della renina plasmatica ($13,6 \pm 3,4$ pg/ml vs $24,0 \pm 5,9$ pg/ml, $p < 0,05$) e dall'ALD ($21,9 \pm 3,0$ ng/dl vs $31,3 \pm 5,5$ ng/dl, $p < 0,05$) e una diminuzione, seppur non significativa, dei livelli di PRA ($1,3 \pm 0,3$ ng/ml/h vs $1,9 \pm 0,4$ ng/ml/h) e di angiotensina II ($9,4 \pm 1,5$ pg/ml vs $13,0 \pm 2,5$ pg/ml).

Dallo studio non sono emerse modificazioni significative dei livelli plasmatici ($42,1 \pm 2,1$ μ g/ml vs $39,0 \pm 2,5$ μ g/ml) ed urinari ($16,1 \pm 2,6$ μ g/g creatinina urinaria vs $14,1 \pm 2,3$ μ g/g creatinina urinaria) di AGT. ([Figura 2](#))

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

CONCLUSIONI

Nel nostro studio è emerso che negli ipertesi essenziali con ipovitaminosi D, i quali non assumono farmaci interferenti con il sistema RAA e con intake costante di sale, la terapia con colecalciferolo è in grado di influenzare l'attività del sistema RAA.

Tale risultato è in accordo con altri studi eseguiti su animali ^{24,67} e in vitro ⁶⁸, i quali suggeriscono che la vitamina D è in grado di inibire i livelli intra-renali di mRNA e l'espressione proteica di diverse componenti del RAAS, come AGT, renina, recettore della renina e del recettore 1 dell'angiotensina II, indipendentemente dal metabolismo del calcio.

A nostra conoscenza, sono riportati in letteratura solo tre studi condotti sull'uomo, che esplorano questo argomento e in nessuno di essi è stato osservato alcun effetto sulle componenti circolanti del RAAS.

Gli studi di Sugden et al. ⁶¹ e di de Zeeuw et al. ⁶³ hanno focalizzato le indagini su pazienti diabetici, con e senza nefropatia, utilizzando come supplemento di vitamina D, rispettivamente, l'ergocalciferolo ed il paracalcitolo.

Il nostro gruppo ha progettato uno studio in pazienti ipertesi dopo somministrazione di calcitriolo o colecalciferolo. ⁷⁰

Tuttavia negli studi sopra citati i pazienti erano in trattamento con inibitori del RAAS e la vitamina D può non essere stata in grado di

sopprimere l'incremento compensatorio della renina associato abitualmente all'uso di questi farmaci.

Nella nostra indagine invece i pazienti erano liberi da farmaci e, se in terapia con antiipertensivi, questi non erano interferenti sul RAAS (ACE-inibitori o antagonisti del recettore 1 dell'AngII) o sul SNS (beta-bloccanti o beta-agonisti, clonidina).

Inoltre i nostri pazienti non erano in terapia con diuretici o altri farmaci influenzanti il metabolismo calcio-fosforo e l'intake sodico era rimasto costante durante lo studio, come mostrato dalla sodiuria.

Un'altra caratteristica della nostra indagine era che la dose di vitamina D somministrata era in grado di mantenere i livelli di 25(OH)vitamina D superiori a 30 ng/ml in tutti i pazienti, come raccomandato dalle linee guida internazionali.⁷⁸

In queste condizioni sperimentali, tutte le componenti circolanti del sistema RAA nei nostri pazienti con ipovitaminosi D sono diminuite dopo la somministrazione di colecalciferolo, a valori statisticamente significativi per la renina attiva e l'ALD.

I nostri dati sono in parte in accordo con uno studio molto recente, il quale dimostra che una dose elevata di colecalciferolo negli ipertesi obesi migliora la risposta dell'ALD all'infusione dell'angiotensina II, un dato che indica un effetto soppressivo del farmaco sul sistema RAA del tessuto reno-vascolare.⁷¹

Un'indagine condotta da Vaidya et al. ⁷¹ ha riportato tuttavia risultati apparentemente in contrasto con quelli del nostro studio, non avendo questi autori osservato alcun cambiamento delle componenti RAAS, nonostante condizioni sperimentali simili alle nostre.

Tuttavia vi sono alcune differenze tra i due studi, che potrebbero giustificare tale divergenza:

- la nostra indagine è stata condotta su pazienti normopeso e caucasici, mentre nello studio Vaidya et al. ⁷¹ sono stati reclutati prevalentemente soggetti di razza nera (70%), ipertesi e obesi;
- la durata della supplementazione con coledaliferolo è stata significativamente superiore nel nostro studio rispetto all'altro (due mesi vs un mese);
- i nostri pazienti hanno mantenuto un costante introito di sale con la dieta (124 mEq/24h) a differenza dello studio di Vaidya et al. nel quale l'assunzione di sale è stata considerevolmente più elevata (330 mEq/24h);
- i prelievi nel nostro caso sono stati eseguiti con pazienti in posizione eretta, mentre nell'altro studio essi sono stati mantenuti in clinostatismo durante la notte.

L'apporto molto elevato di sale, connesso alla raccolta del sangue in posizione supina, riferiti dall'altro studio può aver sostanzialmente

soppresso di per sé l'attività del RAAS, oscurando così l'effetto della vitamina D.

Nel loro insieme i nostri risultati confermano quelli di studi che mostrano una relazione inversa tra PRA ^{45, 79}, renina plasmatica ⁸⁰ ed i livelli di vitamina D in soggetti normotesi e ipertesi e una relazione negativa tra i livelli di 25(OH)vitamina D e quelli circolanti dell'angiotensina II in pazienti con ipertensione essenziale. ⁸¹

E' stato ipotizzato che il sistema RAA intrarenale in alcune condizioni patologiche ⁸² possa contribuire allo sviluppo o alla compromissione della funzione renale, indipendentemente dai valori circolanti del RAAS. Infatti, i meccanismi regolatori del RAAS sistemico e intra-renale sembrano essere diversi e talvolta divergenti. ⁷¹

Alcuni dati ottenuti negli ipertesi ⁸³ e nei pazienti con malattie renali croniche ⁷⁵ suggeriscono che l'AGT urinario può rappresentare uno specifico marker funzionale del RAAS intra-renale.

Sulla base di questi dati, al fine di studiare il comportamento dell'angiotensinogeno plasmatico e renale, negli ipertesi in terapia con colecalciferolo, abbiamo applicato nel presente studio un nuovo sistema ELISA a sandwich, sviluppato per la determinazione dell'AGT. ⁷²

Questo parametro è risultato del tutto immutato dalla supplementazione con vitamina D.

Pertanto sulla base dei dati in nostro possesso non possiamo considerare l'AGT urinario un marker specifico di RAAS intra-renale, ma è più verosimile che esso derivi, attraverso un processo di filtrazione glomerulare, dal fegato, la fonte naturale del peptide.

Anche recenti osservazioni sembrano confermare questa ipotesi.⁸⁴

Vi sono alcuni limiti dello studio che meritano di essere menzionati. Per prima cosa, nonostante i soggetti fossero ben selezionati e liberi da terapie/farmaci interferenti con RAAS, il campione preso in esame è comunque limitato.

In secondo luogo, il grado di ipovitaminosi D nei nostri pazienti e la dose di farmaco somministrato possono non essere stati in grado di mettere in evidenza pienamente gli effetti del colecalciferolo sull'attività RAAS.

In conclusione, i nostri dati indicano che nei pazienti con ipertensione essenziale e con ipovitaminosi D, a dieta costante di sodio e liberi da terapie interferenti sul RAAS, la stimolazione cronica del recettore della vitamina D riduce l'attività del RAAS sistemico, senza influenzare l'angiotensinogeno urinario.

TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche demografiche dei pazienti.

Livelli plasmatici di 25(OH)D, 1,25(OH)₂D e PTH e valori di pressione arteriosa (media ± SE) prima e dopo (otto settimane) la somministrazione di colecalciferolo.

Parametri	Tempo 0	Settimana 8	p
Pazienti <i>n</i>	15	-	-
Genere	8M (53,3%) 7F (46,6%)	-	-
Età media	43,6 (22-71)	-	-
BMI (kg/m ²)	24,6 ± 2,6	-	-
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	0,13
PAS (mmHg)	137,4 ± 1,8	134,8 ± 2,3	0,23
PAD (mmHg)	81,6 ± 1,8	81,0 ± 1,6	0,73

25(OH)D: livelli plasmatici di vitamina D; PTH: paratormone; M: maschio; F: femmina; BMI: indice di massa corporea; PAS: pressione arteriosa sistemica; PAD: pressione arteriosa diastolica.

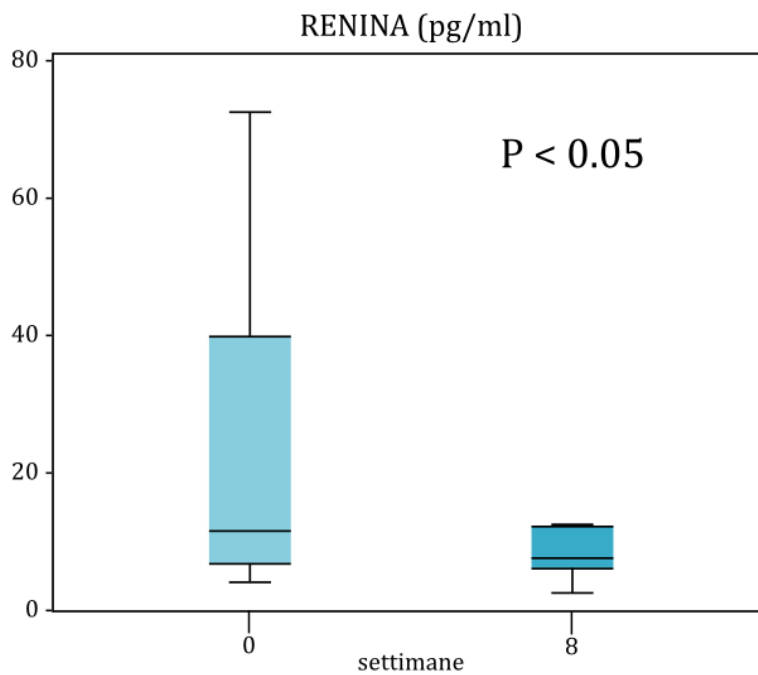
Tabella 1. Parametri sierici e urinari (media \pm SE) prima e dopo (otto settimane) la somministrazione di colecalciferolo.

Parametri	Tempo 0	Settimana 8	P
Calcio (mg/dl)	9,4 \pm 0,12	9,3 \pm 0,11	0,23
Fosforo (mg/dl)	2,6 \pm 0,14	2,9 \pm 0,17	0,19
Magnesio (mg/dl)	2,0 \pm 0,04	2,0 \pm 0,04	0,70
Sodio (mEq/dl)	141,0 \pm 0,45	140,8 \pm 0,14	0,43
Potassio (mEq/dl)	3,9 \pm 0,30	4,1 \pm 0,47	0,39
Creatinina (mg/dl)	0,89 \pm 0,04	0,85 \pm 0,03	0,56
eGFR (MDRD) (ml/min/1.73m ²)	94,4 \pm 4,66	97,1 \pm 3,76	0,62
Sodio Urinario (mEq/24h)	126,7 \pm 12,7	125,8 \pm 16,1	0,51

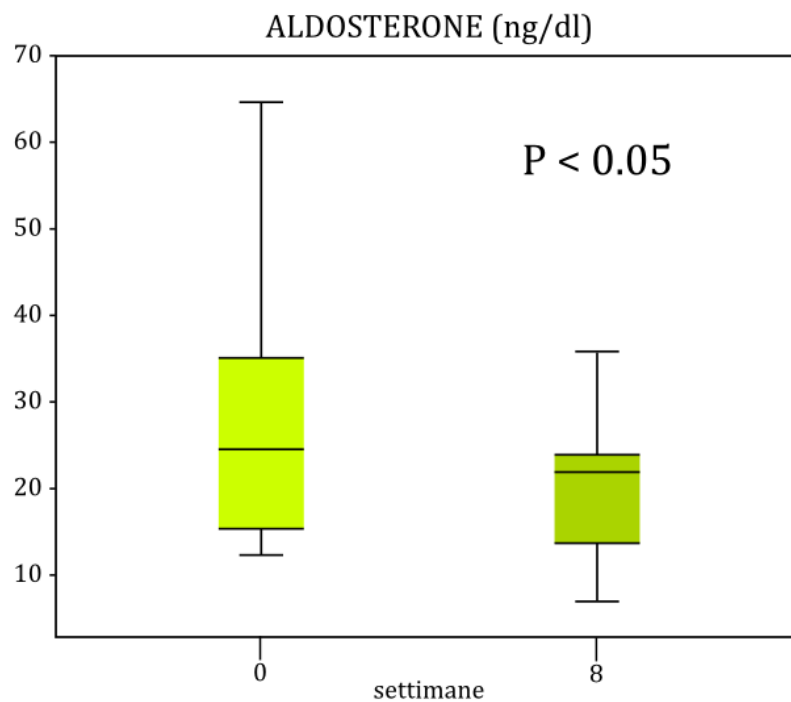
eGFR (MDRD): frazione di filtrazione glomerulare.

FIGURE

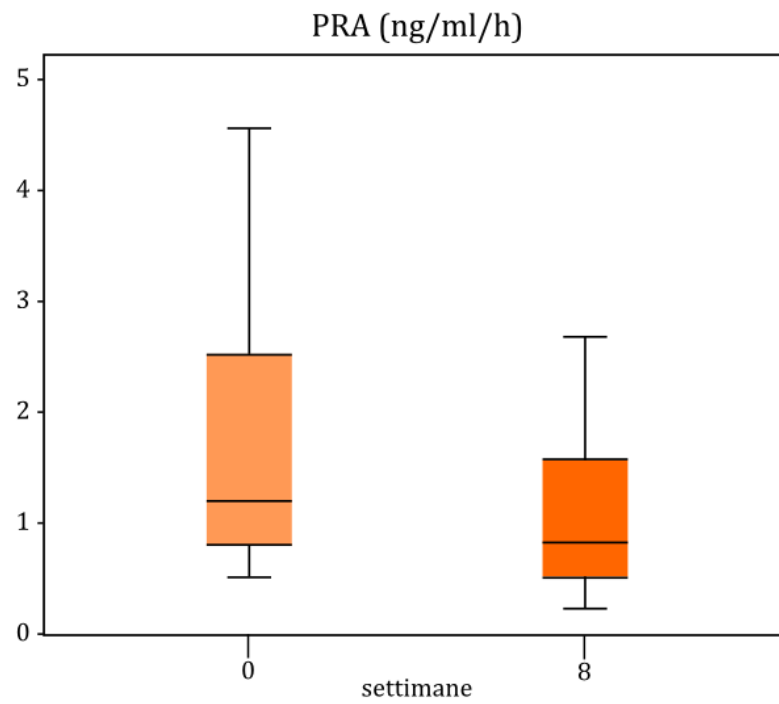
Figura 1. I box-plots descrivono gli effetti del colecalciferolo sulla PRA, renina, Angiotensina II e Aldosterone.



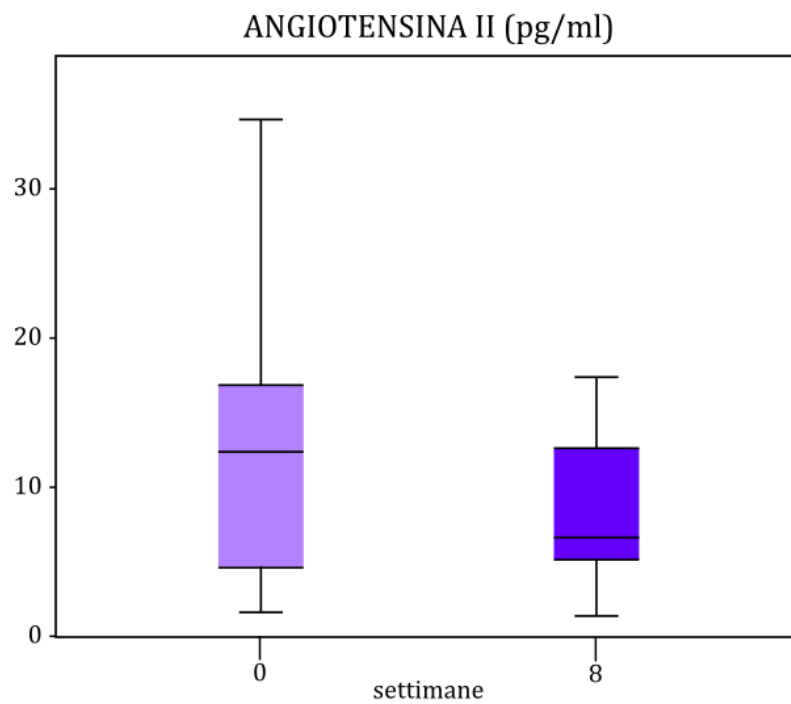
La misura dei componenti del RAAS al termine dello studio ha mostrato una riduzione statisticamente significativa della renina plasmatica da $13,6 \pm 3,4$ pg/ml vs $24,0 \pm 5,9$ pg/ml, $p < 0,05$.



I livelli dell'aldosterone, dopo somministrazione di colecalciferolo, hanno subito una riduzione statisticamente significativa con valori pari a $21,9 \pm 3,0$ ng/dl vs $31,3 \pm 5,5$ ng/dl, $p < 0,05$.

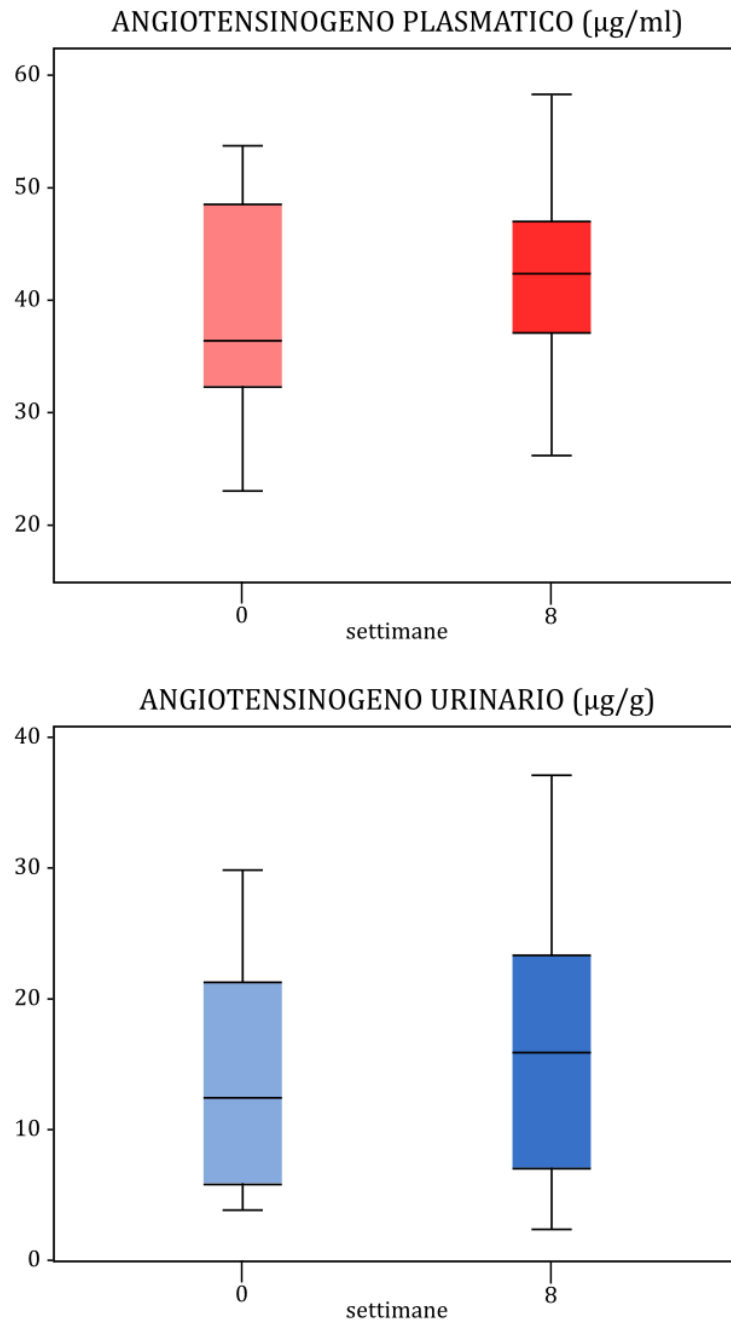


I livelli del PRA mostrano una diminuzione seppur non significativa con valori di $1,3 \pm 0,3$ ng/ml/h vs $1,9 \pm 0,4$ ng/ml/h.



I valori dell'angiotensina II si modificano come segue $9,4 \pm 1,5$ pg/ml vs $13,0 \pm 2,5$ pg/ml. Tale riduzione non è statisticamente significativa.

Figura 1. I Box-plots descrivono gli effetti del colecalciferolo sull'angiotensinogeno sierico e urinario



Dallo studio non sono emerse modificazioni significative dei livelli plasmatici di Aldosterone ($42,1 \pm 2,1$ mcg/ml vs $39,0 \pm 2,5$ mcg/ml) ed urinari ($16,1 \pm 2,6$ mcg/g creatinina urinaria vs $14,1 \pm 2,3$ mcg/g creatinina urinaria).

BIBLIOGRAFIA

1. Weishaar RE, Kim SN, Saunders DE, Simpson RU. Involvement of vitamin D3 with cardiovascular function. III. Effects on physical and morphological properties. *The American journal of physiology*. 1990; **258**(1 Pt 1): 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. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007; **103**(3-5): 416-9.
3. Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007; **103**(3-5): 521-4.
4. Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Dekker JM, Marz W. Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2010; **54**(8): 1103-13.
5. Zittermann A, Koerfer R. Protective and toxic effects of vitamin D on vascular calcification: clinical implications. *Mol Aspects Med*. 2008; **29**(6): 423-32.
6. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*. 2001; **167**(9): 4974-80.
7. Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2001; **145**(3): 351-7.

8. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine*. 1992; **4**(6): 506-12.
9. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney international*. 2006; **69**(1): 33-43.
10. Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto FL, Liao A, Madara JL, et al. Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2006; **291**(2): E315-22.
11. Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008; **3**(5): 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**(2): 207-21.
13. Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr Drug Targets*. 2011; **12**(1): 54-60.
14. Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, 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**(8): 687-98.
15. Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Gardner DG. A role for the cell cycle phosphatase Cdc25a in vitamin D-dependent inhibition of adult rat vascular smooth muscle cell proliferation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010; **122**(5): 326-32.

16. Martinesi M, Bruni S, Stio M, Treves C. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule expression in endothelial cells. *Cell Biol Int*. 2006; **30**(4): 365-75.
17. Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E. Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *Am J Nephrol*. 2009; **29**(5): 465-72.
18. Bellows CG, Reimers SM, Heersche JN. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Res*. 1999; **297**(2): 249-59.
19. Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS, et al. 1,25-(OH)₂-vitamin D3 suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res*. 2002; **274**(2): 323-33.
20. Fraser JD, Otawara Y, Price PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. *J Biol Chem*. 1988; **263**(2): 911-6.
21. Viridi AS, Cook LJ, Oreffo RO, Triffitt JT. Modulation of bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene expression in osteoblastic cell lines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998; **44**(8): 1237-46.
22. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, 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**(1): E125-32.

23. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2008; **74**(2): 170-9.
24. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of clinical investigation.* 2002; **110**(2): 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**(1): 25-33.
26. Rostand SG, Drueke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney international.* 1999; **56**(2): 383-92.
27. Fitzpatrick LA, Bilezikian JP, Silverberg SJ. Parathyroid hormone and the cardiovascular system. *Curr Osteoporos Rep.* 2008; **6**(2): 77-83.
28. Park CW, Oh YS, Shin YS, Kim CM, Kim YS, Kim SY, et al. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 1999; **33**(1): 73-81.
29. Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, Emoto M, Tahara H, Koyama H, et al. Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1alpha-hydroxy vitamin D₃ users in a haemodialysis population. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2004; **19**(1): 179-84.

30. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA, Jr., et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005; **16**(4): 1115-25.
31. Drueke T, Fauchet M, Fleury J, Lesourd P, Toure Y, Le Pailleur C, et al. Effect of parathyroidectomy on left-ventricular function in haemodialysis patients. *Lancet*. 1980; **1**(8160): 112-4.
32. Gafter U, Battler A, Eldar M, Zevin D, Neufeld HN, Levi J. Effect of hyperparathyroidism on cardiac function in patients with end-stage renal disease. *Nephron*. 1985; **41**(1): 30-3.
33. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *The New England journal of medicine*. 2003; **349**(5): 446-56.
34. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, Rohrscheib MR, Bedrick EJ, Meyer KB, et al. Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney international*. 2006; **70**(10): 1858-65.
35. Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Association of activated vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease. *Archives of internal medicine*. 2008; **168**(4): 397-403.
36. Pilz S, Iodice S, Zittermann A, Grant WB, Gandini S. Vitamin D status and mortality risk in CKD: a meta-analysis of prospective studies. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2011; **58**(3): 374-82.

37. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*. 2007; **167**(16): 1730-7.
38. Thadhani R, Appelbaum E, Pritchett Y, Chang Y, Wenger J, Tamez H, et al. Vitamin D therapy and cardiac structure and function in patients with chronic kidney disease: the PRIMO randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2012; **307**(7): 674-84.
39. Duprez D, de Buyzere M, de Backer T, Clement D. Relationship between vitamin D3 and the peripheral circulation in moderate arterial primary hypertension. *Blood Press*. 1994; **3**(6): 389-93.
40. Kristal-Boneh E, Froom P, Harari G, Ribak J. Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension*. 1997; **30**(5): 1289-94.
41. Scragg R, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E. Serum 25-hydroxycholecalciferol concentration in newly detected hypertension. *Am J Hypertens*. 1995; **8**(4 Pt 1): 429-32.
42. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American journal of hypertension*. 2007; **20**(7): 713-9.
43. Snijder MB, Lips P, Seidell JC, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, 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**(6): 558-65.

44. Vaidya A, Williams JS. The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. *Metabolism*. 2012; **61**(4): 450-8.
45. 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**(5): 649-54.
46. Quyyumi AA, Patel RS. Endothelial dysfunction and hypertension: cause or effect? *Hypertension*. 2010; **55**(5): 1092-4.
47. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension*. 2007; **49**(5): 1063-9.
48. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; **86**(4): 1633-7.
49. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clinical endocrinology*. 2006; **65**(5): 593-7.
50. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Archives of internal medicine*. 2008; **168**(11): 1174-80.

51. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008; **117**(4): 503-11.
52. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine*. 2008; **168**(12): 1340-9.
53. Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, et al. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *The American journal of cardiology*. 2010; **106**(7): 963-8.
54. Grandi NC, Breitling LP, Brenner H. Vitamin D and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Prev Med*. 2010; **51**(3-4): 228-33.
55. Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD. Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Annals of internal medicine*. 2010; **152**(5): 315-23.
56. Bolland MJ, Grey A, Avenell A, Gamble GD, Reid IR. 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. *Bmj*. 2011; **342**: d2040.
57. Hsia J, Heiss G, Ren H, Allison M, Dolan NC, Greenland P, et al. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation*. 2007; **115**(7): 846-54.

58. Vaidya A, Forman JP. Vitamin D and hypertension: current evidence and future directions. *Hypertension*. 2010; **56**(5): 774-9.
59. Pilz S, Marz W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008; **93**(10): 3927-35.
60. Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009; **94**(10): 4023-30.
61. 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. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2008; **25**(3): 320-5.
62. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2006; **83**(4): 754-9.
63. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, 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**(9752): 1543-51.

64. Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, Pusey CD, Hill PD, et al. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF-beta1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney international*. 2011; **80**(8): 851-60.
65. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, Dutka P, Ali N, Durie N. Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2009; **54**(4): 647-52.
66. Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, Fatourehchi MM, Alkatib AA, Almandoz JP, et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011; **96**(7): 1931-42.
67. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, Weisinger JR, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney international*. 2008; **74**(11): 1394-402.
68. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem*. 2007; **282**(41): 29821-30.
69. Judd SE, Raiser SN, Kumari M, Tangpricha V. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: a pilot feasibility study. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; **121**(1-2): 445-7.

70. Bernini G, Carrara D, Bacca A, Carli V, Viridis A, Rugani I, et al. Effect of acute and chronic vitamin D administration on systemic renin angiotensin system in essential hypertensives and controls. *Journal of endocrinological investigation*. 2013; **36**(4): 216-20.
71. Vaidya A, Sun B, Larson C, Forman JP, Williams JS. Vitamin D3 therapy corrects the tissue sensitivity to angiotensin ii akin to the action of a converting enzyme inhibitor in obese hypertensives: an interventional study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; **97**(7): 2456-65.
72. Kobori H, Katsurada A, Miyata K, Ohashi N, Satou R, Saito T, et al. Determination of plasma and urinary angiotensinogen levels in rodents by newly developed ELISA. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008; **294**(5): F1257-63.
73. Katsurada A, Hagiwara Y, Miyashita K, Satou R, Miyata K, Ohashi N, et al. Novel sandwich ELISA for human angiotensinogen. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007; **293**(3): F956-60.
74. Kobori H, Urushihara M, Xu JH, Berenson GS, Navar LG. Urinary angiotensinogen is correlated with blood pressure in men (Bogalusa Heart Study). *Journal of hypertension*. 2010; **28**(7): 1422-8.
75. Kobori H, Ohashi N, Katsurada A, Miyata K, Satou R, Saito T, et al. Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity of chronic kidney diseases. *J Am Soc Hypertens*. 2008; **2**(5): 349-54.
76. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. [ESH/ESC 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension]. *Rev Esp Cardiol*. 2007; **60**(9): 968 e1-94.

77. Suzuki Y, Ozawa Y, Kobori H. Quantification of human angiotensinogen by a novel sandwich ELISA. *Peptides*. 2006; **27**(11): 3000-2.
78. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011; **96**(7): 1911-30.
79. Vaidya A, Forman JP, Hopkins PN, Seely EW, Williams JS. 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**(3): 311-9.
80. Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Grammer T, Drechsler C, Boehm BO, 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. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010; **411**(17-18): 1354-60.
81. Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension*. 2010; **55**(5): 1283-8.
82. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007; **59**(3): 251-87.
83. Kobori H, Alper AB, Jr., Shenava R, Katsurada A, Saito T, Ohashi N, et al. Urinary angiotensinogen as a novel biomarker of the intrarenal renin-angiotensin system status in hypertensive patients. *Hypertension*. 2009; **53**(2): 344-50.

84. van den Heuvel M, Batenburg WW, Jainandunsing S, Garrelds IM, van Gool JM, Feelders RA, et al. 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. *Journal of hypertension*. 2011; **29**(11): 2147-55.