



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA E DIAGNOSTICA IN MEDICINA  
INTERNA

Fisiopatologia e Diagnostica per immagini in ambiti cardiovascolare renale e dello sport  
Dipartimento di Medicina Interna Specialistica DIMIS  
Settore Scientifico Disciplinare MED 14

## RAPPORTO TRA I POLIMORFISMI DEL GENE PER IL RECETTORE DELLA VITAMINA D E LE ALTERAZIONI VASCOLARI NELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA ESSENZIALE

IL DOTTORE  
**Dott.ssa Francesca Tornese**

IL COORDINATORE  
**Ch.mo Prof. Massimo Midiri**

IL TUTOR  
**Ch.mo Prof.ssa Santina Cottone**

CICLO XXV  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

## Sommario

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI .....	4
CAPITOLO I.....	5
INTRODUZIONE.....	5
I.1 Introduzione .....	5
I.2 Vitamina D: Metabolismo E Funzione .....	7
I.3 Vitamina D e Sistema Cardiovascolare .....	12
I.4 Polimorfismi del VDR E Ipertensione Arteriosa .....	16
CAPITOLO II .....	21
SCOPO DELLO STUDIO .....	21
II.1 Scopo dello Studio .....	21
CAPITOLO III.....	22
MATERIALI E METODI.....	22
III.1 Materiali E Metodi.....	22
III.2 Statistica .....	27
CAPITOLO IV.....	29
RISULTATI.....	29
CAPITOLO V .....	33
DISCUSSIONE.....	33

FIGURE E TABELLE .....	40
FIGURE .....	40
Figura 1. Metabolismo e funzioni della Vitamina D .....	40
Figura 2. Funzioni extra-scheletriche della Vitamina D .....	41
Figura 3. Relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa sistolica 24 ore .....	42
Figura 4. Pressione arteriosa diastolica clinica .....	43
Figura 5. Relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa differenziale 24 ore .....	44
Figura 6. Relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa sistolica 24 ore .....	45
Figura 7: Box plot IMT .....	46
Tabelle .....	47
TABELLA 1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti ipertesi .....	48
TABELLA 2: Correlazioni univariate tra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa.....	49
TABELLA 3: Frequenze alleliche e distribuzione genotipica dei pazienti e dei controlli .....	50
BIBLIOGRAFIA .....	51

## INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

1,25[OH] <sub>2</sub> D	1,25-diidrossivitamina D
24,25[OH] <sub>2</sub> D	24,25-diidrossivitamina D
24hSBP	Pressione arteriosa sistolica delle 24 ore
25[OH]D	25-idrossivitamina D
ABPM	Ambulatory blood pressure monitoring
BMI	Body mass index
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
DBP	Vitamin D binding protein
eGFR	Filtrato glomerulare stimato
FGF-23	Fibroblast Growth Factor 23
HPLC	High-performance liquid chromatography
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
PCR	Polymerase chain reaction
PRA	Attività Reninica Plasmatica
PTH	Paratormone
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterone
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms
RXR	Recettore dell'acido 9-cis retinico
VDR	Vitamin D receptor
VDRE	Vitamin D Response Element
Vit D	Vitamina D

## CAPITOLO I

### INTRODUZIONE

#### I.1 Introduzione

E' noto che l'insufficienza renale cronica è caratterizzata da alterazioni del metabolismo calcio-fosforo, strettamente connesse all'iperparatiroidismo secondario ed al deficit di vitamina D che lo induce. È altresì noto che tali alterazioni sono correlate con l'aumentata morbilità e mortalità cardiovascolare dei soggetti nefropatici.

La principale fonte di Vit D è costituita nell'uomo dall'esposizione cutanea alla luce solare <sup>1</sup>, mentre solo poche fonti alimentari naturali contengono quantità significative di tale ormone.

Il migliore indicatore dello status di Vit D è il metabolita 25-idrossivitamina D (25[OH]D). Fattori influenzanti i suoi livelli sono l'età, il tempo di esposizione ai raggi solari, la latitudine geografica, il colore della pelle e l'uso di protezione solare.

I livelli ottimali di 25[OH]D non sono stati definiti con esattezza. Molti suggeriscono

che valori di 30 ng/ml possano essere considerati sufficienti, che livelli di 21-29 ng/ml siano insufficienti e che concentrazioni al di sotto di 20 ng/dl definiscano, invece, un vero e proprio stato deficitario <sup>2-6</sup>.

Tuttavia, l'insufficienza di vitamina D colpisce circa il 50% della popolazione mondiale. L'alta prevalenza di insufficienza di vitamina D rappresenta un problema di salute pubblica particolarmente importante, perché l'ipovitaminosi D è un fattore di rischio indipendente di mortalità nella popolazione generale. Inoltre l'ipovitaminosi D è associata ad un incrementato rischio di eventi cardiovascolari. <sup>7-8</sup>

Circa il 41% degli uomini e il 53 % delle donne negli USA hanno livelli di vitamina D inferiori a 28 ng/ml (70 nmol/l).<sup>9</sup>

## I.2 Vitamina D: Metabolismo E Funzione

Il termine vitamina D si riferisce al nome generico di un gruppo di steroidi solubili, di cui le due principali forme sono l'ergocalciferolo (vitamina D<sub>2</sub>) e il colecalciferolo (vitamina D<sub>3</sub>).

Il colecalciferolo è derivante in minima parte dal colesterolo, ma soprattutto dal 7-deidrocolesterolo presente nella cute dopo irradiazione UVB.

L' ergocalciferolo è di provenienza solo vegetale, prodotto dall'irradiazione UVB a partire dall'ergosterolo, e può essere assunto esclusivamente con la dieta.

Entrambi sono composti biologicamente inerti e vengono convertiti nella forma metabolicamente attiva (calcitriolo). Nel fegato, infatti, ergocalciferolo e colecalciferolo vengono convertiti in 25[OH]D, ad opera della 25-idrossilasi. Successivamente, a livello renale, l'1 $\alpha$ -idrossilasi permette la conversione di 25[OH]D nella forma metabolicamente attiva 1,25[OH]<sub>2</sub>D<sup>10-12</sup> (Figura 1).

Sebbene il ruolo fondamentale della vitamina D nell'omeostasi del calcio e del fosforo e nei cambiamenti scheletrici sia conosciuto da lungo tempo, il ruolo extrascheletrico della vitamina D nell'uomo è stato ancora poco approfonditamente esplorato.

Esiste anche una produzione extrarenale di 1,25[OH]<sub>2</sub>D che, in questo caso, agisce per lo più come fattore autocrino/paracrino con funzioni cellulari specifiche. Recenti studi hanno, infatti, dimostrato la presenza di 1 $\alpha$ -idrossilasi in numerose cellule e

tessuti come mammella, prostata, colon, polmone, pancreas, cellule paratiroidi e monociti dove l'1,25[OH]<sub>2</sub>D svolge funzioni differenti oltre a quelle riconosciute classicamente<sup>1,13</sup>, svolge un ruolo di regolazione della secrezione ormonale, regolazione della funzione immunitaria, nella proliferazione e differenziazione cellulare.

L'attività dell'1 $\alpha$ -idrossilasi renale è regolata dall'omeostasi del calcio e dall'attività del paratormone (PTH). La restrizione dietetica di fosfato stimola, inoltre, tale attività indipendentemente dalle variazioni di PTH e calcio<sup>1,14</sup>. Tuttavia, la mancanza in vitro di un'azione diretta del fosfato su tale enzima suggerisce che questo effetto possa essere mediato da un ormone sistemico. Si presume che tale azione ormonale possa essere svolta dalle fosfatoni, una famiglia di proteine di recente identificazione, che modulano l'omeostasi del fosforo tramite regolazione del suo trasporto a livello tubulare renale, riducendo il riassorbimento di fosfato e sopprimendo la formazione di 1,25[OH]<sub>2</sub>D; la più nota è il Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23)<sup>1,15</sup>. Altro fattore che regola negativamente l'1 $\alpha$ -idrossilasi è Klotho, una proteina transmembrana beta-glucosidasi espressa nel tubulo distale del rene. Topi Klotho-null presentano elevati livelli di 1,25[OH]<sub>2</sub>D, calcio e fosfato e muoiono prematuramente per eccesso di calcificazioni ectopiche<sup>1,16</sup>.

La regolazione dell'1 $\alpha$ -idrossilasi extrarenale, invece, è differente da quella dell'enzima renale; è infatti sotto il controllo di fattori locali, ossia citochine e fattori



di crescita, che ottimizzano i livelli di  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$  necessari ad azioni autocrino/paracrine specifiche<sup>1</sup>.

I livelli di Vit D sono regolati anche dall'enzima 25-idrossivitaminad-24-idrossilasi che catabolizza sia la  $25[\text{OH}]\text{D}$  sia l' $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$  in acido calcitroico, biologicamente inattivo e solubile in acqua.

I metaboliti della Vit D sono molecole lipofile con bassa solubilità in acqua che vengono per il 99% trasportati in circolo legate a proteine plasmatiche. La più importante di queste proteine carrier è la vitamin D binding protein (DBP), che lega i metaboliti con alta affinità nell'ordine  $25[\text{OH}]\text{D} = 24,25[\text{OH}]_2\text{D} > 1,25[\text{OH}]_2\text{D}$ .  $25[\text{OH}]\text{D}$  legata alla DBP viene filtrata dal rene, captata dalle cellule dei tubuli prossimali attraverso un'endocitosi megalina-mediata e idrossilata dall'1 alfa-idrossilasi; la DBP viene successivamente degradata.

I complessi DBP-metaboliti hanno accesso limitato alle cellule bersaglio e l'attività biologica della Vit D è legata alla concentrazione di ormone libero. Topi DBP null, infatti, nonostante abbiano bassi livelli di  $25[\text{OH}]\text{D}$  e  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$ , non presentano rachitismo. Questa costituisce un'ulteriore dimostrazione del fatto che sia proprio la piccola quota libera di Vit D ad espletare i suoi effetti biologici. DBP svolge, quindi, un compito fondamentale nel tamponare i livelli liberi dei composti attivi della Vit D impedendo, in questo modo, un'eventuale intossicazione<sup>17</sup>.

L'1,25[OH]<sub>2</sub>D favorisce il riassorbimento di calcio a livello renale, l'assorbimento intestinale di fosforo e calcio ed i processi di mineralizzazione dell'osso (Figura 1). Ciò è fondamentale sia per la normale fisiologia cellulare, che per il mantenimento dell'integrità scheletrica. Nel piccolo intestino favorisce l'assorbimento di calcio, tramite la regolazione dell'espressione dei canali TRPV6 e TRPV5 e di Calbindina, e aumenta il trasporto di fosfato stimolando l'espressione del cotrasportatore sodio-fosfato. L'1,25[OH]<sub>2</sub>D regola, inoltre, la risposta delle ghiandole paratiroidi alle concentrazioni dello ione calcio inibendo la sintesi di PTH. A livello renale inibisce l'1 $\alpha$ -idrossilasi, stimola la 24-idrossilasi, aumenta il riassorbimento di calcio, favorisce l'espressione di calbindina e accelera il trasporto di calcio PTH dipendente nel tubulo distale <sup>1,18</sup>.

La vitamina D espleta le sue attività biologiche attraverso il legame con il recettore nucleare VDR, che agisce come un fattore di trascrizione nucleare. Dopo essere stato attivato, infatti, tale recettore forma un complesso eterodimerico con il recettore dell'acido 9-cis retinico (RXR). Il complesso vitamina D-VDR-RXR si lega a una regione specifica del DNA, un sito di riconoscimento sul promotore di un gene bersaglio, chiamato elemento di risposta alla vitamina D o VDRE (Vitamin D Response Element). Al complesso vitamina D-VDR-RXR si associano, inoltre, proteine accessorie dette coregolatori, la cui funzione consiste nel facilitare (coattivatori) o nel bloccare (corepressori) il legame con il complesso di inizio della

trascrizione. Il VDR eterodimerizzato può infatti assumere due diverse conformazioni, che permettono l'esposizione di un sito di legame o per il corepressore o per il coattivatore; di conseguenza la Vit D sarà in grado di inibire o attivare la trascrizione.

L'ampia distribuzione del VDR a livello tissutale suggerisce che la Vit D possa avere ruoli fisiologici aggiuntivi. Recettori VDR, infatti, sono stati identificati oltre che nel tessuto osseo, nelle cellule tubulari renali e nelle paratiroidi, anche nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce e in quelle del sistema immunitario<sup>19-20</sup>.

Sono pertanto emerse ulteriori azioni della Vit D, non note in precedenza, tra cui la regolazione della proliferazione/differenziazione cellulare, la modulazione del sistema immunitario, il mantenimento della funzionalità delle cellule  $\beta$  pancreatiche e l'influenza sulla contrattilità del miocardio (Figura 2).

### I.3 Vitamina D e Sistema Cardiovascolare

È stato dimostrato come pazienti con bassi livelli di 25[OH]D abbiano un rischio più elevato di sviluppare malattie cardiovascolari rispetto alla popolazione generale<sup>21</sup>.

La carenza di Vit D è stata, infatti, associata all'ipertensione arteriosa, all'ipertrofia cardiaca e alla malattia coronarica<sup>22</sup>.

Diversi studi sono stati condotti a riguardo.

Verdoia et al hanno dimostrato come valori di 25[OH]D inferiori a 10 ng/ml siano associati ad una maggiore prevalenza ed estensione di malattia coronarica<sup>23</sup>.

Wang e collaboratori, invece, analizzando 1.739 partecipanti del Framingham Offspring Study, hanno osservato una maggiore incidenza di malattia cardiovascolare nei soggetti con livelli di 25[OH]D inferiori a 15 ng/ml<sup>21</sup>.

È stata, inoltre, rilevata un'associazione indipendente fra basse concentrazioni di 25[OH]D e mortalità cardiovascolare e da tutte le cause<sup>8-24</sup>.

Negli ultimi 20 anni, sono stati condotti numerosi studi trasversali e alcuni studi prospettici nel tentativo di mettere in relazione Vit D e pressione arteriosa<sup>25-28</sup>. Su 12.000 soggetti del National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES

III) è stata osservata una significativa e inversa correlazione tra 25[OH]D e pressione arteriosa <sup>26</sup>.

Anche una meta-analisi di Burgaz, comprendente 18 studi, ha confermato l'esistenza di tale relazione <sup>27</sup>.

Sebbene la maggior parte degli studi supportino l'associazione fra livelli plasmatici di 25[OH]D ed ipertensione, altre indagini condotte a riguardo sono in contraddizione con tale ipotesi.

Snijder et al, ad esempio, analizzando i partecipanti del Longitudinal Aging Study in Amsterdam, hanno mostrato come la pressione arteriosa non sia inversamente associata ai livelli sierici di 25[OH]D, ma positivamente correlata al PTH <sup>28</sup>.

Anche diversi trials clinici condotti allo scopo di valutare gli effetti della supplementazione di Vit D sulla pressione arteriosa non hanno mostrato risultati rilevanti <sup>29-32</sup>.

Le ragioni di questi risultati contraddittori potrebbero essere molteplici. Nello studio osservazionale di Forman, ad esempio, non si conosceva l'esatta quantità di vitamina D assunta, poiché veniva ricavata da un questionario di frequenza alimentare semiquantitativo, e la diagnosi di ipertensione era ricavata dall'anamnesi in assenza, quindi, di una misurazione diretta della pressione arteriosa <sup>32</sup>.

Oltre ai già precedentemente menzionati effetti della Vit D su proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali e funzione endoteliale, il principale meccanismo chiamato in causa per spiegare la relazione fra Vit D e pressione arteriosa è la regolazione del RAAS.

Li et al hanno mostrato come l'espressione di renina plasmatica e la produzione di angiotensina II sia notevolmente aumentata nei topi knockout per il recettore della vitamina D (VDR-null), con conseguente ipertensione e ipertrofia cardiaca. Tuttavia, i meccanismi di regolazione della sintesi di renina sodio- e volume-sensibili restano intatti in questi topi. Nei topi wild-type, invece, l'inibizione della sintesi di  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$  determina un aumento dell'espressione di renina, viceversa l'iniezione  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$  ne riduce la sintesi. In colture cellulari, inoltre,  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$  sopprime la trascrizione di renina con un meccanismo VDR-mediato <sup>33</sup>.

E' ben noto che il rischio cardiovascolare è aumentato in presenza di danno d'organo. Tra i marker di danno d'organo, lo spessore intimo-mediale carotideo (IMT) è in grado di predire lo sviluppo sia di infarto del miocardio che di stroke, indipendentemente da altri fattori di rischio. Il cut-off per un aumentato rischio cardiovascolare, proposto dalle linee guida 2007 per la gestione dell'ipertensione

arteriosa, è superiore a 0.9 mm.<sup>34-36</sup> Diversi sono stati gli studi che hanno analizzato la relazione tra IMT e 25(OH)D con alterni risultati.<sup>37-39</sup>

#### I.4 Polimorfismi del VDR E Ipertensione Arteriosa

Il VDR è codificato da un gene di grandi dimensioni (> 100 kb) situato sul cromosoma 12q12-14. Questo gene comprende due regioni promoter, otto esoni codificanti (in particolare 2-9) e sei esoni non tradotti (1a-1f).

Nella sequenza del gene sono stati identificati numerosi siti polimorfici biallelici, generalmente dovuti a una mutazione puntiforme, in cui i due alleli possono essere identici o diversi tra loro e sono in grado di modificare significativamente l'attività del recettore e la sua concentrazione nelle cellule. Questi polimorfismi possono determinare effetti cellulari diversi a causa di vari meccanismi quali una maggiore o minore trascrizione, un'alterata attività post-trascrizionale o post-trasduzionale o, ancora, cambiamenti nella struttura terziaria del prodotto genico<sup>40-43</sup>.

Ad oggi, sono stati scoperti più di sessanta polimorfismi di tale gene, ma non è stato possibile analizzarli tutti. La maggior parte sono RFLP (restriction fragment length polymorphisms) con effetti funzionali sconosciuti.

Oggi i polimorfismi più studiati sono rappresentati da CDX2, FokI, ApaI, TaqI e BsmI.

Il polimorfismo CDX2 è una transizione A-G, così denominato per la sua localizzazione nel sito di legame per un fattore di trascrizione specifico intestinale



nella regione promoter 1e. L'allele A risulta essere più attivo dell'allele G in quanto associato ad una maggiore trascrizione genica e si pensa possa essere associato indirettamente ad una maggiore densità ossea, verosimilmente per una maggiore espressione del VDR a livello intestinale e conseguentemente un maggior assorbimento di calcio.

Il polimorfismo FokI è una transizione T-C che altera il codone di inizio e modifica la lunghezza della proteina VDR. L'allele f modifica un codone ACG che si trova dieci coppie di basi a monte del codone di inizio provocando la generazione di un codone di inizio supplementare. Se la trascrizione parte da questo sito alternativo viene prodotta una lunga proteina VDR costituita da 427 aminoacidi che avrà una minore attività trascrizionale. L'allele F, invece, interrompe il codone d'inizio, generando una proteina recettoriale con tre aminoacidi in meno; il risultato è un fattore di trascrizione più attivo.

Gli altri tre polimorfismi ApaI, TaqI e BsmI, a singolo nucleotide, sono RFLPs e mostrano un forte linkage disequilibrium tra loro e con altri polimorfismi del 3' terminale.

TaqI è localizzato nell'esone 9 del gene VDR, a livello del codone 352. In base alla presenza o assenza di un sito di restrizione i prodotti vengono digeriti in due frammenti di 495 e 245 bp (allele T: assenza del sito di restrizione) o tre frammenti di

290, 245 e 205 bp (allele t: presenza del sito di restrizione); il genotipo omozigote dominante (TT) sembrerebbe essere associato alla diminuzione dei livelli circolanti di vitamina D3.

Apal e BsmI sono situati nell'introne 8 al 3' terminal del gene. Questi ultimi pur non cambiando la sequenza amminoacidica della proteina codificata, possono influenzarne l'espressione genica attraverso la regolazione della stabilità dell'mRNA <sup>44-45</sup>.

Storicamente i primi studi condotti sui polimorfismi del VDR avevano come oggetto la loro relazione con l'osteoporosi <sup>42,46</sup>. Successivamente è andato crescendo l'interesse sulle possibili associazioni esistenti con altre patologie, tra cui malattie neoplastiche, del sistema immunitario, metaboliche e cardiovascolari <sup>47-52</sup>. I polimorfismi che sembrerebbero essere maggiormente associati alle patologie cardiovascolari sono FokI e BsmI.

Analizzando il polimorfismo BsmI in uno studio longitudinale condotto su 182 emodializzati e 175 controlli, l'allele B è risultato fortemente e indipendentemente correlato all'ipertrofia ventricolare sinistra e ad un tasso più elevato di progressione della stessa <sup>53</sup>. Tali dati sono stati confermati anche da un successivo studio condotto da El-Shehaby, il quale ha osservato una correlazione positiva fra il numero di alleli B e l'indice di massa ventricolare sinistra <sup>54</sup>.

La relazione tra polimorfismi del VDR e malattie cardiovascolari è ulteriormente sostenuta dall'associazione che è stata riscontrata tra FokI e la formazione di circoli collaterali in pazienti affetti da malattia coronarica <sup>55</sup>.

Contrastanti risultano invece i dati di Ortlepp, il quale non ha osservato alcuna relazione fra polimorfismo BsmI e prevalenza e severità della malattia coronarica in 3441 soggetti sottoposti a coronarografia <sup>56</sup>; tuttavia in uno studio successivo da lui stesso condotto è emersa una significativa associazione fra il genotipo BB e l'infarto del miocardio <sup>57</sup>.

Negli ultimi anni alcuni studi hanno cercato di analizzare la possibile relazione esistente tra ipertensione e polimorfismi.

In uno studio prospettico condotto su 1.211 uomini apparentemente sani genotipizzati per BsmI o FokI, in follow-up per circa 15 anni, Wang L et al hanno osservato come gli individui con genotipo BsmI BB o Bb e quelli con genotipo FokI ff abbiano un maggiore rischio di sviluppare ipertensione, rispetto ai soggetti BsmI bb e quelli FokI FF e Ff <sup>58</sup>. Muray, invece, ha riscontrato valori di pressione arteriosa sistolica più elevati in uomini apparentemente sani BsmI bb, rispetto a quelli con un differente genotipo <sup>59</sup>.

È stata dimostrata anche un'associazione fra il genotipo FokI FF e il rischio di sviluppare ipertensione arteriosa essenziale <sup>60</sup>.

Tale relazione potrebbe essere fisiopatologicamente spiegata dall'azione regolatoria sull'attività reninica svolta dal complesso Vitamina D-VDR. È stata infatti dimostrata un'associazione fra FokI e Attività Reninica Plasmatica (PRA) indipendente dai livelli di 25[OH]D <sup>61</sup>

Nonostante i risultati di questi studi sembrano sostenere l'esistenza di un'associazione fra i polimorfismi del VDR FokI e BsmI e l'ipertensione arteriosa, esistono anche dati contrastanti <sup>62</sup>.

## **CAPITOLO II**

### **SCOPO DELLO STUDIO**

#### **II.1 Scopo dello Studio**

Scopo dello studio è stato quello di valutare le eventuali interazioni tra la vitamina D e i polimorfismi del gene del recettore della vitamina D con l'ipertensione arteriosa ed il danno d'organo ad essa secondario.

### MATERIALI E METODI

#### III.1 Materiali E Metodi

In 71 pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale di età compresa fra i 18 ed i 75 anni, afferenti alla nostra U.O. di Nefrologia ed Ipertensione, abbiamo valutato pressione arteriosa clinica e ambulatoria delle 24 ore, esami ematochimici di routine, livelli plasmatici di 25[OH]D, Attività Reninica Plasmatica, biomarcatori endoteliali e infiammatori (ICAM-1, VCAM-1, Endotelina-1, hs-PCR, TNF-alfa, IL-6, Fetuina A).

I pazienti sono stati sottoposti a valutazione strumentale del danno d'organo vascolare ( Eco-color-doppler dei tronchi sovra-aortici con valutazione dello spessore intimo-mediale carotideo).

Abbiamo, inoltre, analizzato i polimorfismi del VDR FokI e BsmI e li abbiamo comparati con quelli di 72 controlli sani, donatori di sangue, di eguale sesso e età e appartenenti alla stessa area geografica.

Sono stati esclusi i pazienti con ipertensione arteriosa secondaria o maligna, diabete o iperglicemia a digiuno, scompenso cardiaco, storia o segni clinici di cardiopatia ischemica, malattia cerebrovascolare, malattia renale cronica, patologie non cardiovascolari maggiori.

Tutti i pazienti trattati farmacologicamente con antiipertensivi sono stati sottoposti a wash-out farmacologico due settimane prima dell'inizio dello studio.

Il giorno dello studio i pazienti sono stati sottoposti ad esame obiettivo generale e a misurazione dei parametri antropometrici e della pressione arteriosa clinica, ottenuta come media di tre valutazioni effettuate a distanza di 1 minuto una dall'altra, dopo un periodo di riposo di almeno 5 minuti in posizione seduta.

Il monitoraggio della pressione arteriosa delle 24 ore (ABPM) è stato effettuato usando un dispositivo portatile non invasivo (SpaceLabs 90207 recorder, Redmond, WA). Sono state considerate solo le registrazioni con un numero di misurazioni valide maggiore del 80%.

I soggetti erano istruiti ad attenersi ad una dieta contenente 130-140 mmol/die di sodio e 40-50 mmol/die di potassio.

Dopo un digiuno di almeno 10 ore ed in posizione supina è stato raccolto il campione ematico necessario per esami ematochimici di routine, dosaggio di 25[OH]D e PRA e tipizzazione genetica.

I parametri bioumorali sono stati determinati con tecniche standard, utilizzando un auto-analizzatore (Hitachi system 911; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

Le molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1), Endotelina-1, hs-PCR, TNF-alfa sono state analizzate con metodica ELISA.

Il filtrato glomerulare è stato stimato sia con l'equazione CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) che con l'equazione MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) semplificata.

La PRA è stata determinata come angiotensin-I generation rate ed espressa come nanogrammi di angiotensina-I formata per millilitro di plasma per ora di incubazione (ng/mL/h). È stata misurata mediante RIA con un kit disponibile in commercio (RENCTK for the former), comprato dalla Sorin Biomedica Diagnostics (Saluggia, Italy).

I livelli plasmatici di 25[OH]D sono stati dosati mediante metodica HPLC (high-performance liquid chromatography), usando il kit Vitamina D3-D2 (25-OH)-Chromsystems (Diagnostics by HPLC) GmbH- Germany. Il dosaggio è stato eseguito con lo strumento Waters 1525 Binary HPLC Pump dotato di un rivelatore UV-visibile e di una valvola ad iniezione dal volume di 50 µl. Le condizioni sperimentali della separazione cromatografica sono state le seguenti: colonna



analitica C18 , temperatura della colonna (25°C), velocità di flusso di 0.7 ml/min, lunghezza d'onda 265 nm e volume di iniezione del campione di 50 µl. Le separazioni cromatografiche sono state eseguite con un'eluizione isocratica e l'analisi cromatografica ha richiesto circa 12 minuti con tempi di ritenzione rispettivamente di 4,2 minuti per la 25[OH]D3 e 4,6 minuti per la 25[OH]D2.

I polimorfismi del gene VDR, FokI e BsmI, sono stati analizzati mediante PCR-RFLP (polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism). Il DNA è stato estratto da sangue periferico usando un kit commerciale (QIAamp DNA Blood-Qiagen Gmb). Le amplificazioni del DNA sono state effettuate su un termociclatore. Dopo l'amplificazione, i polimorfismi sono stati tipizzati mediante digestione enzimatica tramite endonucleasi di restrizione. I campioni digeriti sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

La valutazione ultrasonografica vascolare è stata effettuata con ecografo GE Logiq P5 PRO (General Electric Company, Milano, Italia) utilizzando per le misurazioni una sonda 10 MHz, operando per l'analisi doppler una sonda 5 MHz.

L'esame eco-color-doppler TSA viene eseguito con il paziente sdraiato supino, con il collo esteso ruotato a destra e poi a sinistra. Viene inizialmente analizzata la carotide comune dall'origine alla biforcazione, prima in sezione trasversale e

successivamente longitudinale. In B-mode vengono rilevate eventuali placche e viene misurato lo spessore medio-intimale. La misurazione viene effettuata, a livello della carotide comune ad 1 cm dalla biforcazione, a livello della biforcazione e della carotide interna, valutando la parete distale. Per ciascun segmento l'immagine ultrasonografica viene fissata in più di una direzione; vengono effettuate multiple misurazioni e si considera l'IMT maggiore e la media degli IMT esaminati a livello dei diversi segmenti. Lo IMT medio è considerato anormale quando è superiore a 0.9 mm.

## III.2 Statistica

L'analisi statistica è stata condotta usando SYSTAT DATA software package, version 13 (Systat, San Jose, CA).

La distribuzione normale delle variabili continue è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Una distribuzione non gaussiana è stata osservata per tutte le variabili esaminate. Per questa ragione abbiamo analizzato questi dati utilizzando test non parametrici.

Le variabili continue sono rappresentate come mediana e range interquartile.

Le differenze fra i gruppi sono state valutate usando il test di Kruskal Wallis e il test di Mann-Whitney.

Abbiamo esaminato le associazioni univariate tra 25[OH]D e pressione arteriosa clinica e ambulatoria e tra questi parametri e altre variabili usando i coefficienti di correlazione di Pearson. L'analisi di regressione multipla stepwise backward è stata usata per valutare i correlati indipendenti della pressione arteriosa sistolica delle 24 ore (24hSBP), considerando la 24hSBP come variabile dipendente, e 25[OH]D, età, sesso, body mass index (BMI) e filtrato glomerulare stimato (eGFR) come covariate. In un'altra analisi multivariata sono state prese in considerazione come covariate 25[OH]D, PRA, BMI e eGFR(MDRD).

Abbiamo ricercato eventuali associazioni fra un particolare genotipo o un determinato allele e l'ipertensione arteriosa e lo IMT mediante il test del chi-quadro. Lo stesso test è stato usato per la valutazione del Hardy-Weinberg equilibrium.

Una  $P < 0.05$  è stata considerata statisticamente significativa.

## CAPITOLO IV

### RISULTATI

Le caratteristiche demografiche e cliniche degli ipertesi essenziali in studio sono presentate nella tabella 1.

È da notare come i livelli mediani di 25[OH]D siano inferiori a 30 ng/ml (valore considerato come cut off), nonostante normali valori mediani di filtrato glomerulare e una buona esposizione solare dei pazienti, favorita dall'area geografica di appartenenza.

La tabella 2 mostra le correlazioni univariate tra 25[OH]D e pressione arteriosa clinica e ambulatoria delle 24 ore. Abbiamo osservato una correlazione negativa statisticamente significativa tra 25[OH]D e 24hSBP ( $r=-0,277$ ,  $p=0,043$ ) (Figura 3).

Tale correlazione persisteva all'analisi di regressione multipla stepwise, considerando la 24hSBP come variabile dipendente ( $\beta=-0,337$ ;  $p=0,022$ ) ed includendo nel modello statistico 25[OH]D, età, genere, BMI e eGFR(MDRD). BMI ( $\beta=0,290$ ;  $p=0,037$ ) e eGFR(MDRD) ( $\beta=-0,301$ ;  $p=0,038$ ) erano correlati indipendentemente alla 24hSBP.

La correlazione tra 25[OH]D e 24hSBP persisteva anche quando le covariate considerate all'analisi multivariata erano PRA, BMI e eGFR(MDRD).

Non abbiamo osservato correlazione statisticamente significativa fra i valori di 25[OH]D e PRA ( $r=0,192$ ,  $p=0,173$ ).

Nessuna associazione è stata evidenziata tra i ridotti livelli di vitamina D e i biomarcatori di disfunzione endoteliale e il danno d'organo legato all'ipertensione arteriosa.

Successivamente, gli ipertesi essenziali sono stati raggruppati secondo il genotipo VDR e sono stati comparati i parametri antropometrici, clinici e bioumorali dei differenti gruppi (tabella 3).

Non vi erano differenze di età, genere, BMI, eGFR, calcio, fosforo, 25[OH]D, paratormone, pressione arteriosa ambulatoria delle 24 ore e pressione arteriosa clinica sistolica, media e differenziale fra i pazienti con differente genotipo FokI.

Abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa solo tra i valori di pressione arteriosa diastolica clinica dei soggetti con differente genotipo FokI ( $p=0.018$ ). In particolare, abbiamo evidenziato valori di pressione arteriosa diastolica clinica maggiori nei pazienti con genotipo ff rispetto ai soggetti con genotipo Ff ( $p=0.002$ ) (Figura 4).

Non abbiamo riscontrato differenze di età, genere, BMI, eGFR, calcio, fosforo, 25[OH]D, paratormone, pressione arteriosa clinica e delle 24 ore fra i pazienti con differente genotipo BsmI.

Quando l'analisi di correlazione esplorata nell'intera popolazione è stata applicata nei sottogruppi con differente genotipo FokI e BsmI, abbiamo osservato correlazioni inverse e statisticamente significative fra 25[OH]D e pressione differenziale delle 24 ore nei pazienti con genotipo FokI Ff ( $r = -0,474$ ,  $p = 0,035$ ) (Figura 5) e fra 25[OH]D e pressione sistolica delle 24 ore nei pazienti con genotipo BsmI Bb ( $r = -0,397$ ,  $p = 0,020$ ) (Figura 6).

Abbiamo, inoltre, comparato le frequenze alleliche e la distribuzione genotipica dei 71 pazienti e dei 72 controlli (tabella 3). I genotipi FokI e BsmI erano in Hardy Weinberg equilibrium. Non abbiamo individuato alcuna associazione fra un particolare genotipo o un determinato allele e l'ipertensione arteriosa. Non abbiamo riscontrato inoltre associazioni fra polimorfismi e PRA.

Non sono state riscontrate differenze di IMT tra i pazienti con diverso genotipo FokI, né tra i pazienti con diverso genotipo BsmI (figura 7). I valori mediani di IMT erano 0.885 mm per i soggetti FF, 0.8 mm per i soggetti Ff e 0.9 per i soggetti con genotipo ff. Tenendo conto del polimorfismo BsmI, i valori mediani di IMT sono stati 0.775 mm per il genotipo BB, 0.95 mm per i soggetti con genotipo Bb e 0.825

mm per gli individui bb. Il test chi-quadro non ha mostrato alcuna associazione tra uno specifico genotipo o allele e IMT superiore a 0.9 mm.



## CAPITOLO V

### DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio mostrano come negli ipertesi essenziali i polimorfismi del VDR FokI e BsmI non siano associati né allo stato ipertensivo, né alla PRA, né allo IMT, espressione di danno d'organo vascolare, nonostante bassi livelli di 25[OH]D che correlano inversamente con la 24hSBP.

Infatti, in 71 pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale abbiamo osservato una correlazione negativa statisticamente significativa tra 25[OH]D e 24hSBP, indipendente da età, genere, BMI, eGFR e PRA.

I nostri risultati sono in parte in linea con quelli di più ampi studi osservazionali che hanno valutato la relazione fra 25[OH]D e pressione arteriosa.

Scragg, infatti, esaminando 12.644 soggetti del NHANES III non trattati con antipertensivi, ha evidenziato valori di pressione arteriosa sistolica di 3 mmHg più bassi nel quintile di 25[OH]D più alto (maggiore di 85.7 nmol/l) rispetto al quintile più basso<sup>26</sup>.

Forman e collaboratori, invece, hanno esaminato la relazione tra concentrazione di 25[OH]D e incidenza di ipertensione arteriosa su 1198 donne del Nurses' Health Study e 613 uomini del Health Professionals' Follow-Up Study senza storia di ipertensione arteriosa. Il rischio relativo di incidenza di ipertensione era rispettivamente 6,13 per gli uomini e 2,67 per le donne con concentrazioni di 25[OH]D inferiori a 15 ng/ml rispetto a quelli con concentrazioni superiori a 30ng/ml<sup>63</sup>. Lo stesso autore ha inoltre condotto uno studio caso-controllo su 1484 donne, osservando come i livelli plasmatici di 25[OH]D fossero inversamente e indipendentemente associati al rischio di sviluppare ipertensione arteriosa<sup>64</sup>.

In contrasto con tali dati, in altri studi la relazione tra 25[OH]D e pressione arteriosa non è stata osservata<sup>28,65-66</sup>. Tuttavia, la maggior parte di essi erano caratterizzati da piccoli campioni di popolazione. Inoltre, è da sottolineare come solo una scarsa percentuale di soggetti avesse un deficit di Vit D<sup>28</sup>.

Vari sono i meccanismi ipotizzati per spiegare la relazione fra 25[OH]D e pressione arteriosa, tra cui un'azione regolatoria su citochine proinfiammatorie, un effetto diretto sulla parete vascolare e un'upregulation del sistema renina-angiotensina-aldosterone, quest'ultima riportata in diversi studi effettuati su topi knockout per il recettore della vitamina D (VDR)<sup>33</sup>.

Nella nostra coorte di pazienti ipertesi essenziali i livelli medi di 25(OH)D erano inferiori a 30 ng/mL. Questo è stato un risultato inaspettato, considerando il fatto che questi pazienti vivono in Sicilia, dove l'esposizione al sole è favorita dal clima mediterraneo. È da sottolineare, inoltre, che il valore medio di eGFR in questi soggetti è risultato nella norma.

È stato ipotizzato che la Vit D possa essere un regolatore dell'espressione di renina in vivo anche negli esseri umani <sup>67</sup>. Nel gruppo di pazienti ipertesi abbiamo riscontrato bassi valori di PRA e non abbiamo osservato alcuna relazione fra 25[OH]D e PRA.

Sebbene la regolazione del RAAS da parte dell'1,25[OH]<sub>2</sub>D sia stato dimostrato in vitro e nei topi<sup>33</sup>, i dati sugli umani sono scarsi e contraddittori.

Alcuni anni fa, Resnick et al hanno osservato una relazione continua tra calcitriolo e PRA in 51 ipertesi essenziali <sup>67</sup>.

In 184 individui normotesi, Forman ha trovato livelli di PRA più alti tra i soggetti con insufficienza e deficit di 25[OH]D; tuttavia, l'associazione non era statisticamente significativa <sup>68</sup>.

Questo è in linea con i nostri risultati e potrebbe essere dovuto al fatto che i meccanismi di regolazione cellulari e tissutali del RAAS da parte della Vit D non rispecchiano i fenomeni sistemici.

È stato riportato in diversi studi che il deficit di 25(OH)D è associato non solo all'ipertensione arteriosa, ma anche al danno d'organo vascolare, come la malattia coronarica o l'insufficienza cardiaca, l'ipertrofia cardiaca, la rigidità arteriosa, lo IMT carotideo e la microalbuminuria<sup>69-72</sup>.

Nel presente studio non abbiamo osservato alcuna relazione statisticamente significativa tra 25(OH)D e IMT carotideo. Questo risultato è in linea con quanto riportato da Pludosky, in un piccolo gruppo di soggetti ipertesi essenziali nei quali le concentrazioni di 25(OH)D non differivano quando erano stati controllati per gravità dell'ipertensione, massa ventricolare sinistra e IMT carotideo<sup>73</sup>.

Inoltre, nel Lupus Atherosclerosis Prevention Study la 25(OH)D non era né associata né in grado di predire la progressione dell'IMT carotideo<sup>74</sup>.

Al contrario, Targher e collaboratori hanno riscontrato un'associazione indipendente tra concentrazioni di 25(OH)D e IMT a livello della carotide comune in 390 soggetti con diabete mellito tipo 2<sup>75</sup>.

Negli ultimi anni sono stati individuati diversi polimorfismi del gene che codifica per il recettore della vitamina D (VDR) ed è emersa l'esistenza di possibili relazioni fra essi e la malattia cardiovascolare, incluso l'effetto diretto sulla parete vascolare. Ciò può essere plausibile, considerando che i recettori per la vitamina D sono presenti nelle cellule muscolari lisce e nelle cellule endoteliali<sup>76-78</sup>.

Lo studio di Muray et al. è stato uno dei primi ad evidenziare un'influenza dei polimorfismi sui valori pressori, osservando valori di pressione arteriosa sistolica più elevati in uomini apparentemente sani con genotipo BsmI bb, rispetto a quelli con un differente genotipo. Tuttavia, nelle donne sane i genotipi non erano associati alla pressione arteriosa <sup>59</sup>.

Un altro polimorfismo chiamato in causa è il FokI, analizzato da Swapna et al., i quali hanno comparato 280 ipertesi e 200 controlli sani e hanno osservato un'associazione fra il genotipo FF e il rischio di sviluppare ipertensione arteriosa essenziale <sup>60</sup>.

L'esistenza di una relazione fra tale malattia e i polimorfismi del VDR FokI e BsmI è risultata anche da uno studio prospettico condotto da Wang et al su una coorte di 1211 uomini, il cui follow-up è durato 15,3 anni. Gli individui con genotipo BB o Bb avevano un hazard ratio (HR) per ipertensione di 1,25, comparati con i soggetti bb; invece gli uomini con genotipo ff avevano un HR di 1,32 rispetto ai portatori di FF e Ff. Nella stessa coorte è stata osservata, inoltre un'associazione inversa fra 25[OH]D e rischio di ipertensione <sup>58</sup>.

Inoltre, un'associazione fra FokI e PRA in combinazione con i livelli di 25[OH]D è stata dimostrata negli individui ipertesi e normotesi della coorte HyperPath <sup>61</sup>.

El-Shehaby e collaboratori non hanno riportato alcuna differenza significativa nella distribuzione dei genotipi BsmI sia in 80 pazienti emodializzati che nel gruppo di controllo. È interessante notare che la frequenza dell'allele B del polimorfismo BsmI in pazienti in dialisi era simile a quella dei soggetti sani di controllo. I pazienti con genotipo BB avevano concentrazioni sieriche significativamente più basse di 25 [OH]D rispetto ai genotipi Bb e bb. L'allele B era correlato positivamente con l'indice di massa ventricolare sinistra, ma non con IMT<sup>79</sup>.

Al contrario, in 471 donne americane messicane esaminate nell'ambito del San Antonio Famiglia Osteoporosis Study, Kammerer ha mostrato un'associazione tra il genotipo BsmI BB e IMT, indipendentemente della sua associazione con la densità minerale ossea<sup>80</sup>.

E' difficile confrontare questi studi con la nostra indagine a causa della diversa etnia, numero di soggetti e caratteristiche cliniche.

I nostri risultati non confermano l'esistenza di un'associazione fra polimorfismi del VDR e ipertensione arteriosa, né tra polimorfismi del VDR e IMT, né tra 25[OH]D e PRA.

Inoltre, recentemente, uno studio di associazione genetica condotto su un'estesa popolazione di uomini e donne non ha confermato la precedentemente riportata

associazione fra polimorfismi a singolo nucleotide Vitamina D correlati e pressione arteriosa <sup>60</sup>.

Per quanto a nostra conoscenza, questo è uno dei pochi studi che analizza in modo completo la relazione tra pressione arteriosa, PRA, 25[OH]D ed i polimorfismi del VDR FokI e BsmI in pazienti ipertesi essenziali.

Secondo recenti ipotesi, bassi livelli di 25[OH]D conducono ad un up-regulation del RAAS, favorendo così l'aumento della pressione arteriosa.

Nel nostro studio, nonostante il riscontro di bassi valori di 25[OH]D negli ipertesi essenziali e di una correlazione statisticamente significativa tra 25[OH]D e 24hSBP, non abbiamo osservato alcuna correlazione tra 25[OH]D e PRA.

Tuttavia, il nostro studio presenta alcune limitazioni, quali la sua natura osservazionale, la piccola dimensione campionaria e l'indisponibilità dei valori di 25[OH]D e PRA nel gruppo di controllo.

In conclusione, sebbene alcuni studi abbiano confermato l'esistenza di una associazione tra polimorfismi del VDR e rischio di ipertensione, i risultati non sembrano essere conclusivi e ulteriori studi saranno necessari per chiarire tale relazione.

## FIGURE E TABELLE

### FIGURE

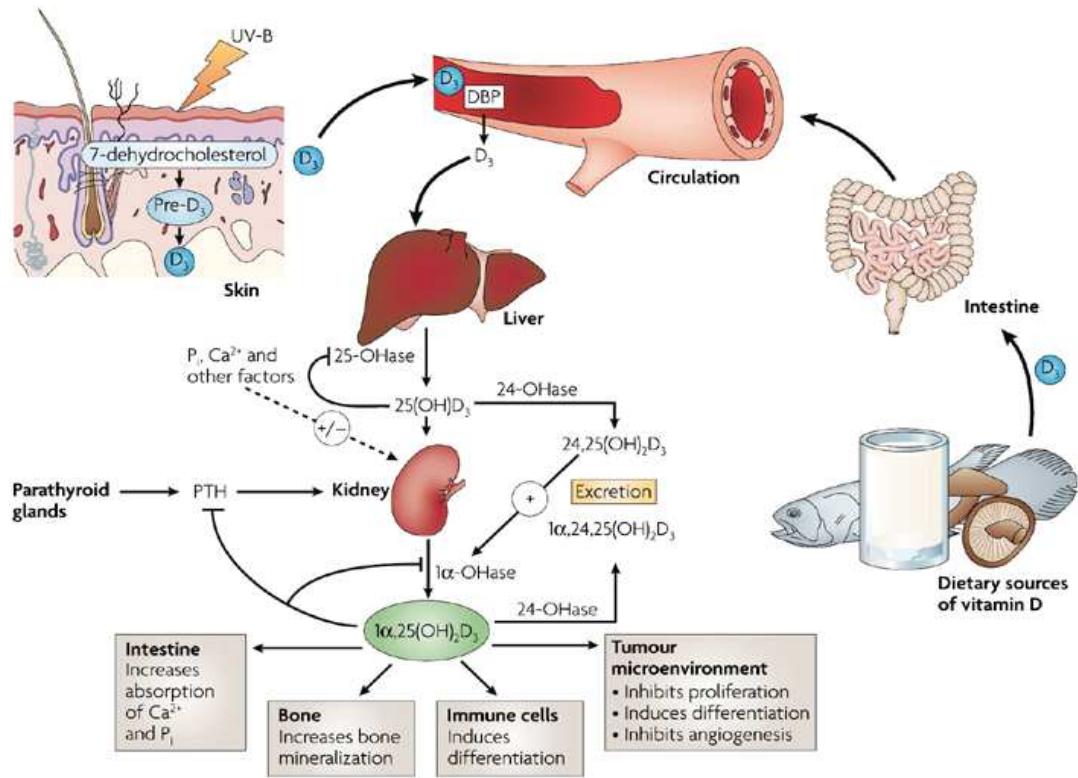
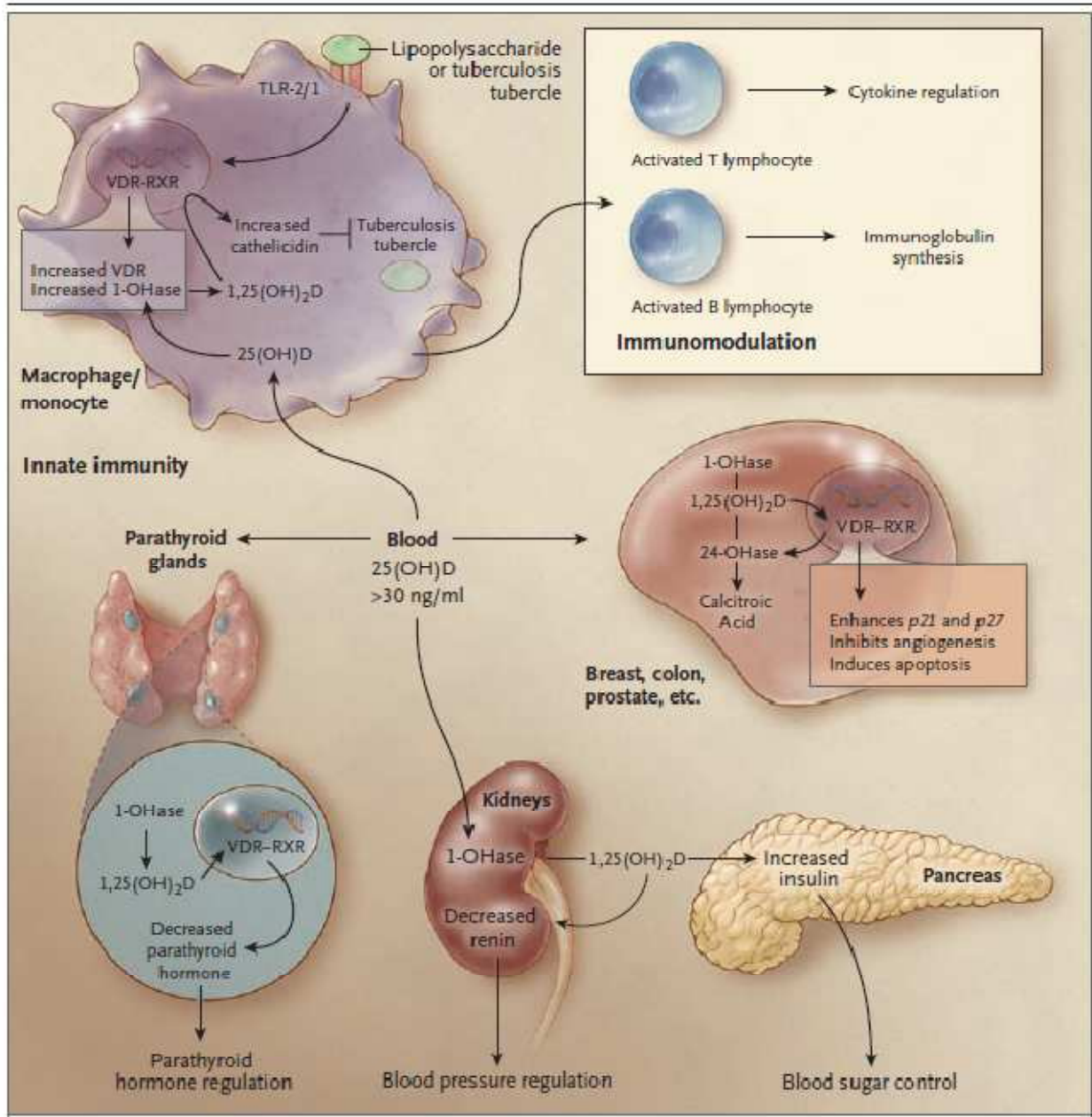
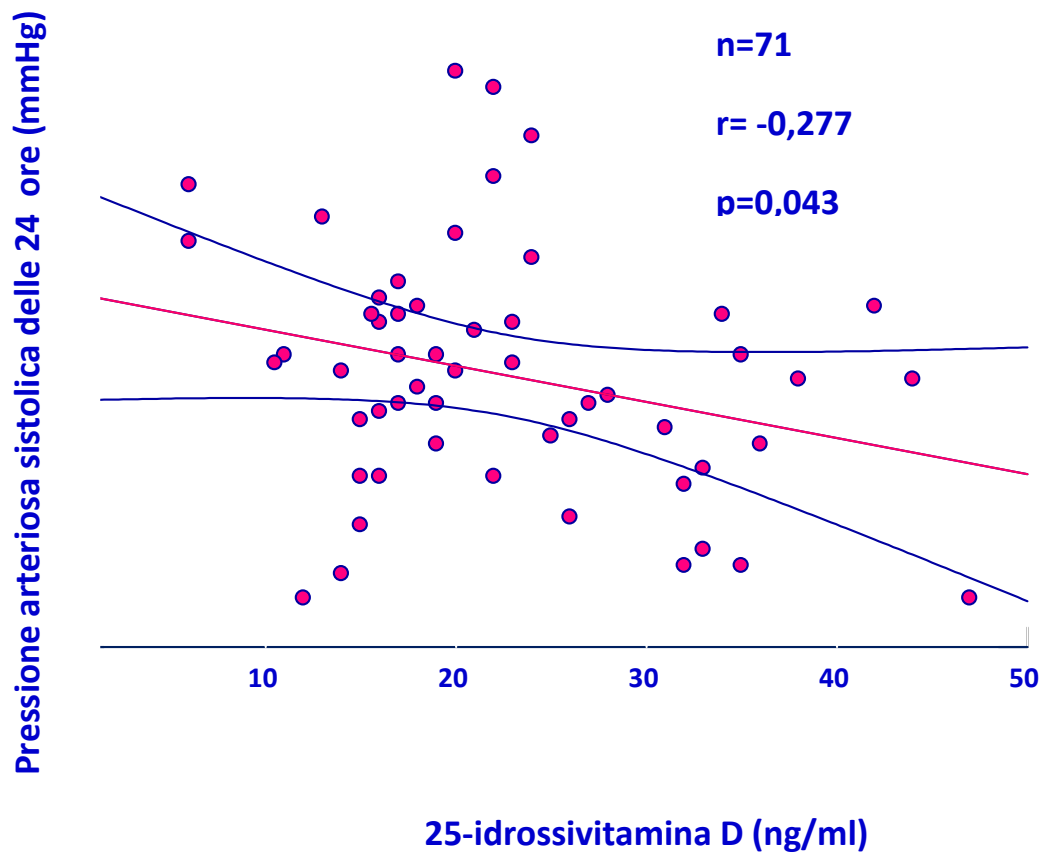


Figura 1. Metabolismo e funzioni della Vitamina D



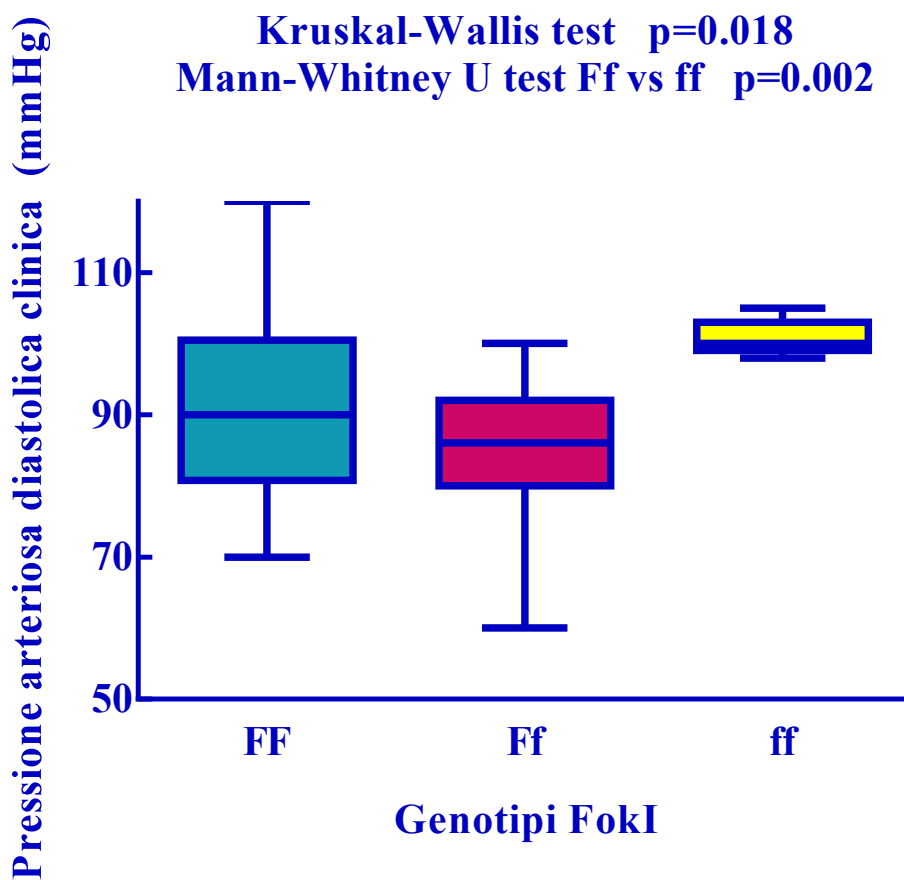


**Figura 2.** Funzioni extra-scheletriche della Vitamina D.



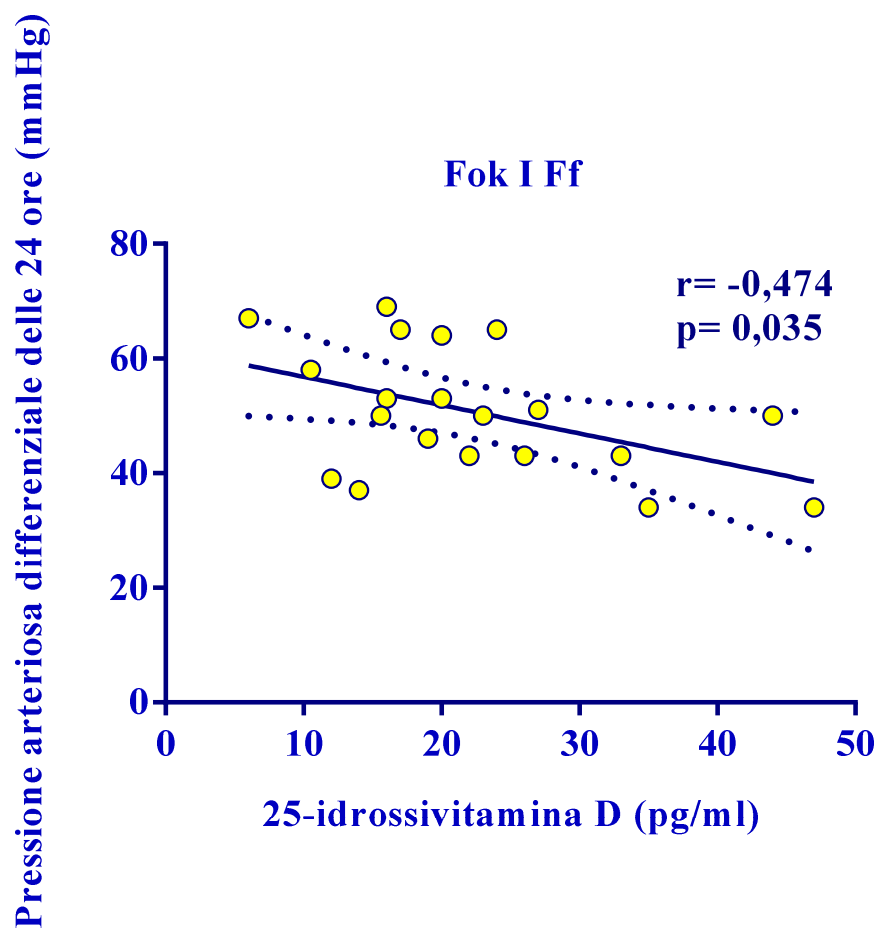
**Figura 3.** Relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa sistolica 24 ore

Il grafico mostra la relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa sistolica delle 24 ore nei pazienti ipertesi. Le linee iperboliche rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla retta di regressione.



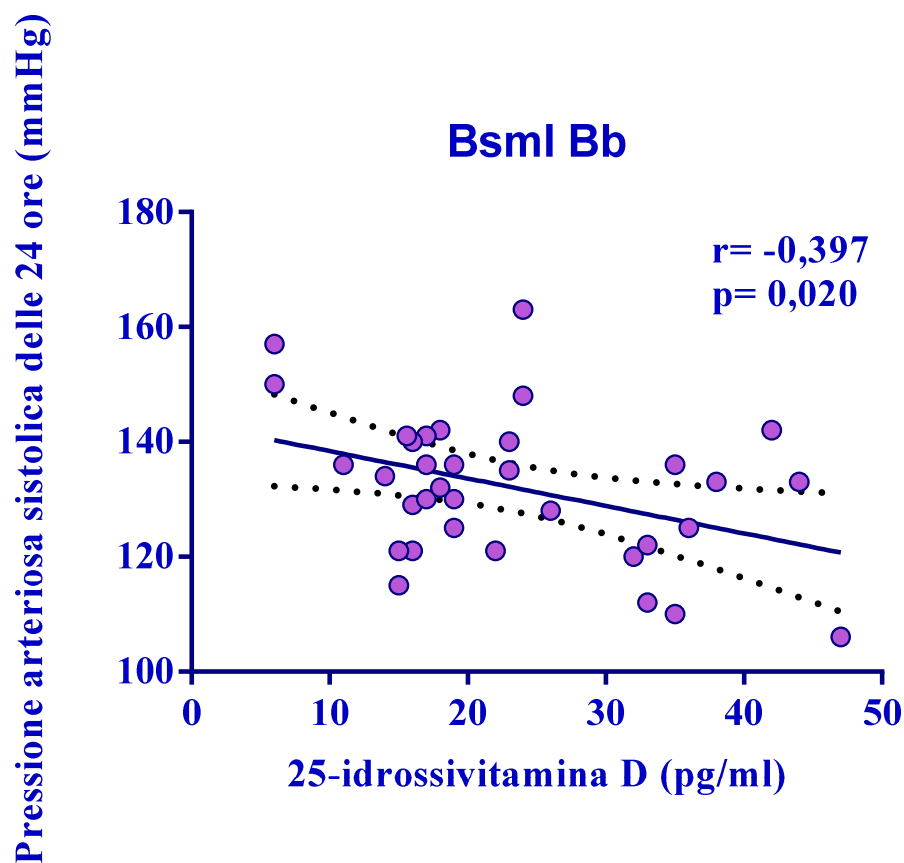
**Figura 4.** Pressione arteriosa diastolica clinica

Il Box plot mostra la pressione arteriosa diastolica clinica dei pazienti ipertesi, raggruppati secondo il genotipo FokI. Le linee centrali rappresentano le mediane, i riquadri centrali i valori dal 25° al 75° percentile, i “baffi” superiori ed inferiori rispettivamente il 95° e il 5° percentile.



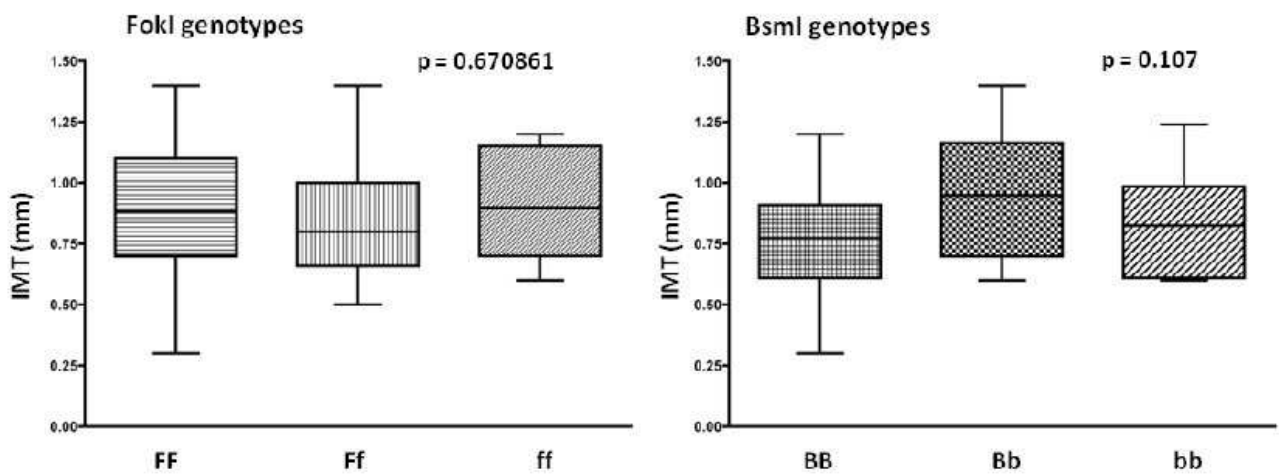
**Figura 5.** Relazione fra 25-idrossivitamin D e pressione arteriosa differenziale 24 ore

Il grafico mostra la relazione fra 25-idrossivitamin D e pressione arteriosa differenziale delle 24 ore nei pazienti con genotipo Fok I Ff. Le linee iperboliche rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla retta di regressione.



**Figura 6.** Relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa sistolica 24 ore

Il grafico mostra la relazione fra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa sistolica delle 24 ore nei pazienti con genotipo BsmI Bb. Le linee iperboliche rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla retta di regressione.



**Figura 7:** Box plot IMT

Il Box plot mostra lo spessore intimo-mediale carotideo (IMT) dei pazienti ipertesi, raggruppati secondo il genotipo FokI e BsmI.

## Tabelle

<b>TABELLA 1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti ipertesi</b>	
<b>n= 71</b>	<b>Mediana (25° e 75° percentile)</b>
<b>Età, anni</b>	45 (36-53)
<b>Sesso (Maschi), %</b>	66,2
<b>Body mass index, Kg/m<sup>2</sup></b>	28 (25-31)
<b>eGFR (CKD-EPI), ml/min/1.73m<sup>2</sup></b>	102 (80-111)
<b>eGFR (MDRD), ml/min/1.73m<sup>2</sup></b>	96 (77-109)
<b>25-idrossivitamina D, ng/mL</b>	20 (16-26)
<b>Attività Reninica Plasmatica (ng/ml/ora)</b>	0,4 (0,12-1)
<b>Paratormone pg/ml</b>	41 (29-53)
<b>Calcio, mg/dl</b>	9.4 (9,1-9,6)
<b>Fosforo, mg/dl</b>	3.3 (3-3,6)
<b>Pressione arteriosa clinica sistolica (mmHg)</b>	140 (131-155)
<b>Pressione arteriosa clinica diastolica (mmHg)</b>	90 (82-100)
<b>Pressione arteriosa clinica differenziale (mmHg)</b>	54 (45-60)
<b>Pressione arteriosa clinica media (mmHg)</b>	107 (101-117)
<b>Pressione arteriosa sistolica delle 24 ore (mmHg)</b>	133 (124-141)
<b>Pressione arteriosa diastolica delle 24 ore (mmHg)</b>	83 (74-91)
<b>Pressione arteriosa differenziale delle 24 ore (mmHg)</b>	50 (43-53)
<b>Pressione arteriosa media delle 24 ore (mmHg)</b>	100 (92-107)

<b>n= 71</b>	<b>Mediana (25° e 75° percentile)</b>
<b>ICAM (ng/ml)</b>	425 (350-585)
<b>VCAM (ng/ml)</b>	825 (717-919)
<b>ENDOTELINA-1 (pg/ml)</b>	2.1 (1,675-3)
<b>hs-PCR (mcg/l)</b>	0.605 (0,4-0,905)
<b>TNF-alfa (ng/ml)</b>	3.2 (2,8-3,4)
<b>FETUINA-A (g/l)</b>	1.2 (1-1,4)

**TABELLA 1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti ipertesi**



<b>TABELLA 2: Correlazioni univariate tra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Pressione arteriosa clinica sistolica (mmHg)</b>	-0,109	NS
<b>Pressione arteriosa clinica diastolica (mmHg)</b>	-0,045	NS
<b>Pressione arteriosa clinica differenziale (mmHg)</b>	-0,107	NS
<b>Pressione arteriosa clinica media (mmHg)</b>	-0,079	NS
<b>Pressione arteriosa sistolica delle 24 ore (mmHg)</b>	-0,277	0,043
<b>Pressione arteriosa diastolica delle 24 ore (mmHg)</b>	-0,201	NS
<b>Pressione arteriosa differenziale delle 24 ore (mmHg)</b>	-0,189	NS
<b>Pressione arteriosa media delle 24 ore (mmHg)</b>	-0,244	NS

**TABELLA 2: Correlazioni univariate tra 25-idrossivitamina D e pressione arteriosa**

<b>TABELLA 3: frequenze alleliche e distribuzione genotipica dei pazienti e dei controlli</b>		<b>Frequenza di distribuzione genotipica del VDR n (%)</b>			<b>Frequenze alleliche n (%)</b>	
<b>FokI</b>		FF	Ff	ff	F	f
	Pazienti 71 (100)	36 (50,7)	30 (42,3)	5 (7)	102 (71,8)	40 (28,2)
	Controlli 72 (100)	29 (40,3)	36 (50)	7 (9,7)	94 (65,3)	50 (34,7)
<b>BsmI</b>		BB	Bb	bb	B	b
	Patients 71 (100)	16 (22,5)	41 (57,8)	14 (19,7)	73 (51,5)	69 (48,5)
	Controls 72 (100)	15 (20,8)	38 (52,8)	19 (26,4)	68 (47,2)	76 (52,8)

**TABELLA 3: Frequenze alleliche e distribuzione genotipica dei pazienti e dei controlli**

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Dusso AS, Brown AJ and Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8–F28.
2. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 84(1):18-28.
3. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
4. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:353-73.
5. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 1998; 351:805-6.
6. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998; 338:777- 83.
7. Michal L. et al. 25-hydroxyl Vitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. *Arch Intern Med.* 2008 August 11; 168(15): 1629–1637.
8. S. Pilz et al. Vitamin D status and arterial hypertension: A systematic review. *Nature Reviews Cardiology* 6, 621-630 (October 2009).

9. Zadshir A, et al. The prevalence of hypovitaminosis D among US adults: data from the NHANES III. *Ethn Dis.* 2005 Autumn;15(4 Suppl 5):S5–97. 101.
10. De Luca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (6 Suppl):1689S–1696S.
11. Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:500S–506S.
12. Fraser DR, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 1970; 228: 764–766.
13. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 31–38.
14. Tanaka Y and Deluca HF. The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys* 1973; 154: 566–574.
15. Schiavi SC and Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int* 2004; 65: 1–14.
16. Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Endocrinology* 2002; 143: 683–689.
17. Cooke NE and Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* 1989; 10: 294–307.
18. Morris HA. Vitamin D Activities for Health Outcomes. *Ann Lab Med.* 2014;

34(3):181-6.

19. Gonzalez-Parra E, Rojas-Rivera J, Tuñón J, Praga M, Ortiz A, Egido J. Vitamin D receptor activation and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 (Supple 4): iv17–21.
20. Karen Barnard MBBCh et al Extraskelatal effects of vitamin D in older adults: Cardiovascular disease, mortality, mood, and cognition. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* Volume 8, Issue 1, February 2010, Pages 4-33
21. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K et al. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2008; 117:503-511.
22. Tamez H, Kalim S, Thadhani RI. Does vitamin D modulate blood pressure? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; 22(2):204-9.
23. Verdoia M, Schaffer A, Sartori C, Barbieri L, Casetti E, Marino P et al. Vitamin D deficiency is independently associated with the extent of coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2014; 44(7):634-42
24. Dobnig 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 Jun 23; 168(12): 1340-9
25. Ullah MI, Uwaifo GI, Nicholas WC, Koch CA. Does vitamin D deficiency cause hypertension? Current evidence from clinical studies and potential

- mechanisms. *Int J Endocrinol* 2010; 579640.
26. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Examination Survey. *Amer J Hypertens* 2007; 20: 713–719.
  27. Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, Wolk A. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta analysis. *J Hypertension* 2011; 29: 636–645.
  28. 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. *Journal of Internal Medicine*, 2007; 261: 558–565.
  29. Margolis KL, Ray RM, Van Horn L, Manson JE, Allison MA, Black HR et al. Effect of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure: the women’s health initiative randomized trial. *Hypertension* 2008; 52: 847–855
  30. Orwoll ES and Oviatt S. Relationship of mineral metabolism and long-term calcium and cholecalciferol supplementation to blood pressure in normotensive men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 52: 717–721.
  31. Scragg R, Khaw KT, Murphy S. Effect of winter oral vitamin D3 supplementation on cardiovascular risk factors in elderly adults. *European Journal of Clinical Nutrition* 1995; 49: 640–646.

32. Forman JP, Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Stampfer MJ, Curhan GC. Vitamin D intake and risk of incident hypertension: results from three large prospective cohort studies. *Hypertension* 2005; 46: 676–682.
33. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 229–238.
34. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013;31:1281-1357
35. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997;96:1432–1437.  
<http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.96.5.1432>
36. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L,

Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Kjeldsen SE, Erdine S, Narkiewicz K, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Cifkova R, Dominiczak A, Fagard R, Heagerty AM, Laurent S, Lindholm LH, Mancia G, Manolis A, Nilsson PM, Redon J, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, Viigimaa M, Filippatos G, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Kiowski W, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Viigimaa M, Waeber B, Williams B, Zamorano JL, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2007; 28(12):1462-536.

37. Reis JP, von Mühlen D, Michos ED, Miller ER 3rd, Appel LJ, Araneta MR, Barrett-Connor E. Serum vitamin D, parathyroid hormone levels, and carotid



- atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;207(2):585-90.
38. Carnevale V, Minonne R, De Matthaëis A, Annese MA, Tabacco P, D'Arcangelo P, D'Amico G, Scillitani A. Carotid intima-media thickness is not associated with vitamin D and PTH levels in patients admitted to an Internal Medicine Department. *Endocrine*. 2014 Feb 13.
39. [Carrelli AL](#), [Walker MD](#), [Lowe H](#), [McMahon DJ](#), [Rundek T](#), [Sacco RL](#), [Silverberg SJ](#). Vitamin D deficiency is associated with subclinical carotid atherosclerosis: the Northern Manhattan study. *Stroke*. 2011 Aug;42(8):2240-5.
40. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47: 561-566.
41. Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A. Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 2001; 409: 847-849.
42. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338: 143-156.
43. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F et al. Promoter and 3'-untranslated region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the Rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005; 77:807-823.
44. Lins TC, Nogueira LR, Lima RM, Gentil P, Oliveira RJ, Pereira RW. A

- multiplex single-base extension protocol for genotyping Cdx2, FokI, BsmI, ApaI, and TaqI polymorphisms of the vitamin D receptor gene; *Genetics and Molecular Research* 2007; 6 (2): 316-324.
45. Köstner K, Denzer N, Müller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The Relevance of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A Review of the Literature. *Anticancer Research* 2009; 29: 3511-3536.
46. Gross C1, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican American women. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1850-1855.
47. Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JP. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: A meta-analysis. *Cancer Epid, Biomarkers & Prev* 2003; 12: 1395-1402.
48. Berndt SI, Dodson JL, Huang WY, Nicodemus KK. A systemic review of vitamin D receptor gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Urology* 2006; 175: 1613-1623.
49. Tajouri L, Ovcaric M, Curtain R, Johnson MP, Griffiths LR, Csurhes P et al. Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *J Neurogenet.* 2005; 19(1):25-38.
50. Schuch NJ, Garcia VC, Vívoló SR, Martini LA. Relationship between

- Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *Nutr J.* 2013; 12:96.
51. Györfly B, Vásárhelyi B, Krikovszky D, Madácsy L, Tordai A, Tulassay T et al. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2002; 147(6):803-8.
52. Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG, Gautam S, Saxena M, Nayak VL et al. Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci.* 2009;63(5): 187-94.
53. Testa A, Mallamaci F, Benedetto FA, Pisano A, Tripepi G, Malatino L et al. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism Is Associated With Left Ventricular (LV) Mass and Predicts Left Ventricular Hypertrophy (LVH) Progression in End-Stage Renal Disease (ESRD) Patients. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25 (2): 313–319.
54. El-Shehaby AM, El-Khatib MM, Marzouk S, Battah AA. Relationship of BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with left ventricular hypertrophy and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013; 73(1):75-81.
55. Hossein-Nezhad A, Eshaghi SM, Maghbooli Z, Mirzaei K, Shirzad M, Curletto B et al. The role of vitamin d deficiency and vitamin d receptor genotypes on

- the degree of collateralization in patients with suspected coronary artery disease. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:304250.
56. Ortlepp JR, von Korff A, Hanrath P, Zerres K, Hoffmann R. Vitamin D receptor gene polymorphism BsmI is not associated with the prevalence and severity of CAD in a large-scale angiographic cohort of 3441 patients. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33(2):106-9.
57. Ortlepp JR, Krantz C, Kimmel M, von Korff A, Vesper K, Schmitz F et al. Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin-6 polymorphisms and cardiovascular risk factors on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years. *Int J Cardiol.* 2005; 105(1):90-5.
58. Wang L, Ma J, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM, Sesso HD. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of hypertension in men. *Eur J Nutr.* 2013; 52(7):1771-9.
59. Muray S, Parisi E, Cardús A, Craver L, Fernández E. Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently healthy subjects. *J Hypertens.* 2003; 21(11):2069-75.

60. Swapna N, Vamsi UM, Usha G, Padma T. Risk conferred by FokI polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene for essential hypertension. *Indian J Hum Genet.* 2011; 17(3): 201–206.
61. Vaidya A, Sun B, Forman JP, Hopkins PN, Brown NJ, Kolatkar NS et al. The FOK1 Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in caucasians. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011; 74(6): 783–790.
62. Wang L, Chu A, Buring JE, Ridker PM, Chasman DI, Sesso HD. Common Genetic Variations in the Vitamin D Pathway in Relation to Blood Pressure. *Am J Hypertens*;
63. 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.
64. Forman JP, Curhan GC, Taylor EN. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension* 2008; 52(5):828-32.
65. Scragg, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E. Serum 25-hydroxycolecalciferol concentration in newly detected hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1995; 8: 429-432.

66. Rueda S, Fernández-Fernández C, Romero F, Martínez de Osaba J, Vidal J. Vitamin D, PTH, and the metabolic syndrome in severely obese subjects. *Obes. Surg.* 2008; 18: 151-154.
67. Resnick LM, Müller 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.
68. Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Regulation of the Renin-Angiotensin System in Humans. *Hypertension.* 2010; 55: 1283-1288.
69. Verdoia M, Schaffer A, Sartori C, Barbieri L, Cassetti E, Marino P, Galasso G, De Luca G. Vitamin D deficiency is independently associated with the extent of coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2014 Jul;44(7):634-42.
70. Pilz S, März W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, Boehm BO, Dobnig H. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(10):3927-35.
71. Kuloğlu O, Gür M, Şeker T, Kalkan GY, Şahin DY, Tanboğa IH, Koyunsever NY, Harbaloğlu H, Türkoğlu C, Akyol S, Elbasan Z, Acele A, Caylı M. Serum

- 25-hydroxyvitamin D level is associated with arterial stiffness, left ventricle hypertrophy, and inflammation in newly diagnosed hypertension. *J Investig Med*. 2013; 61(6):989-94.
72. Cai X, Hu Z, Chen L, Han X, Ji L. Analysis of the associations between vitamin D and albuminuria or  $\beta$ -cell function in Chinese type 2 diabetes. *Biomed Res Int*. 2014;2014:640909.
73. Pludowski P, Jaworski M, Niemirska A, Litwin M, Szalecki M, Karczmarewicz E, Michalkiewicz J. Vitamin D status, body composition and hypertensive target organ damage in primary hypertension. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 144PA:180-184.
74. Kiani AN, Fang H, Magder LS, Petri M. Vitamin D deficiency does not predict progression of coronary artery calcium, carotid intima-media thickness or high-sensitivity C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2013; 52(11):2071-6.
75. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, Arcaro G. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:593–597.
76. Wang Y, Borchert ML, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int* 2012; 81: 993–1001.

77. Mitsuhashi T, Morris RC Jr, Ives HE. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1991 Jun;87(6):1889-95.
78. Merke J, Milde P, Lewicka S, Hügel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest.* 1989 Jun;83(6):1903-15.
79. El-Shehaby AM<sup>1</sup>, El-Khatib MM, Marzouk S, Battah AA. Relationship of BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with left ventricular hypertrophy and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013 Feb;73(1):75-81.
80. Kammerer CM, Dualan AA, Samollow PB, Périssé AR, Bauer RL, MacCluer JW, O'Leary DH, Mitchell BD. Bone mineral density, carotid artery intimal medial thickness, and the vitamin D receptor BsmI polymorphism in Mexican American women. *Calcif Tissue Int.* 2004 Oct;75(4):292-8.