

# ENIGMI DEL RISCHIO CARDIOVASCOLARE: OMOCISTEINA, PSORIASI ED IPOVITAMINOSI D

*C. Greco, M. E. Lombardi, P. Romano\**

Unità Operativa Complessa di Cardiologia III

Azienda Ospedaliera S. Giovanni Addolorata, Roma

\* Unità Operativa Complessa di Cardiologia, Ospedale S. Spirito, Roma.

## Whodunit?

Con il primo dei “Tre misteri” dell’americano Edgar Allan Poe, “I delitti della Via Morgue”, nasce nel 1841 il genere “giallo” detto allora in inglese “whodunit”. Il personaggio di Auguste Dupin, detective dilettante le cui enormi capacità deduttive permettono di risolvere casi criminali senza nemmeno recarsi sui luoghi dei delitti ma solo leggendone i resoconti giornalistici, è uno degli elementi di base del genere: è infatti a questo personaggio che si rifarà più tardi l’inglese Arthur Conan Doyle nel creare quello ben più famoso di Sherlock Holmes. Proveremo anche noi ad indossare quei panni per esaminare le tre problematiche proposte, relative alla prevenzione cardiovascolare, enigmatiche per aspetti contraddittori e di difficile interpretazione, con indizi nascosti o fuorvianti. La posizione dell’iperomocisteinemia, della psoriasi e dell’ipovitaminosi B nei confronti del rischio cardiovascolare è infatti, finora, risultata molto poco chiara.

## Iperomocisteinemia

L’omocisteina è un aminoacido che deriva dal metabolismo della metionina, a sua volta aminoacido essenziale derivato dalle proteine introdotte con la dieta. La prima ipotesi di un collegamento dei livelli elevati di omocisteina con le manifestazioni aterosclerotiche fu avanzata nel 1969<sup>1</sup>; da allora diversi possibili meccanismi sono stati dimostrati in modelli sperimentali: stimolazione della crescita delle cellule muscolari lisce, riduzione della crescita delle cellule endoteliali, riduzione del rilascio delle cellule endoteliali, ridotta sintesi delle HDL, promozione di una risposta autoimmune, ed accumulo di monociti infiammatori nella placca aterosclerotica<sup>2-4</sup>.

Un incremento del livello plasmatico di omocisteina può essere causato da diverse condizioni: carenze vitaminiche (le vitamine B6 e B12 e l'acido folico sono necessari per il suo metabolismo), insufficienza renale (il rene elimina infatti il 70% dell'omocisteina) ed errori genetici del metabolismo dell'aminoacido. Tra questi ultimi, il difetto di cistationin-beta-sintetasi è molto raro (1 caso su 300.000 soggetti) e porta a livelli di omocisteinemia > 100 micromoli/l, causando cardiopatie in giovane età. Il difetto di metilen-tetraidrofolato-reduttasi (MTHFR) prevede una variazione in posizione 677 del gene MTHFR, con la sostituzione della citosina con la timidina. Il 10% della popolazione è omozigote per la variazione (TT) ed il 43% eterozigote (CT) mentre il restante 47% è esente da mutazioni: gli eterozigoti hanno livelli lievemente elevati di omocisteina, mentre gli omozigoti hanno aumenti dell'ordine del 20%<sup>5</sup>.

La prevalenza dell'iperomocisteinemia è piuttosto elevata: in uno studio norvegese l'8,5% della popolazione aveva un incremento lieve (tra 15 e 29 micromoli/l) e lo 0,8% un incremento marcato (> 30 micromoli/l)<sup>6</sup>.

Le prime osservazioni circa l'aumento del rischio di eventi cardiovascolari si riferivano a pazienti con difetto della cistationin-sintetasi, livelli piuttosto elevati di omocisteina ed eventi precoci; gli studi su pazienti con mutazione del MTHFR davano invece risultati più contraddittori: mentre due metanalisi documentavano un incremento del 42% di eventi cerebrovascolari e cardiopatia ischemica nei pazienti omozigoti rispetto a quelli esenti da mutazioni<sup>7,8</sup>, altre due metanalisi non dimostravano alcun incremento del rischio cardiovascolare<sup>9,10</sup>. Nella già citata metanalisi di Wald, comunque, ogni incremento di 5 micromoli/l dell'omocisteinemia determinava un incremento del rischio di eventi tra il 20 ed il 30%.

A partire da alcuni di questi pur contraddittori rilievi si è fatta strada l'ipotesi di un effetto favorevole dei trattamenti in grado di ridurre l'omocisteinemia sugli eventi cardiovascolari: l'acido folico, le vitamine B6 e B12. Si è quindi pensato a studi di prevenzione basati sull'uso di queste sostanze, che dal 1998 erano state comunque aggiunte, negli Stati Uniti ed in Canada, come supplementi agli alimenti di largo consumo, allo scopo di ridurre l'incidenza dei difetti congeniti del tubo neurale: ciò aveva portato ad una riduzione dei livelli di omocisteina nelle popolazioni di questi paesi.

### **Studi di prevenzione primaria degli eventi cardiovascolari**

Nel campo della prevenzione primaria gli studi sono scarsi, tutti osservazionali e peraltro condotti con l'uso di diete e non di supplementi di vitamine o folati, con risultati piuttosto incerti. Anche se i primi studi avevano dato esito positivo<sup>11-13</sup> e il più recente di essi aveva confermato un effetto favorevole sulla mortalità cardiovascolare<sup>14</sup>, non vi sono elementi per concludere quale dei tre componenti della dieta conferisse il vantaggio e, soprattutto, se i supplementi di queste sostanze avrebbero lo stesso effetto delle diete ricche degli stessi componenti.

Una recente valutazione sui fattori di rischio emergenti, una Task Force dei servizi di prevenzione statunitensi, inoltre, non includeva l'iperomocisteinemia tra i fattori di rischio e non raccomandava la sua determinazione nella prevenzione primaria<sup>15,16</sup>. Ciò veniva motivato con la mancanza di aggiusta-

mento per fattori di rischio tradizionali delle popolazioni nella maggior parte degli studi effettuati e con l'assenza di evidenze sul ruolo predittivo dell'omocisteina nei pazienti a rischio intermedio per eventi cardiovascolari in base ai fattori di rischio tradizionali. La Task Force riconosceva comunque che la parte degli studi contenuta nelle metanalisi in cui era stato operato un aggiustamento per fattori di rischio di Framingham<sup>17</sup> documentava un incremento del rischio del 9% di eventi cardiovascolari per ogni incremento di 5 micromoli/l dell'omocisteinemia, ma concludeva che il rapporto con gli eventi maggiori era meno certo.

### Studi di prevenzione secondaria degli eventi cardiovascolari

Si sono pubblicati in questo campo numerosi studi randomizzati con l'uso, in uno dei due bracci, di supplementi di acido folico e vitamine del gruppo B.

Una prima metanalisi pubblicata nel 2006 comprendeva 12 studi per complessivi 16.958 pazienti con precedenti di malattia coronarica (7 studi), ictus (1 studio) o insufficienza renale avanzata (4 studi)<sup>18</sup>. Il rischio relativo di eventi nei pazienti trattati con i supplementi non veniva ridotto poiché era 0.95 (0.88-1.03, 95% intervallo di confidenza) per malattia cardiovascolare, 1.04 (0.92-1.17) per malattia coronarica, 0.86 (0.71-1.04) per ictus, e 0.96 (0.88-1.04) per mortalità di tutte le cause. Va però sottolineato come l'omocisteinemia di base andasse negli studi da 11 a 50 micromoli/l e come il livello medio fosse aumentato solo in quattro studi; in tre di questi quattro vi era una riduzione significativa di eventi.

Un successivo trial randomizzato<sup>19</sup> arruolava 5.442 donne con precedenti cardiovascolari o più di tre fattori di rischio coronarico, che venivano randomizzate a ricevere o meno i supplementi di vitamina B6, B12 ed acido folico per 7.3 anni. Le pazienti che ricevevano il trattamento avevano lo stesso rischio per l'end point primario composito di malattia cardiovascolare (226.9/10.000 persone-anno vs 219.2/10.000 persone-anno, per il trattamento attivo verso il gruppo placebo, con rischio relativo (RR) 1.03; 95% intervallo di confidenza (CI) 0.90-1.19; P=0.65, così anche per l'end point secondario infarto miocardico (34.5/10.000 persone-anni vs 39.5/10.000 persone/anni RR 0.87; 95% CI 0.63-1.22; P=0.42), per l'ictus (41.9/10.000 persone-anni vs 36.8/10.000 persone-anni RR 1.14; 95%CI 0.82-1.57 P=0.44), e per la mortalità cardiovascolare (50.3/10.000 persone-anni vs 49.6/10.000 persone-anni RR 1.01 95%CI 0.76-1.35; P=0.93). Ciò si verificava malgrado un sottostudio documentasse una riduzione del 18.5% dei livelli plasmatici di omocisteina, significativa con P<0.001, nel gruppo dei trattati, con una differenza di 2.27  $\mu\text{mol/l}$  (95% CI, 1.54-2.96  $\mu\text{mol/l}$ ). Anche in questo caso, però, va rilevato che solo il 27% delle partecipanti allo studio aveva livelli elevati di omocisteina.

Ancora, uno studio randomizzato norvegese, il Western Norway B Vitamin Intervention Trial (WENBIT)<sup>20</sup> arruolava 3.096 pazienti sottoposti a coronarografia e con prevalenza di malattia multivasale (59%) ed angina stabile (84%). I pazienti venivano randomizzati, secondo un disegno 2x2 fattoriale, ad uno di quattro gruppi che ricevevano trattamento con acido folico, vitamina B12 e B6 oppure acido folico più vitamina B12 oppure vitamina B6 da sola o

infine placebo. L'end point primario composito (morte, infarto miocardico acuto non fatale, ospedalizzazione per angina instabile ed ictus non fatale) nei 38 mesi di follow-up veniva raggiunto nel 14.2% dei trattati con acido folico e vitamina B12 e nel 13.7% dei controlli (RR 1.09; 95% intervallo di confidenza 0.90-1.32; P=0.36) ed ancora nel 13% dei pazienti che avevano ricevuto vitamina B6 vs il 14.3% dei controlli (RR 0.90; 95% intervallo di confidenza 0.74-1.09; P=0.28). Lo studio è risultato quindi del tutto negativo, anche se va ricordato che il follow-up previsto dal disegno era di quattro anni: durante il periodo di trattamento furono invece diffusi i risultati preliminari del Norwegian Vitamin Trial (NORVIT), che sembravano indicare un incremento del rischio di cancro nei partecipanti: ciò portò numerosi pazienti arruolati a uscire volontariamente dallo studio. Anche se l'analisi ad interim del NORVIT non aveva confermato questo dato, escluso poi tassativamente dalla pubblicazione dei risultati finali<sup>21</sup>, lo "steering committee" del WENBIT, con un vero colpo di scena, interruppe lo studio nel 2006 per la difficoltà a mantenere un adeguato livello di aderenza. Per chiarezza, va comunque ancora ricordato che in questo trial la percentuale dei soggetti con livelli elevati di omocisteina era solo del 10%.

Infine, lo scorso anno sono stati pubblicati i risultati del SEARCH Trial<sup>22</sup>, lo studio più numeroso, che ha randomizzato 12.064 pazienti reduci da infarto miocardico ad acido folico e vitamina B12 verso placebo, con end point di primo evento cardiovascolare maggiore (morte coronarica, infarto miocardico o rivascolarizzazione miocardica) e follow-up di 6.7 anni. L'inserimento nel braccio di trattamento determinava una riduzione del 28% del livello di omocisteina (3.8 micromoli/l). L'end point primario si verificava nel 25.5% dei trattati vs il 24.8% dei controlli (RR 0.04; 95% intervallo di confidenza CI 0.97-1.12; P=0.28). Non era evidente alcun beneficio neanche per i singoli componenti dell'end point: eventi coronarici maggiori (trattamento 20.4% vs placebo 19.6% RR 1.05; 95% CI 0.97-1.13), ictus (trattamento 4.5% vs placebo 4.4% RR 1.02; 95% CI 0.86-1.21), o rivascolarizzazione (trattamento 3.0% vs placebo 2.5% RR 1.18; 95% CI 0.95-1.46). Inoltre, non vi erano differenze per mortalità vascolare (trattamento 9.6% vs placebo 9.3%) o non vascolare (trattamento 6.7% vs placebo 6.5%). Questo studio serviva comunque a dissipare i dubbi circa l'eventuale incremento del rischio di cancro causato dal trattamento: l'incidenza era infatti uguale nei due bracci (trattamento 11.2% vs placebo 10.6%). Purtroppo, va evidenziato come anche in questo vasto trial, il 66% dei pazienti avesse un livello di omocisteina di base inferiore a 14 micromoli/l.

Va da ultimo segnalata la pubblicazione di piccoli studi<sup>23</sup> su un supposto effetto del trattamento con acido folico di riduzione dell'incidenza di ristenosi dopo angioplastica coronarica, non valutabili per il basso numero di pazienti randomizzati.

### **Studi di prevenzione di eventi vascolari cerebrali e periferici**

L'andamento altalenante dei risultati di questo tipo di studi è esemplificativo della difficoltà di pervenire a conclusioni definitive in questo campo.

Nel 2007 una metanalisi<sup>24</sup> che comprendeva otto trial concludeva che i supplementi di acido folico riducono il rischio di primo ictus del 18% (RR

0.82, 95% CI 0.68-1.00;  $p=0.045$ ). Nell'analisi stratificata si osservava un maggior beneficio in quei trial con follow-up maggiore di 36 mesi (RR 0.71, 0.57-0.87;  $p=0.001$ ), o con un decremento della concentrazione di omocisteina maggiore del 20% (0.77, 0.63-0.94;  $p=0.012$ ) e nei soggetti senza pregresso ictus (0.75, 0.62-0.90;  $p=0.002$ ).

Per quanto i risultati di questa prima metanalisi fossero ragionevoli, subito dopo, nel 2010, una seconda metanalisi<sup>25</sup>, che comprendeva tredici trial randomizzati di prevenzione primaria e secondaria, con una popolazione complessiva di 39.005 partecipanti, pur evidenziando un trend verso una lieve riduzione del rischio di ictus, non raggiungeva la significatività statistica (RR 0.93 95% CI 0.85-1.03;  $P=0.16$ ). L'andamento era più favorevole nei trial di prevenzione primaria (RR 0.89 95% CI 0.79-0.99;  $P=0.03$ ). Nell'analisi stratificata, comunque, un effetto benefico maggiore era evidente quando all'acido folico si associavano le vitamine del gruppo B e nei trial con larga prevalenza di uomini rispetto alle donne.

Analoga la successione di opposti risultati negli studi sugli effetti dei supplementi sulla vasculopatia periferica, anche se qui siamo in presenza dei cosiddetti end point surrogati: nel 2009, una metanalisi Cochrane<sup>26</sup> concludeva che non vi erano dati certi a favore del trattamento con supplementi di acido folico e vitamine del gruppo B nei pazienti con vasculopatia periferica; nel corso dello stesso anno un trial randomizzato concludeva che questi supplementi, nel corso di un trattamento di sole 16 settimane, determinavano un miglioramento di alcuni indici funzionali, come il "brachial pressure index" (AB-PI) e "pulse wave velocity" (PWV<9).

Posta la premessa iniziale, chi scrive non può sfuggire ad un tentativo di interpretazione sintetica dei risultati: al momento non vi sono elementi sufficienti per raccomandare il trattamento con acido folico e vitamina B6 e B12 per la prevenzione primaria e secondaria della cardiopatia ischemica o dell'ictus. Dopo la precisa, e negativa, presa di posizione delle Linee Guida statunitensi per la prevenzione della cardiopatia ischemica nella donna<sup>27</sup>, pubblicate nel vicino 2007, gli studi pubblicati successivamente hanno avuto, come sopra documentato, risultati prevalentemente negativi.

Non va comunque trascurata una questione, che mantiene ancora un alone di incertezza intorno a questo enigma della prevenzione: gli studi finora condotti non hanno arruolato e trattato pazienti con livelli elevati di omocisteina, come sarebbe stato logico, ma hanno invece incluso indiscriminatamente i soggetti, indipendentemente dal loro livello basale di omocisteinemia e quindi, prevalentemente soggetti con livelli normali. Ad oggi quindi, paradossalmente, non conosciamo gli effetti del trattamento sui pazienti con livelli elevati di omocisteina poiché anche i trial più recenti sono stati concepiti con gli stessi criteri di inclusione; non conosciamo inoltre né il livello a cui iniziare un eventuale trattamento né l'obiettivo appropriato di questo eventuale trattamento. Tutto ciò andrà esaminato conclusivamente in studi futuri.

## Psoriasi

La psoriasi, una malattia infiammatoria cronica immuno-mediata della cute, che coinvolge circa il 2-3% della popolazione generale, 125 milioni di persone nel mondo, è stata per lungo tempo considerata la malattia del "soggetto

sano”, ma un numero sempre maggiore di evidenze sta confutando questa concezione, dimostrando una significativa associazione con numerose comorbilità, tra le quali quelle di natura cardiovascolare (CV) rivestono particolare rilevanza.

Una possibile associazione tra psoriasi e malattia coronarica aterosclerotica, è stata suggerita per la prima volta nel 1961<sup>28</sup>. Molte osservazioni epidemiologiche successive hanno confermato la prima evidenza, ma con risultati inconclusivi sulla reale connessione tra le due patologie, per l’ampia prevalenza negli studi di pazienti ospedalizzati, quindi complessi, e l’assenza di correzione dei dati per fattori di rischio CV maggiori. Lo studio più ampio condotto su pazienti non ospedalizzati con psoriasi, al momento, rimane quello di Gelfand et al, che hanno utilizzato il “General Practice Research Database” in Gran Bretagna, osservando una popolazione ambulatoriale di 130.979 pazienti psoriasici, di cui 3.827 affetti da forme severe, e 556.995<sup>29</sup> controlli, per un periodo medio di 5.4 anni. Lo studio ha dimostrato che in una popolazione “based-cohort” la psoriasi è un fattore di rischio indipendente per infarto miocardico. L’incidenza di infarto miocardico acuto (IMA) in questi pazienti è risultata maggiore, rispetto a controlli sani, con una associazione più forte tra IMA e malattia psoriasica severa e un rischio relativo maggiore in soggetti giovani. Sorprendentemente questo risultato perdurava anche controllando l’analisi per i fattori di rischio maggiori per IMA, indicando il possibile ruolo della psoriasi come fattore di rischio indipendente per malattia coronarica ischemica.

Oltre al maggior rischio per malattia CV conclamata, è stata evidenziata una maggior prevalenza di fattori di rischio CV nei pazienti psoriasici, di dislipidemia, di obesità, di ipertensione arteriosa, di diabete mellito e di sindrome metabolica<sup>30-34</sup>.

Uno studio cross-sectional recente ha confermato che il rischio assoluto di sviluppare eventi CV maggiori, a 5 e 10 anni secondo il Framingham score, era maggiore in una coorte di pazienti con psoriasi rispetto a pazienti controllo con altre malattie dermatologiche non psoriasiche (score 5.3 vs 3.4 a 5 anni e 11.2 vs 7.3 a 10 anni)<sup>35</sup>.

I pazienti con psoriasi severa hanno mostrato avere inoltre una maggiore mortalità per tutte le cause, e mortalità CV anche dopo correzione per maggiori fattori di rischio CV<sup>37</sup>.

Le stesse osservazioni sono state dimostrate in seguito anche per altre manifestazioni di malattia aterosclerotica, quali lo stroke e l’arteriopatia periferica<sup>38</sup>.

Parallelamente a questa linea di ricerca, altri studi hanno evidenziato che nei soggetti con psoriasi si osservano con maggior frequenza alterazioni vascolari subcliniche, quali l’aumentato spessore intima-media, la rigidità della parete arteriosa e calcificazioni coronariche, a conferma della stretta associazione tra aterosclerosi sistemica e psoriasi. Nel 2007 uno studio su 32 pazienti psoriasici, in assenza di concomitanti fattori di rischio CV, evidenziava la presenza di calcificazioni coronariche nel 59% dei casi, contro il 28% dei controlli<sup>39</sup>. Altri studi hanno rilevato un aumento dello spessore delle tonache vascolari intima e media, così come un’abnorme velocità del polso carotido-femorale, nei pazienti affetti da psoriasi rispetto ai controlli<sup>40,41</sup>.

Il limite di questi studi è rappresentato dall’essere prevalentemente osservazionali e retrospettivi.

Si ipotizza che i meccanismi responsabili dell'associazione tra psoriasi e malattia CV includano:

- la maggior prevalenza di fattori di rischio CV;
- la terapia antipsoriasica (cyclosporina, retinoidi e metotrexate), che aumenterebbe il rischio CV mediante la promozione di fattori di rischio CV (ipertensione arteriosa, dislipidemia, iperomocisteinemia);
- l'infiammazione che caratterizza sia la malattia psoriasica che l'aterosclerosi;
- la sottodiagnosi e il sottotrattamento di fattori di rischio CV come conseguenza dell'attenzione maggiore rivolta alla malattia principale;
- la condivisione di fattori genetici.

Tra i vari fattori imputabili presi in considerazione finora, l'infiammazione sembra svolgere un ruolo primario per legare psoriasi e aterosclerosi, come già dimostrato per altre malattie infiammatorie croniche quali artrite reumatoide<sup>42</sup> e le malattie infiammatorie dell'intestino. Sebbene la fisiopatologia della psoriasi non sia interamente compresa, essa sarebbe primariamente dovuta ad una risposta immuno-mediata adattativa che coinvolge citochine del "pathway" Th1<sup>43</sup>. Similmente all'aterosclerosi, la psoriasi riconosce una sovraespressione di molecole di adesione, fattori angiogenetici e pro-infiammatori. Varie esperienze hanno segnalato lo stato infiammatorio sottostante alla psoriasi come il maggior responsabile dell'aumentata incidenza di malattie cardiovascolari in pazienti psoriasici<sup>44</sup>. Il "milieu" citochinico caratterizzante la psoriasi, con preponderante produzione di interferon-gamma e interleuchina-12, infatti, oltre a favorire l'aterosclerosi, potrebbe scatenarne gli eventi clinici più importanti, tra cui la sindrome coronarica acuta<sup>45</sup>. Indipendentemente dall'attivazione di proteina C reattiva (PCR) e IL-6, tradizionali catalizzatori dell'asse Th1, l'aumento di IFN-gamma si è rivelato predittore di morbilità e mortalità ad 1 anno di follow-up nella sindrome coronarica acuta. Recentemente l'attenzione è stata rivolta al possibile ruolo della PCR, uno dei più comuni e routinari marker d'infiammazione, che rappresenta anche un fattore predittivo di eventi cardiovascolari in un vasto range di situazioni cliniche. Anche l'iperomocisteinemia, fattore indipendente di rischio cardiovascolare, sembra avere un ruolo nella relazione tra psoriasi e malattie cardiovascolari, promuovendo lo stress ossidativo e la conseguente disfunzione endoteliale, oltre a contribuire ad uno stato pro trombotico. Uno studio condotto su pazienti psoriasici ha dimostrato non solo livelli maggiori di omocisteina in circolo rispetto ai controlli, ma ha anche osservato che l'iperomocisteinemia correla direttamente con la severità della psoriasi<sup>46</sup>.

Infine, la malattia psoriasica sembra essere caratterizzata da un'iperattività piastrinica, la quale favorirebbe, insieme all'iperomocisteinemia, uno stato pro-trombotico.

Malgrado la forte suggestione degli studi citati, rimangono evidentemente aperti numerosi interrogativi fondamentali: quanto è grande l'aumento del rischio CV correlato con la presenza della psoriasi? Le Linee Guida standard si devono applicare egualmente ai pazienti con psoriasi o questi devono essere considerati una categoria ad alto rischio come i diabetici? Qual è il ruolo della PCR come marker di cardiopatia ischemica nei pazienti con psoriasi e la PCR stessa può essere considerata un obiettivo di un trattamento? Vi sono rapporti tra la predisposizione genetica alle malattie CV e quella per la psoriasi? C'è un effetto dei trattamenti per la psoriasi sul rischio cardiovascolare?

In attesa di migliorare le nostre conoscenze, la possibilità di un'associazione tra psoriasi ed incremento del rischio CV ha determinato la necessità di codificare un "Consensus: Psoriasis and Coronary Artery Disease" rivolto a specialisti cardiologi ed a tutti gli specialisti che seguono pazienti con CAD, così come ai dermatologi, ed agli altri specialisti che seguono pazienti con psoriasi, al fine di informare e fornire raccomandazioni sull'identificazione dei pazienti con psoriasi e sull'intervento preventivo e curativo nei loro confronti<sup>47</sup>.

Le raccomandazioni possono essere così riassunte:

- avvertire i pazienti con psoriasi moderata o severa di un possibile incremento del rischio cardiovascolare ed incoraggiarli ad accertamenti preventivi del rischio cardiovascolare globale, della pressione arteriosa e dell'assetto lipidico;
- avvertire i pazienti con psoriasi lieve ed obesità addominale o ipertensione arteriosa del possibile aumento del rischio CV ed incoraggiarli ad accertamenti preventivi;
- monitorizzare gli effetti crociati dei rispettivi trattamenti farmacologici su fattori di rischio CV e malattia psoriasica.

### **Ipovitaminosi D**

Un'evidenza crescente supporta la teoria che un deficit di vitamina D (vit D) favorisca l'insorgenza di malattie infiammatorie croniche e di malattie autoimmuni, quali diabete mellito di tipo 2, aterosclerosi, malattie cardio-vascolari e neoplasie.

L'interesse per l'analisi di queste correlazioni scaturisce dall'inattesa frequenza con cui una condizione di ipovitaminosi D si manifesta nella popolazione altrimenti sana. Bassi livelli di 25-idrossivitamina D (25-OH D), la principale forma di deposito circolante di vit D, sono presenti in un sottogruppo della popolazione generale costituito da soggetti sani di età media e avanzata che va da un terzo a metà del totale.

Fattori di rischio per ipovitaminosi D riconosciuti sono l'età avanzata, la vita alle alte latitudini, la scarsa esposizione al sole, la pelle nera, l'obesità, il basso apporto dietetico di vit D, e varie condizioni patologiche concomitanti, in primis sindromi da malassorbimento.

Studi clinici hanno riportato associazioni "cross-sectional" tra bassi livelli plasmatici di vit D e diversi aspetti del sistema cardiovascolare (CV), quali iperattività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, ipertensione arteriosa, calcificazioni coronariche, dismetabolismo glucidico, e malattia cardio-cerebrovascolare conclamata, ma dati risultanti da studi longitudinali non sono disponibili.

Le numerose azioni attribuite alla vit D rispecchiano l'ampia distribuzione tissutale dei suoi recettori, dalle cellule muscolari lisce vascolari, all'endotelio, alle cellule immunitarie, ai cardiomiociti, tessuti su cui complessivamente la vit D agisce modulando lo stato immunitario ed infiammatorio.

Alla vit D si vanno riconoscendo sempre maggiori ruoli nell'ambito del sistema CV attraverso diversi meccanismi:

- inibizione dell'infiammazione. La vitamina D ha un potente effetto immunomodulatore: studi di laboratorio dimostrano che inibisce la produzione di prostaglandine e della cicloossigenasi 2, riduce la sintesi di metalloproteina-



si 9 di matrice e di numerose citochine proinfiammatorie, aumenta la sintesi di interleuchina 10, determinando complessivamente una soppressione dell'infiammazione.

- Inibizione della proliferazione della tonaca muscolare di parete e della calcificazione vascolare. Studi su animali indicano che, in dosi moderate, la vit D riduce l'afflusso cellulare di calcio, aumenta la proteina di matrice Gla, che inibisce la proliferazione della muscolatura liscia vascolare e la calcificazione vascolare.
- Regolazione della pressione arteriosa e dell'ipertrofia cardiaca. La vit D riduce l'espressione genica di renina e la sintesi di renina, inibendo l'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, quindi riducendo la pressione arteriosa con un effetto favorevole anche sull'omeostasi del volume circolante. Studi in vivo dimostrano che animali con carenza di vit D hanno maggiore attività del sistema renina-angiotensina e sviluppano ipertensione arteriosa; e che animali geneticamente modificati carenti di recettori della vit D (modelli knock-out) sviluppano ipertrofia ventricolare sinistra ed insufficienza cardiaca. Animali geneticamente modificati per non avere 1-alfa-idrossilasi, similmente sviluppano ipertrofia ventricolare sinistra; in questi, la somministrazione di 1.25-diidrossi vit D3 fa regredire il pattern. D'altra parte questi riscontri sono compatibili con il quadro caratteristico di pazienti con malattia renale terminale, ove la scarsa produzione di 1.25-di-idrossi vit D3, porta allo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra, scompenso diastolico, aterosclerosi e calcificazioni vascolari.
- Regolazione del metabolismo del glucosio. Dati limitati mostrano che la vit D può aumentare la sensibilità all'insulina e regolare il metabolismo del glucosio. Alcuni, ma non tutti gli studi osservazionali, hanno mostrato un'associazione inversa tra livelli di vit D o status di calcio e resistenza all'insulina.

È però chiaro che sarebbero necessari studi per determinare se la correzione dell'ipovitaminosi D possa contribuire a prevenire la malattia CV.

Nonostante le osservazioni riportate in letteratura in merito all'associazione tra vit D e fattori di rischio CV o malattia CV conclamata siano numerose, le informazioni rimangono limitate e non definitive, in quanto la maggior parte degli studi osservazionali sono trasversali e non corretti per fattori confondenti importanti, mentre gli studi d'intervento sono stati di breve durata, hanno incluso pochi soggetti, hanno usato una varietà di formulazioni di vit D e calcio, o fatto solo analisi post hoc riguardo agli eventi CV. Mancano sperimentazioni su larga scala di prevenzione primaria che abbiano riconosciuto le malattie CV come risultati prespecificati primari.

Precedenti studi clinici randomizzati di vit D si sono concentrati principalmente su osteoporosi, fratture, cadute, funzionalità fisica.

I dati ad ora disponibili prevalentemente derivanti da studi osservazionali, sembrano comunque supportare la teoria che livelli di vit D < 20 ng/ml, secondo molti esperti, favoriscano l'insorgenza sia di fattori di rischio CV come di aterosclerosi sistemica e di manifestazioni sia cardiache che cerebrali di malattia ischemica.

Tra i fattori di rischio CV sono stati maggiormente indagati il dismetabolismo glucidico e l'ipertensione arteriosa, in relazione all'ipovitaminosi D.

Una meta-analisi pubblicata nel 2007, condotta su studi osservazionali e randomizzati ha mostrato un'associazione significativa tra una condizione di

ipovitaminosi D e la prevalenza di diabete di tipo 2 o sindrome metabolica, con un rapporto di rischio (OR) che è risultato essere per livelli più alti vs livelli più bassi di 25-idrossi vit D rispettivamente di 0.36 per il diabete e di 0.71 per la sindrome metabolica; veniva inoltre mostrata un'incidenza significativamente minore di diabete di tipo 2 o sindrome metabolica per livelli di vit D/calcio più alti vs più bassi (OR 0.82)<sup>56</sup>.

Il rischio di sviluppare ipertensione arteriosa da parte di donne di età media o avanzata, in un recente studio<sup>57</sup> è stato dimostrato inversamente correlato all'assunzione di prodotti caseari a basso contenuto di grassi, di calcio e di vit D, suggerendo il loro ruolo potenziale nella prevenzione primaria di ipertensione arteriosa e di complicanze CV da parte di queste sostanze.

Si riproduce una situazione simile a quella evidenziata per l'iperomocisteinemia; studi osservazionali suggeriscono che la carenza di vitamina D è associata ad un aumentato rischio di malattie CV: ne sono esempi il Framingham Offspring Study<sup>58</sup> (1.739 uomini e donne con un'età media di 59 anni, follow-up di 5.4 anni) che ha confrontato l'incidenza di eventi CV nei soggetti con livelli sierici di 25-diidrossivitD di almeno 37.5 nmol/l vs quelli con livelli più bassi, dimostrando che il rischio di malattie CV era 1.62 volte maggiore nei soggetti con più bassi livelli di vit D, una differenza statisticamente significativa, e l'Health Professionals Follow-up Study<sup>59</sup> (più di 18.000 uomini di età compresa tra 40-75 per 10 anni) che, confrontando uomini con un basso livello serico di vit D (<37.5 nmol/l) con quelli con un livello ottimale (>75 nmol/l) ha dimostrato un'incidenza di eventi CV (infarto miocardico fatale o non fatale) 2.42 volte più alta negli uomini con bassi livelli di vitamina D, differenza che perdurava statisticamente significativa anche dopo correzione per i maggiori fattori di rischio CV.

D'altra parte, invece, la metanalisi condotta da Wang et al<sup>60</sup> su studi prospettici e studi clinici randomizzati effettuati tra il 1966 e il 2009, seppur riportando un trend favorevole, non ha dimostrato una relazione statisticamente significativa tra supplementazione di vit D o calcio a dosi da moderate ad elevate e riduzione del rischio CV (rischio relativo 0.90).

Meno numerosi, e pertanto meno conclusivi, sono i dati sulla mortalità CV correlata ad ipovitaminosi D. Utilizzando una coorte di pazienti dal "Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)", (>13.300 uomini e donne di età superiore a 20 anni), seguiti per 8.7 anni, Melamed et al<sup>61</sup> hanno dimostrato modeste associazioni tra livelli di vit D nel siero e mortalità. Soggetti che rientravano nel quartile più basso (<44.4 nmol/l) avevano un tasso di mortalità CV di 1.2 volte maggiore rispetto a soggetti nel quartile più alto (> 80.1 nmol/l) ed un tasso di mortalità per tutte le cause di 1.26 volte più alto.

D'altra parte uno studio prospettico su 34.486 donne in postmenopausa di età compresa tra 55 e 69 anni, ha dimostrato che una maggiore assunzione di calcio, ma non della vitamina D o di prodotti lattiero-caseari, è associata ad una ridotta mortalità per cardiopatia ischemica nelle donne in postmenopausa<sup>62</sup>.

Se si analizzano gli studi randomizzati, una meta-analisi<sup>63</sup> di 18 studi per un totale di 57.311 partecipanti, che prevedeva la supplementazione di vitamina D (300-2.000 UI/die, media 528 UI/giorno vs placebo), ha valutato il tasso di morte per tutte le cause e ha dimostrato una modesta ma significativa riduzione del rischio relativo (RR 0.93). Il maggior studio randomizzato però, il

“Women’s Health Initiative Study”<sup>64,65</sup>, la cui popolazione era costituita da 36.282 donne in postmenopausa di età compresa tra 50 a 79, ha testato la supplementazione di vitamina D3 (400 UI/die) con il calcio (1.000 mg/die) vs placebo, non evidenziando alcun beneficio nella prevenzione di eventi coronarici o ictus.

Per chiarire l’effetto di un intervento di correzione dell’ipovitaminosi D in termini sia di malattia neoplastica che CV, potranno essere determinanti i risultati del trial VITAL (Vitamin D and Omega-3 Trial)<sup>66</sup>, un trial randomizzato, che sta attualmente randomizzando 20.000 uomini sani anziani (> 60 anni) e donne (> 65 anni) in tutti gli Stati Uniti a ricevere in prevenzione primaria 2.000 UI di vitamina D3 per giorno o placebo, oltre che 1 g di omega3 al giorno o placebo, per 5 anni. Obiettivo primario dello studio è verificare se la vitamina D3 e gli omega3 riducono il rischio di neoplasie e di eventi CV maggiori (un endpoint composito di infarto miocardico, ictus e morte per eventi CV).

## Conclusione

Dai corposi dati esposti si evince come la soluzione dei tre enigmi della prevenzione cardiovascolare sia ancora lontana e che l’accertamento della verità, come in ogni giallo che si rispetti, sarà faticoso. Abbiamo verificato molte incertezze nella soluzione del primo, trovato soprattutto interrogativi per il secondo e raccolto elementi contraddittori per il terzo. È onesto però ammettere che, quando le prove per inchiodare il colpevole non si individuano rapidamente, le speranze di incastrarlo si fanno più flebili con il passare del tempo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) *McCully KS*. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-128
- 2) *Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH*. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004; 11 (suppl 1):S56-S64
- 3) *Zhang D, Jiang X, Fang P, et al*. Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation* 2009; 120:1893-1902
- 4) *Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS*. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:200-06
- 5) *Wald DS, Law M, Morris JK*. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325:1202
- 6) *Nygård O, Vollset SE, Refsum H, et al*. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274:1526-33
- 7) *Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG; MTHFR Studies Collaboration Group*. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288:2023-31
- 8) *Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, et al*. Homocysteine, MTHFR 677C-->T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology*

- 2002; 59:529-536
- 9) *Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G.* Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 2005; 331:1053
  - 10) *Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L.* Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98:2520-26
  - 11) *Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, et al.* Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:412-419
  - 12) *Rimm EB, Willett WC, Hu FB, et al.* Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998; 279:359-364
  - 13) *Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, et al.* Whole grain consumption and risk of ischemic stroke in women: a prospective study. *JAMA* 2000; 284:1534-40
  - 14) *Cui R, Iso H, Date C, Kikuchi S, Tamakoshi A; Japan Collaborative Cohort Study Group.* Dietary folate and vitamin B6 and B12 intake in relation to mortality from cardiovascular diseases: Japan Collaborative Cohort Study. *Stroke* 2010; 41:1285-89
  - 15) *Helfand M, Buckley DI, Freeman M, et al.* Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009; 151:496-507
  - 16) *US Preventive Services Task Force.* Using nontraditional risk factors in coronary heart disease risk assessment: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2009; 151:474-482
  - 17) *Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M.* Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:1203-12
  - 18) *Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, He J.* Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 296:2720-26
  - 19) *Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, et al.* Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA* 2008; 299:2027-36
  - 20) *Ebbing M, Bleie Ø, Ueland PM, et al.* Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300:795-804
  - 21) *Bønaa KH, Njolstad I, Ueland PM, et al.* Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354 (15):1578-88
  - 22) *Armitage JM, Bowman L, Clarke RJ, et al.* Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group. Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA* 2010; 303:2486-94
  - 23) *Schnyder G, Roffi M, Pin R, et al.* Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345:1593-1600
  - 24) *Wang X, Qin X, Demirtas H, et al.* Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 369:1876-82
  - 25) *Lee M, Hong KS, Chang SC, Saver JL.* Efficacy of homocysteine-lowering therapy with folic Acid in stroke prevention: a meta-analysis. *Stroke* 2010; 41:1205-12
  - 26) *Hansrani M, Stansby G.* Homocysteine lowering interventions for peripheral arterial disease and bypass grafts. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (3):CD003285
  - 27) *Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ; Expert Panel/Writing Group.* Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation* 2007; 115:1481-1501

- 28) *Reed WB, Becker SW, Rhode R, Heiskell CL.* Psoriasis and psoriatic arthritis. A clinico-pathologic conference. *Arch Dermatol* 1961; 99:86
- 29) *Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB et al.* Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA* 2006; 296:1735-41
- 30) *Wakke M, Thio HB, Prens EP, Sijbrands EJG, Neumann HAM.* Unfavorable cardiovascular risk profiles in untreated and treated psoriasis patients. *Atherosclerosis* 2007; 190:1-9
- 31) *Neimann AI, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB, Gelfand JM.* Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55:829-835
- 32) *Kimball AB, Robinson D, Wu Y, Guzzo C, Yeilding N, Paramore C, Fraeman K, Bala M.* Cardiovascular disease and risk factors among psoriasis patients in two US healthcare databases, 2001-2002. *Dermatology* 2008; 217:27-37
- 33) *Kaye JA, Li L, Jick SS.* Incidence of risk factors for myocardial infarction and other vascular diseases in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2008; 159:895-902
- 34) *Sommer DM, Jenisch S, Suchan M et al.* Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with moderate to severe psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2006; 298: 321-328
- 35) *Gisondi P, Farina S, Giordano MV, Girolomoni G.* Usefulness of the Framingham Risk Score in Patients With Chronic Psoriasis. *Am J Cardiol* 2010; 106:1754-57
- 36) *Gelfand JM et al.* Risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population based study. *Arch Dermatol* 2007; 143(12):1493-99
- 37) *Mehta NN.* Patients with severe psoriasis are at increased risk of cardiovascular mortality: cohort study using the General Practice Research Database. *EHJ* 2010; 31, 1000-06
- 38) *Prodanovich S, Kirsner RS, Kravetz JD et al.* Association of psoriasis with coronary artery, cerebrovascular, and peripheral vascular diseases and mortality. *Arch Dermatol* 2009; 145:700-03
- 39) *Ludwig RJ, Herzog C, Rostock A et al.* Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. *Br J Dermatol* 2007; 156:271-276
- 40) *El-Mongy S, Fathy H, Abdelaziz A et al.* Subclinical atherosclerosis in patients with chronic psoriasis: a potential association. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; Nov 2
- 41) *Gisondi P, Fantin F, Del Giglio M et al.* Chronic plaque psoriasis is associated with increased arterial stiffness. *Dermatology* 2009; 218:110-113
- 42) *Solomon DH, Goodson NJ, Katz JN, Weinblatt ME, Avorn J, Setoguchi S, Cannon C, Schneeweiss S.* Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:1608-12
- 43) *Griffiths CE, Barker JNW.* Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 360:263-271
- 44) *Prodanovich S, Shelling ML, Federman DG, Kirsner RS.* Cytokine milieu in psoriasis and cardiovascular disease may explain the epidemiological findings relating these 2 diseases. *Arch Dermatol* 2008; 144:1518-19
- 45) *Ranjbaran H, Sokol SI, Gallo A et al.* An inflammatory pathway of IFN-gamma production in coronary atherosclerosis. *J Immunol* 2007; 178:592-604
- 46) *Malerba M, Gisondi P, Radaeli A et al.* Plasma homocysteine and folate levels in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2006, 155:1165-69
- 47) *Vincent E, Friedewald, et al.* *AJC Editor's Consensus: Psoriasis and Coronary Artery Disease.* *Am J Cardiol* 2008; 102:1631-43
- 48) *Resnick LM, Muller FB, Laragh JH.* Calcium-regulating hormones in essential hypertension: relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med* 1986; 105:649-654
- 49) *Kristal-Boneh E, Fromm P, Harari G, Ribak J.* Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 1997; 30:1289-94

- 50) *Lind L, Hanni A, Lithell H, Hvarfner A, Sorensen OH, Ljunghall S.* Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men. *Am J Hypertens* 1995; 8:894-901
- 51) *Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, Demer LL.* Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 1997; 96:1755-60
- 52) *Doherty TM, Tang W, Dascalos S, Watson KE, Demer LL, Shavelle RM, Detrano RC.* Ethnic origin and serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 are independent predictors of coronary calcium mass measured by electron-beam computed tomography. *Circulation* 1997; 96:1477-81
- 53) *Scragg R, Jackson R, Holdaway IM, Lim T, Beaglehole R.* Myocardial infarction is inversely associated with plasma 25-hydroxyvitamin D3 levels: a community-based study. *Int J Epidemiol* 1990; 19:559-563
- 54) *Poole KE, Loveridge N, Barker PJ, Halsall DJ, Rose C, Reeve J, Warburton EA.* Reduced vitamin D in acute stroke. *Stroke* 2006; 37:243-245
- 55) *Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P.* Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:105-112
- 56) *Anastassios G, Pittas, Joseph Lau, Frank B. Hu, and Bess Dawson-Hughes* REVIEW: The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis *J Clin. Endocrinol Metab* 2007; 92:2017-29
- 57) *Lu Wang, JoAnn E. Manson, Julie E. Buring, I-Min Lee, Howard D. Sesso.* Dietary Intake of Dairy Products, Calcium, and Vitamin D and the Risk of Hypertension in Middle-Aged and Older Women. *Hypertension* 2008; 51:1073-79
- 58) *Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al.* Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117:503-511
- 59) *Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB.* 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008; 168:1174-80
- 60) *Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD.* Systematic review: vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Ann Intern Med* 2010; 152:315-323
- 61) *Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B.* 25-Hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 2008; 168:1629-37
- 62) *Roberd M. Bostick, Lawrence H. Kushi, Ying Wu, Katie A. Meyer, Thomas A. Sellers, and Aaron R. Folsom.* Relation of Calcium, Vitamin D, and Dairy Food Intake to Ischemic Heart Disease Mortality among Postmenopausal Women. *Am J Epidemiol* 1999; 149:151-61
- 63) *Autier P, Gandini S.* Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007; 167:1730-37
- 64) *Hsia J, Heiss G, Ren H, et al.* Women's Health Initiative Investigators. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007; 115:846-854
- 65) *LaCroix AZ, Kotchen J, Anderson G, et al.* Calcium plus vitamin D supplementation and mortality in postmenopausal women: the Women's Health Initiative calcium vitamin D randomized controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64:559-567
- 66) *Manson J.* Vitamin D and the heart: Why we need large-scale clinical trials. *Cleve Clin J Med* 2010; 77:903-910