

## NOI REPERE ÎN STUDIUL EFECTELOR BIOLOGICE ALE VITAMINEI D

**Prof. Dr. Sorin Buzinschi**

*Facultatea de Medicină Braşov, Universitatea Transilvania Braşov,  
Spitalul Clinic de Copii Braşov*

### REZUMAT

Dozarea recentă a vitaminei D pentru utilizarea clinică a schimbat complet înțelegerea patologiei sale. S-a constatat că insuficiența/deficitul de vitamina D este larg întâlnit în populația țărilor dezvoltate și, surprinzător, în populația care trăiește în climatul cald. Doar o parte a nivelului sanguin al vitaminei D poate fi legat de sezon, latitudine sau aportul oral. Factorii genetici sunt implicați în toate etapele metabolismului său. Genele care influențează nivelul vitaminei D sunt DHCR7, CYP27A1, CYP2R1, gena VDR, CYP24A1 și Gc. Sunt prezentate etapele metabolismului vitaminei D, ca și intervenția diferitelor gene implicate. Este discutată funcția autocrină a vitaminei D, care facilitează expresia pleiotropică a genelor legate de funcționarea celulară. Sunt trecute în revistă și unele tulburări legate de nivelul scăzut al vitaminei D, în afară de rahitism.

**Cuvinte cheie:** vitamina D, nivel scăzut, rahitism, boli cronice

Vitamina D [25(OH)D] a fost descoperită în anul 1920, iar structura sa chimică din 1932, însă rahitismul, boala a cărei carență o exprimă, are o istorie cu mult mai veche. Expunerea la soare și tratamentul cu vitamina D au fost considerați multă vreme factori eficienți profilactici și terapeutici ai unei probleme rezolvate. Cu toate acestea, reapariția deficitului de vitamina D și a rahitismului în ultimii ani, raportate în USA, Canada, Germania, Anglia dar și Spania, Grecia, Arabia Saudita, Turcia, Egipt, India (1-8) au făcut ca deficiența vitaminei D să fie considerată astăzi o problemă epidemică în întreaga lume (1,5,8), prin afectarea în diferite grade și grupe de vârstă a peste 50% din populația globului (9). Un factor decisiv în reevaluarea statusului vitaminei D l-a constituit posibilitatea dozării 25(OH)D în laboratoarele clinice, odată ce metoda a părăsit cadrul restrâns al laboratoarelor de cercetare. Între factorii care determină starea vitaminei D, menționăm: expunerea solară limitată la latitudinile nordice, între noiembrie și martie, utilizarea din ce în ce mai largă a cremelor fotoprotectoare în vederea evitării neoplasmelor cutanate și variabilitatea genetică. Vitamina D s-a dovedit în ultimii ani centrul unui sistem complex de reglare autocrină de tip

hormonal care reglează proliferarea și diferențierea celulară. Vitamina D controlează direct sau indirect peste 3.000 de gene care reglează metabolismul Ca și cel osos, modulează imunitatea înăscută, reglează producția de insulină și renină, induce apoptoza și inhibă angiogeneza (5). Pe această cale, 25(OH)D participă la funcționarea sistemului imunitar, cardiovascular, neuroendocrin (1,9-11). Carența și variațiile genetice în metabolismul vitaminei D care pot explica apariția unor semne de rahitism la copii cu profilaxie corectă, pot fi implicate în adolescență și în viața adultă, în apariția a numeroase afecțiuni cronice ca: infecții micobacteriene (TBC), boli cardiovasculare, diabet, neoplasme, boli autoimune (scleroză multiplă, lupus eritematos sistemic, psoriazis) (9,11). În baza acestor considerente, vitamina D a devenit acum un foarte activ câmp de cercetare, numai în primele 9 luni ale anului 2010 fiind publicate peste 2.300 de articole cu acest subiect (10).

### SUMAR DE FIZIOLOGIE AL VITAMINEI D

Vitamina D se găsește sub 2 forme: vitamina D<sub>2</sub> sau ergocalciferol (calciferol), produs prin iradierea

Adresa de corespondență:

Prof. Dr. Sorin Buzinschi, Spitalul Clinic de Copii Braşov, Str. Nicopole Nr. 45, Braşov  
e-mail: sbuzinschi@yahoo.com

drojdiei de bere sau din unele plante și vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol), care se produce prin fotoconversia 7-hidrocolesterolului (7-DHC) cutanat după expunere la radiația solară sau la RUV artificială. Cantitatea de vitamina D din alimente este foarte redusă. Industrial, 25(OH)D se produce pornind de la lanolină. Pornind de la 7-DHC, vitamina D<sub>3</sub> parcurge o serie de transformări până la metabolitul activ, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, care apoi este degradat în compuși inactivi (Figura 1).

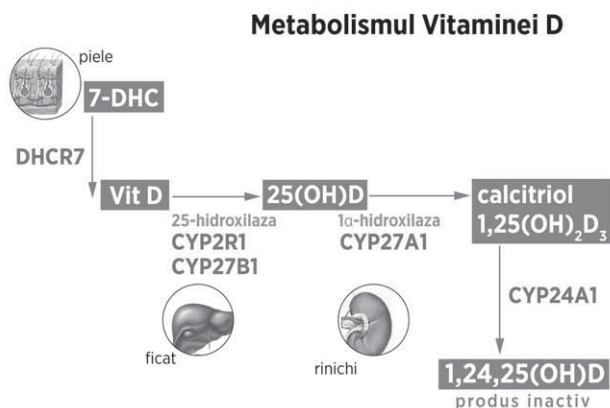


Figura 1. Etapele metabolismului vitaminei D

Vitamina D are 2 tipuri de acțiuni principale:

- **Endocrine**, care reglează metabolismul Ca, vitamina D<sub>3</sub> fiind produsă în urma sintezei intrarenale;
- **Autocrine**, în care hidroxilarea colecalfiferolului se produce în țesuturi, rezultând calcitriol cu acțiune intracelulară, nedetectabil ca produs circulant, având drept caracteristică facilitarea genelor sau traficul de metaboliți intracelulari.

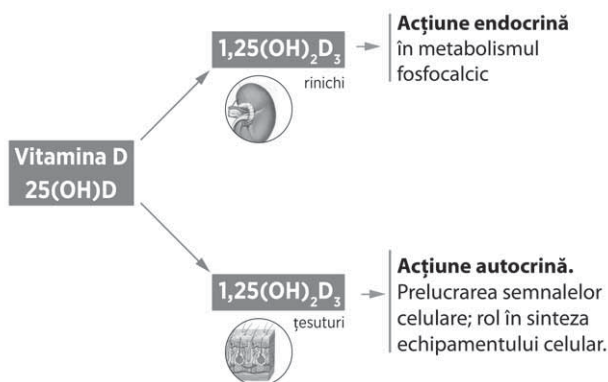


Figura 2. Formarea sistemică și locală a vitaminei D și efectele specifice

Asimilarea vitaminei D ca hormon, de multă vreme anticipată (de Luca, cit. 12), se bazează pe următoarele argumente:

- Este produsă de un organ (rinichi)
- Circulă la țesuturi țintă
- Interacționează cu receptori specifici celulari
- Declanșează răspunsuri specifice (absorbția Ca)

## METABOLISMUL VITAMINEI D ȘI DETERMINISMUL SĂU GENETIC

O echipă de cercetători din cadrul SUNLIGHT Consortium (Study of Underlying Genetic Determinants of Vitamin D and Highly Related Traits) au analizat concentrațiile 25(OH)D la 33.996 de subiecți adulți descendenți europeni, în cadrul a 15 cohorte și au arătat că prezența unor alele poate dubla riscul de insuficiență al vitaminei D (13). Genele în discuție (DHCR7(NADSYN1), CYP2R1 și GC) sunt implicate în sinteza colesterolului, hidroxilarea și transportul vitaminei D. Concentrațiile 25(OH)D, biomarkerul acceptat al vitaminei D, sunt mai ridicate vara și mai scăzute în sezonul rece. Numai 25% dintre variațiile interindividuale ale acesteia pot fi legate de sezon, latitudine sau aportul exogen de vitamina D (8). Rezultate ale studiilor pe gemeni și familii sugerează că factorii genetici contribuie substanțial la această variabilitate, care se poate ridica la peste 53% (14,48). Aceste date pot explica de ce unii copii răspund favorabil la aportul de vitamina D și alții nu, așa cum observăm în practica cotidiană.

### Formarea colecalfiferolului

În cursul expunerii la soare, RUV este absorbită de către 7-dehidrocolesterol (7-DHC) care se găsește în membranele keratinocitelor și a fibroblaștilor; în urma unui proces de fotoconversie, se formează provitamina D<sub>3</sub> sau colecalfiferolul, care este ejectat în spațiul extracelular și transportat la ficat de o proteină transportoare (9,15). Deși sinteza vitaminei D din 7-DHC este un proces fizico-chimic, sinteza colesterolului pornind de la 7-DHC este de natură biochimică, mediată de o enzimă 7-DHC reductaza, determinată de gena identificată ca DHR C7 (NAD SYN). Polimorfisme ale acestei gene care determină scăderea producției de colesterol pot crește nivelurile sanguine ale vitaminei D. Creșterea colesterolului se însoțește de scăderea valorilor 25(OH)D plasmatic, probabil din motive extragenetice.

### Formarea hidroxicolecalfiferolului (calciferol sau calcidiol), 25(OH)D

În ficat, colecalfiferolul este hidroxilat în poziția 25 pentru a forma 25(OH)D; reacția este catalizată

de 25-hidroxilaze, enzime ale citocromului P450 având sediu microzomal (CYP2R1) și mitocondrial (CYP27A1) în hepatocite. Calcidiolul reprezintă metabolitul principal al vitaminei D; deși nu are activitate intrinsecă, el este utilizat pentru stabilirea nivelului sanguin al vitaminei, având în vedere timpul de înjumătățire de aproximativ 15 zile și faptul că valoarea sa crește proporțional cu aportul exogen de vitamina D (10,15). La bolnavi cu nivele scăzute ale 25(OH)D au fost identificate mutații ale genei 2R, fiind evidența genetică că enzima CYP2R1 este enzima cheie a 25-hidroxilazei (16).

### Proteina transportoare de vitamina D (DBPsau Gc)

Asigură vehicularea plasmatică a 25(OH)D; variante genetice comune pot diferenția răspunsul plasmatic la aportul exogen de vitamina D (13). Lauridsen și col. (17) au identificat fenotipurile implicate în variațiile sanguine ale vitaminei D la 595 persoane adulte; din datele studiului rezultă că o concentrație Gc este un predictor independent al 1,25(OH)<sub>2</sub>D, pe când fenotipul Gc este un indicator semnificativ al concentrației 25(OH)D. Într-un studiu care a cuprins 4.501 persoane adulte de origine europeană, în USA, Ahn și col. (18) au identificat între cauzele pentru un răspuns inadecvat la vitamina D, polimorfismul pentru un singur nucleotid (SNP) al genei care codează Gc pe cromozomul 4q12-13 și SNP DHCR7. Polimorfismul pentru Gc ar putea avea cel mai mare impact asupra concentrației sanguine a vitaminei D (8)

### Formarea 1,25-dihidroxicolecalciferolului [1,25(OH)<sub>2</sub>D], calcitriolul

Etapa principală în apariția formei active a vitaminei D, calcitriolul, se desfășoară cu precădere în rinichi, însă numeroase alte țesuturi și organe posedă celule capabile să producă 1,25(OH)<sub>2</sub>D pe plan local (plămân, colon, prostata, celulele β pancreatice, monocite, celule paratiroidiene) (9-11,15). În rinichi reacția de formare a 1,25(OH)<sub>2</sub>D este catalizată de 1α hidroxilază, enzimă a citocromului P450 (CYP27B1), localizată în celulele tubului proximal renal. Producția de calcitriol este strâns reglată de activitatea 1α hidroxilazei, care la rândul ei este stimulată de hipocalcemie, creșterea PTH și scăderea nivelului plasmatic al precursorului său, calcidiolul. (9,15)

### Interacțiunea 1,25(OH)<sub>2</sub>D cu receptorul pentru vitamina D (VDR)

O parte importantă a acțiunilor calcitriolului sunt mediate de un factor nuclear de transcripție,

VDR. Acesta împreună cu vitamina D se leagă de RXR (x-receptorul cu acid retinoic) și de elementele de răspuns la vitamina D pentru a iniția reglarea unor gene specifice (10).

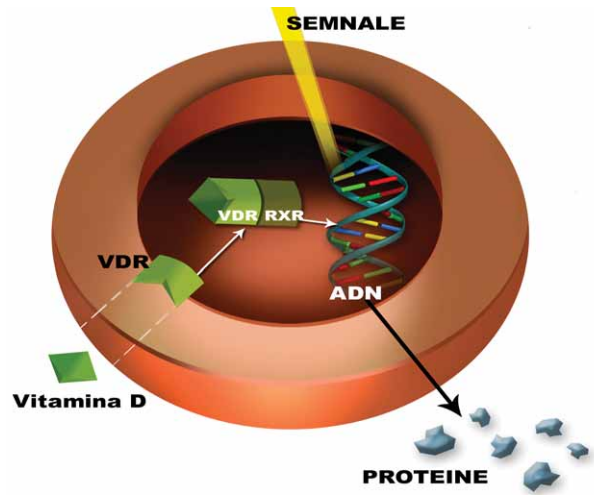


Figura 3. Reprezentare schematică a rolului VDR în nucleul celular

VDR a polarizat atenția a numeroși cercetători fiind considerat un punct cheie în variațiile de răspuns față de 24(OH)D. Există diferite variante alelice (polimorfisme) ale genei VDR pe cromozomul 12 care apar natural în populație și care au fost corelate cu rahitismul, rezistența la vitamina D, hiperparatiroidismul dar și cu susceptibilitatea la infecții, boli autoimune și cancer (15,19-21). Cu toate că se acceptă în nutrigenomică faptul că anumite polimorfisme fac gazda purtătoare mai sensibilă la anumite boli chiar în prezenta nutrimențului respectiv, în ceea ce privește aportul de vitamina D și Ca, condiționarea nu este clară (22).

În diferite studii asupra unor copii cu rahitism în diferite arii geografice a fost studiat genotipul VDR (FoK1, Taq1, Apa1) sau diferite alte variante în încercarea de a se defini configurația de risc.

Observațiile în care rahitismul sau nivele scăzute ale vitaminei D apar în situații în care era de așteptat la nivele normale datorită expunerii mari la radiația solară, a produs o mare surpriză pentru cercetători și medicii practicieni. Studiile efectuate în țările unde există o patologie semnificativă prin rahitism nu au reușit însă să tranșeze clar dacă există o susceptibilitate ereditară a copiilor pentru această afecțiune. O metaanaliză asupra datelor din literatură privind legătura dintre polimorfismele pentru un singur nucleotid (SNP) și concentrațiile serice ale 25(OH)D au identificat implicarea Gc, VDR și a CYP27B1, sugerând că arhitectura genetică individuală poate determina nivelul vitaminei D (31).

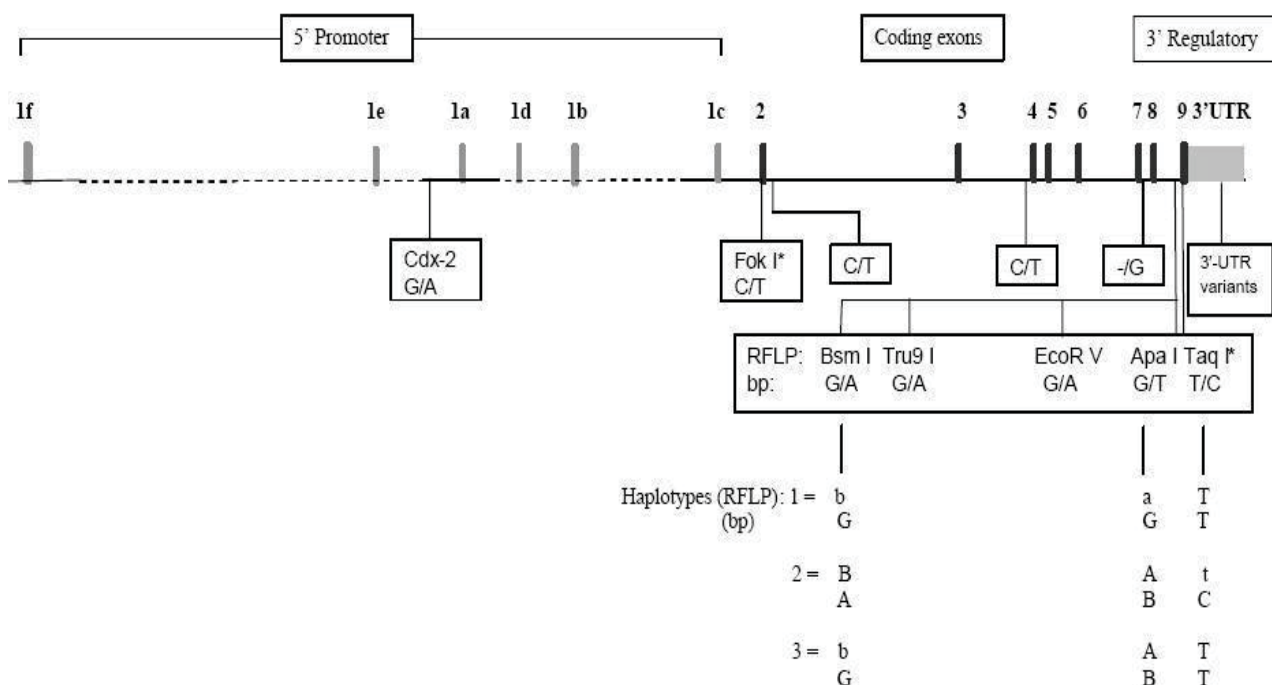


Figura 4. Structura genomică a VDR și poziția polimorfismelor cunoscute Dupa Fang, 2005

Tabelul 1. Polimorfismul VDR la copii cu rahitism

Autori	Modificari genetice VDR	Semnificatie
Bora, Orzan, col, 2008 (22)	Polimorfismul genelor FokI, TaqI, ApaI la bolnavi; alelele ApaI frecv ridicată; frecv Tt și Aa incidentă redusă	Polimorfismele VDR factor important in rahitismul carential in Turcia
Baroncelli, Bereket, col, 2008 (23)	Alelele F incidentă crescută; genotipul BB asociat cu nivele scăzute ale 25(OH)D	Incidenta crescuta a alelei F predispozitie la rahitism in Turcia, Egipt
Ismail, Erfan, col, 2011 (24)	Alelele f (FokI) incidentă crescută; combinatiile genotipurilor VDR pentru FokI, ApaI, TaqI diferite fata de control	Relatie pozitiva intre polimorfismul genei VDR și susceptibilitatea la rahitism in Egipt
Arabi, Zahed, col, 2009 (25)	Polimorfisme BsmI și TaqI	Polimorfismul VDR influentează apozitia scheletica la adolescente sanatoase in Liban
Fischer, Thacher, col, 2000 (26)	Alelele f (FokI) incidentă scăzută, genotipul FF relativ crescut	Diferite frecvențe ale alelelor, combinatii de genotipuri nu au fost diferite fata de grupul martor in Nigeria
Lu, Li, col 2003 (27)	Alelele FokI și genotipul FF, incidentă crescută	Asociere intre polimorfismul genei VDR și rahitismul prin deficit de vitamina D in China
Gong, Li, col, 2010 (28)	Alelele F (FokI) și genotipul FF incidentă crescută, corelate cu nivele scăzute ale 25(OH)D	Polimorfismul genei VDR joacă un rol important in apariția rahitismului prin deficit de vitamina D, China
Xi, Yang, col, 2005 (29)	Fără diferențe semnificative in distributia genotipului VDR și a alelelor	Polimorfismul genei VDR poate sa nu fie important in susceptibilitatea individuala la deficitul de vitamina D
Kanedo, Urnaa, col, 2007 (30)	Polimorfismul VDR prin alelele BsmI, ApaI și TaqI fara diferențe semnificative fata de grupul control	Polimorfismul genei VDR nu joacă un rol important in aparitia rahitismului in Mongolia

Unele date indică faptul ca anumite polimorfisme ale VDR pot fi determinante pentru osteoporoză, facilitarea fracturilor și tonusul muscular in patologia adultului (BsmI, FokI) (Barr-bibl), ceea ce configurează existența unui profil genetic particular al unui grup/subgrup de persoane. Este posibil ca acesta sa fie o rezultată de sumatie deoarece atat

Cheng (15) cat și Uitterlinden și col (32) considera ca alelele BsmI, ApaI, TaqI nu au efect asupra nivelului de expresie, nici a activității proteinei VDR formate. De mentionat ca unele laboratoare din țara noastra pot determina polimorfismele FokI, B/b pentru a identifica genotipul asociat cu densitatea osoasă scăzută și riscul de fracturi pentru gru-

pele de risc. Odata ce acțiunile clasice, de tip hormonal ale vitaminei D sunt bine cunoscute, iar implicarea organelor ținta (intestin, schelet, rinichi, paratiroide) este pe larg descrisă în tratatele de fiziologie, vom aborda mai pe larg efectele autocrine/paracrine ale 25(OH)D.

## ACTIUNILE TISULAR SPECIFICE ALE VITAMINEI D

Cu 30 ani în urmă s-a descoperit ca majoritatea țesuturilor și celulelor organismului posedă receptorul nuclear pentru vitamina D (VDR). Astfel, celulele din creier, mușchii scheletici, cord, musculatura netedă, piele, celulele  $\beta$  pancreatice, celulele sistemului imun (macrofage, celule dendritice, limfocite B și T) dețin VDR. S-a constatat deasemeni prezența extrarenală a  $1\alpha$ -hidroxilazei (CYP27B1) în unele țesuturi (colon, prostată, celule dendritice, piele etc), reprezentând aparatul necesar pentru formarea și utilizarea locală a vitaminei D (10, 11, 15). Utilizarea 25(OH)D în reglarea unor procese biologice fundamentale a fost relevată pentru: supresia creșterii celulare, reglarea apoptozei, modularea răspunsului imun, controlul diferențierii și funcției cutanate, controlul sistemului renina-angiotensina, controlul secreției de insulina, controlul funcției musculare și al unor funcții neuronale.

Toate aceste funcții ale vitaminei D au potențiale aplicații clinice. Într-o estimare globală, tulburările produse sau agravate de nivelele scăzute ale vitaminei D sunt prezentate în tabelul 2.

**Tabel 2.** Tulburări produse sau agravate de lipsa vitaminei D, după Heaney, 2008 (11)

Afectiune	Nivelul de evidentă
Osteoporoza	++++
Fracturi	++++
Diabet zaharat tip 1	++
Cancer	++++
Boli autoimune	++
HTA	+++
Boli ale periodontului	++++
Scleroza multiplă	++
Susceptibilitate/răspuns slab la infecții	++++
Osteoartrita	++

*Nota: +++++ semnifică evidența puternică prin unul sau mai multe trialuri randomizate; +++ date epidemiologice puternice și consistente însă fără evidența unor trialuri randomizate; ++ evidențe mai puțin puternice însă sugestive.*

### Vitamina D și sistemul imun

Modularea funcționării sistemului imun prin vitamina D este dovedită prin prezența VDR în

imunocitele umane activate, prin capacitatea acestor celule de a produce calcitriol și prin rolul acestuia în inhibiția proliferării celulelor T (10). S-a demonstrat o relație cauzală între funcționarea celulară a complexului  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR și imunitatea înăscută și adaptativă față de infecții. În rahitismul florid infecțiile respiratorii sunt gravate de o mare gravitate și mortalitate, deasemeni infecțiile recurente reprezintă o componentă a evoluției rahitismului carențial. Modificări ale funcționării VDR prin expresia unor alele, poate influența susceptibilitatea la infecții micobacteriene sau virale (15). Numeroase studii au evidențiat diferite moduri de implicare a vitaminei D în procesele infecțioase. Astfel, Camargo și col (33) au constatat o relație inversă între nivelul vitaminei D în cordonul ombilical și incidența infecțiilor respiratorii la vârsta de 3 luni, 15 luni, 3 și 5 ani. Un studiu randomizat, dublu-orb, controlat placebo, efectuat în Japonia de Urashima și col în 2010 (34) a arătat ca suplimentarea copiilor școlari cu 1200 UI/zi vitamina D în sezonul rece a scăzut incidența infecției cu virus gripal A de la 18.6% la 10.8% în grupul tratat. Secreția de cathelicidina, antibiotic natural din grupul peptidelor antimicrobiene, este dependentă de inducția CYP 27B1 și activarea VDR (35,36), fiind demonstrată acțiunea acesteia asupra patogenilor intracelulari ca Mycobacterium tuberculosis (10). Aceasta poate explica efectul favorabil al expunerii solare la bolnavii cu TBC, vindecarea mai rapidă prin suplimentarea cu vitamina D în cursul tratamentului antibiotic și susceptibilitatea genetică variabilă la infecția TB prin polimorfismul genetic al VDR (genotipul FokI ff la subiecți asiatici) (37). Efectul global al 25(OH)D asupra imunității adaptative este de tip inhibitor prin scăderea producției de anticorpi, limitarea diferențierii limfocitelor B în plasmocite, promovarea funcțiilor limfocitelor Th2 și inhibiția răspunsurilor Th1 (15). În psoriazis capacitatea antiproliferativă a vitaminei D a fost dovedită prin efectul asupra leziunilor cutanate atât prin expunere solară cât și prin tratamentul topic cu vitamina D (9,10,15). Studii experimentale au arătat că  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  are capacitatea de a inhiba dezvoltarea encefalomielitei immune, a tiroiditei, DZ tip 1, a bolii inflamatorii intestinale ca și a altor afecțiuni autoimune. Translația acestor date în practica medicală umană nu este un proces liniar și necesită cercetări în continuare.

### Vitamina D și diabetul zaharat (DZ)

Rolul vitaminei D ca reglator autocrin al secreției de insulină atestat de activitatea CYP27B1 ( $1\alpha$ -hidroxilaza) în celulele pancreatice ca și cel de

regulator al apoptozei (15) conferă acesteia valențe în prevenirea DZ tip1(38). DZ tip 1 cunoaște o puternică sezonabilitate diagnostică debutul fiind mai frecvent în lunile de toamnă și iarnă și un gradient geografic nord-sud, sugerând o corelație inversă între apariția bolii și expunerea solară (39). Dozări ale vitaminei D au arătat scăderi semnificative ale 25(OH)D și ale 1,25(OH)<sub>2</sub>D la momentul diagnosticului comparativ cu cazurile control (39,40). Studiile efectuate de Hipponen și col (38) în provinciile nordice ale Finlandei pe o cohortă de 10.366 copii născuți în 1966 au arătat că până în anul 1997, 81 dintre aceștia au fost diagnosticați cu DZ 1. Suplimentarea cu vitamina D, 2000 UI/zi până la 1 an a dus la scăderea incidenței DZ1 cu 80% comparativ cu grupul netratat/tratat sporadic cu vitamina D în următorii 11 ani (38). Influența unor variante genetice asupra apariției DZ1 a fost sugerată de Ogunkolade și col (41) care au arătat că polimorfismele VDR influențează capacitatea secretorie a pancreasului pentru insulină, și de Bailey și col (39) care au evidențiat polimorfismul pentru gena CY P27B1ca sursă pentru susceptibilitatea la DZ1. Creșterea aportului de vitamina D este considerată una dintre cele mai promițătoare căi de prevenire a DZ1, considerându-se că diminuarea statusului vitaminei D în ultimele decade a contribuit la recente tendințe de creștere a incidenței bolii (42). Pe de altă parte Bid și col (43) au studiat relația dintre polimorfismele VDR (FokI, BsmI, TaqI) și riscul de DZ tip 2, distribuția genotipului și frecvența alelelor fiind comparate între bolnavi și grupul control. Autorii constată că acestea nu diferă semnificativ între cele două grupuri în studiu, vârsta medie și parametrii somatici fiind mai îndeaproape asociați, markerii genetici ai afecțiunii fiind în continuare obiect de cercetare.

### **Vitamina D în afecțiunile cardiovasculare**

Este cunoscut că factorii de risc pentru afecțiunile cardiovasculare ale adultului își au originea în

copilarie (44). Repleția cu vitamina D în copilărie și adolescența are potențialul de a ameliora profilul de risc cardiovascular în decada 50 și după (45). Un studiu asupra 3577 adolescenți în USA întreprins între 2001-2004 în cadrul programului National Health and Nutrition Examination Survey (45) a pus în evidență că valorile scăzute ale 25(OH)D s-au corelat cu excesul ponderal, obezitatea abdominală, hiperglicemia și HTA. Calcitriolul are efecte antiinflamatorii manifestate prin inhibiția producției de proteina C reactivă (CRP) și a altor markeri proinflamatori. În insuficiența cardiacă, un studiu pe 93 bolnavi adulți a arătat că suplimentarea cu vitamina D a scăzut nivelul citochinelor proinflamatorii și a crescut producția celor antiinflamatorii, fără însă a influența rata de supraviețuire pe durata studiului (46). Controlul vitaminei D asupra sistemului renină-angiotensină inițial demonstrat experimental (15), a fost validat prin unele date clinice. Astfel, într-un studiu prospectiv pe 4 ani asupra asistentelor medicale din USA (Nurse's Health Study), s-a arătat că riscul de HTA este de 3.18 ori mai mare la persoanele cu valori ale 25(OH)D sub 15ng/ml față de cele cu valori mai mari de 30 ng/ml (47).

### **CONCLUZII**

- Majoritatea populației nu posedă un nivel corespunzător de vitamina D.
- Există variații individuale și etnice ale genelor care codează metabolismul vitaminei D.
- Polimorfisme genetice care afectează obisnuit un singur nucleotid al genelor metabolismului vitaminei D determină variații semnificative ale riscului pentru numeroase boli.
- Variabilitatea genetică poate explica apariția modificărilor rahitice la sugari și copii tratați cu vitamina D și lipsa acestor manifestări la alții care nu au primit deloc vitamina D.

## New benchmarks in the study of biological effects of vitamin D

Sorin Buzinschi, MD, PhD

Medicine Faculty, Transilvania University, Children Clinical Hospital, Brasov

### ABSTRACT

Recent dosage of vitamin D for clinical usage had changed completely the understanding of pathology including its deficit. It was seen that insufficient/ deficit of vitamin D are encountered in the population of developed countries and surprisingly in population that live in warm climate. Only a level of the blood levels of vitamin D may be linked to seasonality, latitude or oral intake. The genetic factors may manifest in all its metabolism process. The genes that influence the vitamin D level are DHCR7, CYP27A1, CYP2R1 and VDR, CYP24A1 and Gc gene. There are presented the steps of vitamin D metabolism as well as the intervention of different genes in the individual network. Through its autocrine function vitamin D facilitates the expression of genes in cell function its action being pleiotropic. There are also listed some of the other disorders apart of rickets that are influenced by the low level of vitamin D.

**Key words:** vitamin D, genes, low level, rickets, chronic disease

Vitamin D [25(OH) D] was discovered in 1920, and its chemical structure in 1932, but rickets, a disease whose deficiency expresses, has a much older history. Sun exposure and vitamin D treatment were long considered effective, prophylactic and therapeutic factors of a solved problem. However, the reappearance of vitamin D deficiency and rickets in recent years, reported in USA, Canada, Germany, England, but also Spain, Greece, Saudi Arabia, Turkey, Egypt, India (1-8) have made vitamin D deficiency to be considered today a worldwide epidemic problem (1,5,8), by affecting in different degrees and different age groups, over 50% of world's population (9). A decisive factor in re-evaluating the status of vitamin D was the possibility of dosage 25(OH)D in clinical laboratories, once the method left the restricted frameworks of research laboratories. Among the factors which determine the status of vitamin D we mention: sun exposure limited to northern latitudes between November and March, increased use of sunscreen to avoid skin neoplasms, and genetic variability. Vitamin D has in recent years proved to be the center of a complex hormonal system of autocrine adjustment which regulates proliferation and cellular differentiation. Vitamin D, directly or indirectly, controls more than 3,000 genes which regulate the metabolism. As skeletal system, it modulates innate immunity, adjusts insulin and renin production, induces apoptosis and inhibits angiogenesis (5). This way 25(OH)D participates in the functioning of immune, cardiovascular and neuroendocrine systems (1,9-11). The deficiency and genetic variations in vitamin's D metabolism that may explain the appearance of rickets signs in children with correct prophylaxis may be involved in adolescence and

adulthood in the appearance of numerous chronic diseases such as: mycobacterial infections (tuberculosis), cardiovascular diseases, diabetes, neoplasms, autoimmune diseases (multiple sclerosis, systemic lupus erythema, psoriasis) (9,11). Based on these considerations, vitamin D has now become a very active research field. Only in the first 9 months of 2010 over 2,300 articles on this subject have been published (10).

### SUMMARY OF VITAMIN D PHYSIOLOGY

Vitamin D is found in two forms: vitamin D<sub>2</sub> or ergocalciferol (calciferol) produced by irradiation of yeast or by some herbals and vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) produced by photoconversion of cutaneous hydrocolesterol 7 (7-DHC) after RUV or artificial solar radiation exposure. The amount of vitamin D in food is very low. Industrial 25(OH)D is produced starting from lanolin. From 7-DHC vitamin D<sub>3</sub> passes through a series of changes until it becomes the active metabolite 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> which is afterwards degraded in inactive composites.

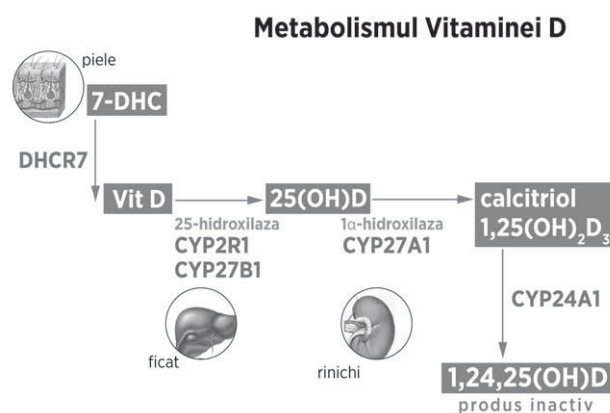
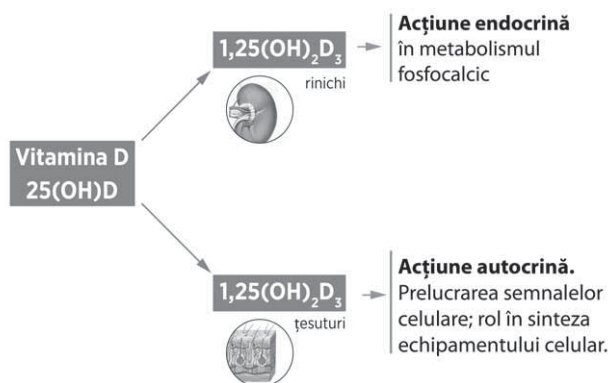


Figure 1. Vitamin's D metabolism stages

Vitamin D has two main types of actions:

- **Endocrine**, which regulates Ca metabolism, vitamin D<sub>3</sub> being produced from intrarenal synthesis
- **Autocrine**, in which the hydroxylation of colecalciferol is produced in tissues, resulting in calcitriol with intracellular action, undetectable as circulating product, having as a characteristic genes' facilitation or intracellular metabolites traffic.



**Figure 2.** Systemic and local formation of vitamin D and specific effects

The assimilation of vitamin D as a hormone, long anticipated (by Luke, cit12), is based on following arguments:

- It is produced by an organ (kidneys)
- Circulates to target tissues
- Interacts with specific cellular receptors
- Triggers specific responses (Ca absorption)

## VITAMIN'S D METABOLISM AND ITS GENETIC DETERMINISM

A team of researchers from the SUNLIGHT Consortium (Study of Underlying Genetic Determinants of Vitamin D and Highly Related Traits) have analyzed the concentrations of 25(OH)D in 33,996 adult subjects of European descendents in 15 cohorts and showed that the presence of some alleles can double the risk of vitamin D (13) insufficiency. The genes in question (DHCR7 (NADSYN1), CYP2R1 and GC) are involved in cholesterol synthesis, hydroxylation and transport of vitamin D. The concentrations 25(OH)D, the accepted biomarker of vitamin D is higher in summer and lower in winter. Only 25% of its inter individual variations may be related to season, latitude, or exogenous intake of vitamin D (8). Results of studies conducted on twins and on families suggest that genetic factors contribute substantially to this vari-

ability, which may amount to over 53% (14)(48). These data may explain why some children respond positively to vitamin D intake and others not, as we see in everyday practice.

### The formation of colecalciferol

During sun exposure, RUV is absorbed by 7-dehydrocholesterol (7-DHC) found in the membranes of keratinocytes and fibroblasts; after a process of photoconversion provitamin D<sub>3</sub> is formed or colecalciferol which is ejected in the extracellular space and transported to the liver by a carrier protein (9) (15). Although vitamin D synthesis from 7-DHC is a physical-chemical process, cholesterol synthesis starting from 7-DHC has a biochemical nature, mediated by an enzyme 7-DHC reductase, determined by the gene identified as DHRC7 (NADSYN). Polymorphisms of this gene which determine reduction of cholesterol production, may increase vitamin's D blood levels. Increased cholesterol is accompanied by a decrease in plasmatic 25(OH)D values probably out of extra genetic reasons.

### The formation of Hydroxycolecalciferol (calciferol or calcidiol), 25(OH)D

In liver the colecalciferol is hydroxylated in 25<sup>th</sup> position to form 25(OH)D; the reaction is catalyzed by 25-hydroxylase, enzymes of cytochrome P450 having microsomal localization (CYP2R1) and mitochondrial (CYP27A1) in hepatocytes. The Calcidiol is the major vitamin D metabolite; although it has no intrinsic activity it is used to determine blood levels of vitamin having into account the halving time up to approximately 15 days and the fact that its value increases proportionally with the exogenous intake of vitamin D (10)(15). In patients with low levels of 25(OH)D were identified 2R gene mutations, being genetic evidence that the enzyme CYP2R1 is the key enzyme of 25-hydroxylase (16).

### Vitamin D carrier protein (DBP or Gc)

It ensures plasma circulation of 25(OH)D, common genetic variants can differentiate plasma response to exogenous intake of vitamin D (13). Lauridsen and col (17) have identified phenotypes involved in blood variations of vitamin D in 595 adults. The survey data showed that Gc concentration is an independent predictor of 1,25(OH)<sub>2</sub>D, while the Gc phenotype is a significant indicator of 25(OH)D concentration. In a study that included 4501 adults of European origin, the USA, Ahn and col (18) identified among the causes of an inade-



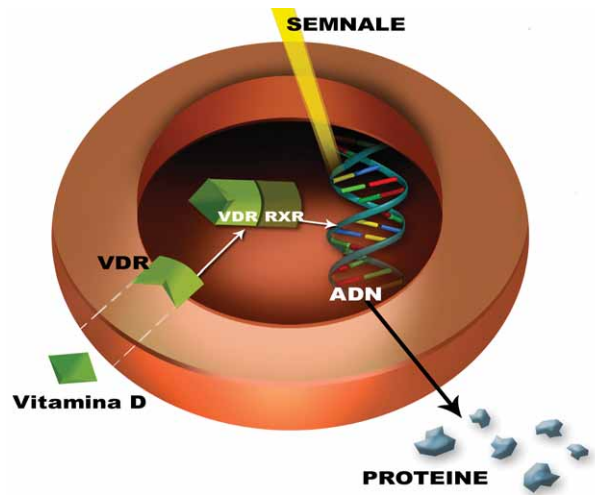
quate response to vitamin D, a single nucleotide polymorphism (SNP) of the gene that codes Gc on the chromosome 4q12-13 and SNP DHCR7. The polymorphism for Gc may have the greatest impact on blood levels of vitamin D (8).

**The formation of 1,25-dihydroxycholecalciferol [1,25 (OH) 2 D], calcitriol**

The main stage of the active form of vitamin D, calcitriol, takes place mainly in kidneys, but numerous other tissues and organs have capable cells to produce 1,25 (OH)<sub>2</sub>D (lung, colon, prostate, pancreatic β cells, monocytes, parathyroid cells) (9) (10)(11)(15). In kidneys the reaction of formation of 1,25 (OH)<sub>2</sub>D is catalyzed by 1α hydroxylase an enzyme of cytochrome P450 (CYP27B1), located in the proximal renal tube cells. The production of calcitriol is close regulated by 1α hydroxylase activity, which in turn is stimulated by hypocalcemia, the increase of PTH and decrease of plasma levels of its precursor, the calcidiol(9) (15).

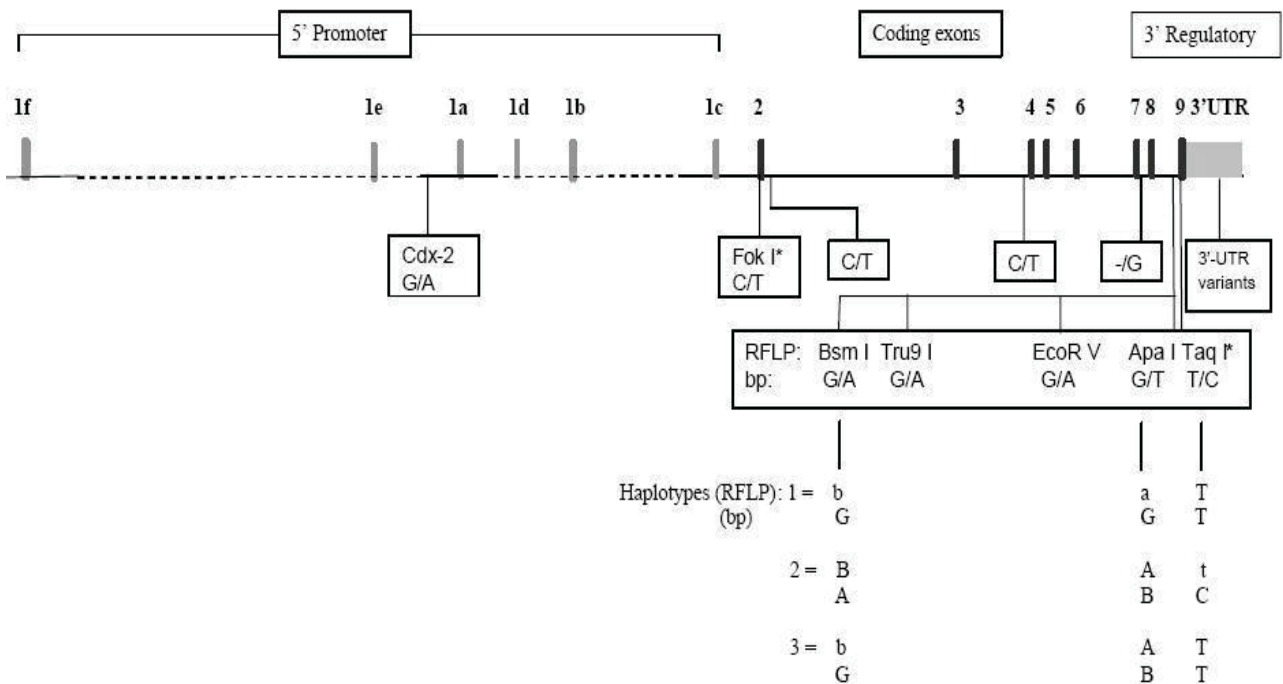
**The interaction of 1,25 (OH)<sub>2</sub>D with vitamin D receptor (VDR)**

An important part of calcitriol actions are mediated by a nuclear transcription factor, VDR. This, together with vitamin D binds to RXR (retinoic acid X receptor) and to vitamin’s D response elements to initiate regulation of specific genes (10) (Figure 3).



**Figure 3.** Schematic representation of VDR’s role in cell nucleus

VDR has attracted many researchers’ attention, being considered a key point in response variations towards 24(OH)D. There are different allelic variants (polymorphisms) of the VDR gene on the chromosome 12 which occur naturally in the population and which have been linked to rickets, vitamin D resistance, hyperparathyroidism but also with susceptibility to infections, autoimmune diseases and cancer (15)(19)(20)(21). Although in nutrigenomic it is accepted that certain polymorphisms bear host more sensitive to certain diseases even in the presence of that nutrient, in terms of vitamin D and Ca intake, the conditioning is not clear (22).



**Figure 4.** Genomic structure of VDR and the position of the polymorphisms known after Fang, 2005

**Table 1.** VDR polymorphism in children with rickets

Authors	Genetic VDR transformations	Signification
Bora, Orzan, col, 2008 (22)	Polymorphism of FokI, TaqI, ApaI genes in ill patients, high frequency of ApaI alleles, frequent Tt and reduced Aa incidence	VDR polymorphisms important factor in deficiency rickets in Turkey
Baroncelli, Bereket, col, 2008 (23)	F alleles increased incidence, BB genotype associated with low levels of 25 (OH) D	Increased incidence of F allele predisposition to rickets in Turkey, Egypt.
Ismail, Erfan, col, 2011 (24)	F alleles (FokI) increased incidence, VDR combination types for FokI, ApaI, TaqI different from control	Positive relationship between VDR's polymorphism gene and susceptibility to rickets in Egypt
Arabi, Zahed, col, 2009 (25)	BsmI and TaqI polymorphisms	VDR polymorphisms influences skeletal apposition to healthy teenager girls in Lebanon
Fischer, Thacher, col, 2000 (26)	F alleles (FokI) low incidence, FF genotype relatively high	Different frequencies of alleles, combinations of genotypes have not been different from control group in Nigeria.
Lu, Li, col 2003 (27)	FokI alleles and FF genotype, increased incidence	Association between VDR's polymorphism gene and rickets by vitamin D deficiency in China
Gong, Li, col, 2010 (28)	F (FokI) alleles and FF genotype increased incidence, correlated with low levels of 25 (OH) D	VDR's polymorphism gene plays an important role in the development rickets by vitamin D deficiency. China
Xi, Yang, col, 2005 (29)	No significant differences in VDR's and alleles genotype distribution	VDR's polymorphism gene may not be important in individual susceptibility to vitamin D deficiency
Kanedo, Urnaa, col, 2007 (30)	VDR polymorphism by BsmI, ApaI and TaqI alleles BsmI, ApaI and TaqI no significant difference from the control group	VDR's polymorphism gene does not play an important role in the development of rickets in Mongolia

In various studies on children with rickets in different geographic areas the VDR genotype has been studied (FokI, TaqI, ApaI) or various other options in trying to define the risk configuration.

The observations, according to which rickets or low levels of vitamin D occur in expected situations at normal levels due to high solar radiation exposure, came as a big surprise for researchers and practitioners. Studies conducted in countries where there is a significant pathology of rickets failed to show clearly whether there is a hereditary susceptibility of children for this disease. A meta-analysis of literature data on the relationship between polymorphisms for a single nucleotide (SNP) and serum concentrations of 25 (OH)D have identified the involvement of Gc, VDR and CYP27B1, suggesting that the individual genetic architecture can determine the level of vitamin D (31). Some data indicate that certain polymorphisms of VDR can be determinant for osteoporosis, fractures and muscle tone adult pathology (BsmI, FokI) (Barr-bibl.), which configures the existence of a particular genetic profile of a group/subgroup of individuals. It may be a summative result because both (15) and Uitterlinden and col (32) believe that alleles BsmI, ApaI, TaqI have no effect on the level of expression nor on the activity of the formed protein VDR. To note that, some laboratories in our coun-

try can determine polymorphisms FokI, B/b to identify the genotype associated with low bone density and fracture risk for risk groups.

Once the classical actions, hormonal type of vitamin D are well known and the involvement of target organs (intestines, skeleton, kidney, parathyroid) is widely described in the treaties of physiology, we will approach more fully the effects of autocrine/paracrine of 25(OH)D.

## TISSUE SPECIFIC ACTIONS OF VITAMIN D

30 years ago it has been revealed that most tissues and body cells possess nuclear vitamin D receptor (VDR). Thus, cells in the brain, skeletal muscles, heart, smooth muscles, skin, pancreatic  $\beta$  cells, immune system cells (macrophages, dendritic cells, B and T lymphocytes) have VDR. It has also been noted the extra renal presence of 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) in some tissues (colon, prostate, dendritic cells, skin, etc.), representing the necessary device for formation and local use of vitamin D (10)(11)(15). The usage of 25(OH)D in the regulation of biological processes was relevant for: cell growth suppression, regulation of apoptosis, modulation of immune response, control of skin differentiation and function, control of renin-angiotensin system, control of insulin secretion, control

of muscle function, control of some neuronal functions.

All these functions of vitamin D have potential clinical applications. In a global estimation the produced or worsened disorders by low levels of vitamin D are represented in Table 2.

**Table 2.** Disorders produced or worsened by lack of vitamin D, as Heaney, 2008 (11)

Disorder	Level of evidence
Osteoporosis	++++
Fractures	++++
Sugar Diabetes type 1	++
Cancer	++++
Autoimmune Diseases	++
HTA	+++
Periodontal diseases	++++
MS	++
Susceptibility/poor response to infections	++++
Osteoarthritis	++

Note: + + + + means strong evidence through one or more randomized trials; + + + strong and consistent epidemiological data but without the evidence of randomized trials, + + less strong evidences but suggestive.

### Vitamin D and immune system

Immune system's functioning modulation by vitamin D is proven by the presence of VDR in the activated human immunocyte, through the ability of these cells to produce calcitriol and by its role in inhibition, proliferation of T cell (10). A causal relationship has been proved between cellular functioning of the complex  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR and innate and adaptive immunity against infections. In florid rickets respiratory infections are encumbered with great severity and mortality, recurrent infections are also a component of evolution of Deficiency rickets. Changes of VDR functioning by alleles expression may influence susceptibility to mycobacterial or viral infections (15). Numerous studies have shown different ways of involvement of vitamin D in infectious processes. Thus, Camargo and col (33) found an inverse relationship between vitamin D levels in umbilical cord and respiratory infections incidence at ages of: 3 months, 15 months, 3 to 5 years. A randomized, double-blind, placebo-controlled study conducted in Japan by Urashima and col in 2010 (34) showed that school children's supplementation with 1200 IU / day vitamin D in winter has decreased the incidence of A virus infection from 18.6% to 10.8% in the treated group. Cathelicidin secretion, natural antibiotic from peptides antimicrobial group is dependent on induction of CYP27B1 and VDR activation (35)

(36), its action being demonstrated on the intracellular pathogens like Mycobacterium tuberculosis (10). This may explain the favorable effect of sun exposure in patients with TB, the more rapid healing with vitamin D supplementation during antibiotic treatment and variable genetic susceptibility to TB infection by genetic polymorphism of the VDR (Fokl ff genotype in Asian subjects) (37). The overall effect of  $25(\text{OH})\text{D}$  on adaptive immunity is of an inhibitor type by decreasing the production of antibodies, limitation of B lymphocytes differentiation into plasma, promoting Th2 cell function and inhibition of Th1 responses (15). In psoriasis antiproliferative ability of vitamin D was proven by the effect on skin lesions caused both by sun exposure and by topical vitamin D treatment (9)(10)(15). Experimental studies have shown that  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  has the ability to inhibit the development of immune encephalomyelitis, the thyroiditis, type 1 diabetes, inflammatory bowel disease as well as other autoimmune diseases. Translation of these data in human medical practice is not a linear process and requires further research.

### Vitamin D and diabetes mellitus (DM)

The role of vitamin D as autocrine insulin secretion regulator certified by CYP27B1 ( $1\alpha$ -hydroxylase) activity in pancreatic cells as well as the regulator of apoptosis (15) offers to it valences in preventing Type 1 diabetes (38). Type 1 diabetes experiences a strong diagnosed seasonality, the debut being more frequent in autumn and winter months and having a north-south geographical gradient, suggesting an inverse correlation between the disease and sun exposure (39). Dosage of vitamin D showed significant decreases in  $25(\text{OH})\text{D}$  and in  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  at the moment of compared diagnosis to control cases (39)(40). Surveys conducted by Hipponen and col (38) in the northern provinces of Finland on a cohort of 10,366 children born in 1966 showed that by 1997, 81 of whom were diagnosed with diabetes 1. Supplementation with vitamin D, 2000 IU/day until 1 year resulted in a 80% lower incidence in DM1 compared to the untreated/sporadically treated group with vitamin D in the next 11 years (38). The influence of some genetic variants on occurrence of DM1 was suggested by Ogunkolade and col (41) which showed that VDR polymorphisms influence pancreatic insulin secretor capacity, and Bailey and col (39) which showed polymorphism for the gene CYP27B1 as source for susceptibility to DM1. Increased intake of vitamin D is considered one of the most promising ways to prevent DM1, being considered

that the decrease of vitamin's D status in recent decades has contributed to the recent increasing trends in this disease incidence (42). On the other hand Bid and col (43) studied the relationship between VDR polymorphisms (FokI, BsmI, TaqI) and risk of type 2 diabetes, genotype's distribution and allele frequency were compared between patients and control group. The authors found that they did not differ significantly between the two groups in the study, average age and somatic parameters are more closely associated, genetic markers of the disease being still the subject of research.

### Vitamin D in cardiovascular disorders

It is known that the risk factors for cardiovascular disorders in adults have their origins in childhood (44). Vitamin D depletion in childhood and adolescence has the potential to improve cardiovascular risk profile in the 50<sup>th</sup> decade and after (45). A study undertaken on 3577 adolescents in the USA between 2001-2004 in the National Health and Nutrition Examination Program Survey (45) has revealed that low levels of 25(OH)D were correlated with overweight, abdominal obesity, hyperglycemia and HTA. The calcitriol has anti-inflammatory effects manifested by inhibition of production of C-reactive protein (CRP) and other pro-inflammatory markers. In heart failure, a study of 93 adult pa-

tients showed that vitamin D supplementation decreased the proinflammatory cytokines and increased the production of inflammatory ones, but without influencing survival rate during the study (46). Control of vitamin D on the renin-angiotensin system initially experimentally demonstrated (15) was validated by some clinical data. Thus, a 4-year prospective study of U.S. nurses (Nurse's Health Study), showed that the risk of HTA is 3.18 times higher in people with values of 25(OH)D below 15ng/ml compared to those with values higher than 30 ng/ml (47).

### CONCLUSION

- The majority of the population does not possess the right level of vitamin D
- There are also individual variation as well as ethnical variation of the genes that code the metabolism of vitamin D
- Genetic polymorphism that affects usually one single nucleotide of vitamin D genes determines important variations of the risk of several diseases.
- Genetic variability may explain the rickets at toddlers and children treated with vitamin D and the absence of these manifestation at others that did not receive at all vitamin D.

### REFERENCES

1. Gordon CM, Feldman HA, Sinclair L, Williams AL, Kleinman PK, Perez-Rossello J, Cox JE Prevalence of Vitamin D Deficiency Among Healthy Infants and Toddlers Arch Pediatr Adolesc Med, 2008, 162, 6, 505-512
2. \*\*\* Vitamin D supplementation: Recommendations for Canadian mothers and infants Paediat Child Health, 2007, 12, 7, 583-589
3. Wagner CL, Greer FR Prevention of Rickets and Vitamin D Deficiency in Infants, Children, and Adolescents Pediatrics, 2008, 122, 5, 1142-1152
4. Shaw NJ Vitamin D deficiency in UK Asian family: activating new concern Arch Dis Child 2002, 86, 147-149
5. Haq A Vitamin D Status Among Emirati Students 2<sup>nd</sup> Biennial Pathology & Laboratory Medicine Abu Dhabi, 17,18 March, 2011
6. Jain V, Gupta N, Kalaivani M, Jain A, Sinha A, Agarwal R Vitamin D deficiency in healthy breastfed term infants at 3 month & their mothers in India: seasonal variation & determinants Indian j Med Res, 2011, 133, 3, 267-273
7. Zitterman A The estimated benefits of vitamin D for Germany Mol Nutr Food Res, 2010, 54,8,1164-1171
8. Gomez Q The paradox of vitamin D deficiency in sunny regions Rev Osteoporos Metab Miner, 2010, 2,2, 7-9
9. Holik MF Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease Am J Clin Nutr, 2004, 80(suppl),1678S-1688S
10. Anaizi N Rediscovering vitamin D Libyan j Med, 2010, 5,5648,1-8
11. Heaney RP Vitamin D in Health Soc Nephrol, 2008, 3, 1535-1541
12. Popescu V, Arion C Rahitismul Edit Medicala, Bucuresti, 1982
13. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B si col Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study www.thelancet.com 2010
14. Hunter D, De Lange M, Schneider H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker RV, Spector TD genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation J Bone Miner Res, 2001,16,2,371-378
15. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolski E Vitamin D Am J Renal Physiol, 2005, 289, F8-F28
16. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW Genetic evidence that human CYP2R1enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101, 7711-7715
17. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heikendorf L, Mosekilde L, Nexø E Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype Gc (vitamin D binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women Calcif Tissue Int, 2005, 77,1,15-22
18. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC si col Genome-wide association study of circulating vitamin D levels Hum Mol Genet, 2010,1,19,13, 2739-2745
19. Barr R, MacDonald H, Stewart A, McGuigan K, Rogers A, Eastell R, Felsenberg D, Gluer C, Roux C, Reid DM Association between vitamin D receptor gene polymorphism, falls, balance and muscle power: results from two independent studies (APOSS and OPUS) Osteoporosis Int, 2010, 21,3,456-466
20. Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, tilgen W, Reichrath J The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in cancer: a review of the literature Anticancer Res, 2009,29,9,3511-3536
21. Pilz S, Tomeschtz A, Ritz E, Pieber TR Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review Nat Rev cardiol, 2009,6,10,621-630
22. Bora G, Ozkan B, Dayangac-Erden D, Erdem-Yurter H, Coskun T Vitamin D receptor gene polymorphism in Turkish children with vitamin D deficient rickets Turkish J Ped, 2008, 50, 30-33
23. Baroncelli GI, Bereket A, Kholly ME, Audi L, Cesur Y, Ozkan B si col Rickets in the Middle East: Role of Environment and Genetic Predisposition J Clin Endocrinol Metab, 2008,93,5,1743-1750

24. **Ismail S, Erfan M, EL-Salam MA, Kamal S, Ibrahim S, Nasr H** Vitamin D Receptor Gene Polimorphism and Growth Pettern in Egyptian Rachitic Children Life Science J, 2011,8,2,120-131
25. **Arabi A, Zahed L, El-Onsi L, Nabulsi M, Maalouf J, Gel-H F** vitamin D receptor gene polymorphisms modulate the skeletal response to vitamin D supplementation in healthy girls Bone, 2009, 45,6,1091-1097
26. **Fischer PR, Thacher TD, Pettifor JM, jorde LB, Eccleshall TR, Feldman D** Vitamin D receptor polimorphisms and nutritional rickets in Nigerian children J Bone Miner Res 2000, 15,11, 2206-2210
27. **Lu HJ, Li HL, Hao P, Li JM, Zhou LF** Association of the vitamin D receptor gene start codon polymorphism with vitamin D deficiency rickets Zhonghua Er Ke Za Zhi /abstr/ 2003, 41,7, 493-496
28. **Gong YG, Li YN, Zhang WH, Liu LJ, Kang XG** Correlation between vitamin D receptor genetic polymorphism and 25-hydroxivitamin D3 in vitamin D deficiency rickets Zhongguo Dang dai Er Ke Za Zhi /abstr/ 2010,12,7,544-546
29. **Xi WP, Yang JP, Li LQ, Zhu QY, Zhou XH** Association of vitamin D receptor gene Apal polymorphism with vitamin D deficiency rickets zhonghua Er Ke za Zhi /abstr/, 2005,43,7,514-516
30. **Kaneda A, Urnaa V, Nakamura K, kizuki M, Seino K, Inose T, Takano T** Vitamin D Receptor Polymorphism among Rickets Children in Mongolia J Epidemiol, 2007,17, 1,25-29
31. **McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW** A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxivitamin D concentrations J Steroid biochem Mol Biol, 2010,121,1-2,471-477
32. **Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP** Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms Gene, 2004, 1,338,2,143-156
33. **Camargo CA, Ingham T, Wickens K, Thadhani R Silvers KM, Epton Mj si col** Cord-Blood 25-Hydroxivitamin D Levels and Risk of Respiratory infection, Wheezig, and Asthma Pediatrics, 2010,127,1,e180-e187
34. **Urashima M, Segawa T, Okazaki M, Kurihara M, Wada Y, Ida H** Randomised trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren Am J Clin Nutr doi: 10.3945/ajcn.2009.29094
35. **Yamasaki K, Gallo RL** Antimicrobial peptides in human skin disease Eur J Dermatol, 2008,18,1, 11-21
36. **Hata TR, Kotol P, Jackson M, Nguyen M, Paik A, Udall D si col** Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals J Allergy Clin immunol, 2008,122,4,829-831
37. **Gao L, Tao Y, Zhang L, Jin Q** Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis Int J Tuberc Lung Dis, 2010,14,1,15-23
38. **Hyponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM** Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study Lancet 2001,3,358,9292,1500-1503
39. **Bailey R, Cooper J, Zeitels L, Smyth DJ, Yang JHM si col** Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes Diabetes, 2007,56,10,2616-2621
40. **Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LMB** Significant Vitamin D deficiency in Youth with Type 1 Diabetes J Pediat, 2009, 154,1,132-134
41. **Ogunkolade BJ, Boucher BJ, Prah J, Bustin SA si col** Vitamin D receptor (VDR)mRNA and VDR Protein Levels in relation to Vitamin D Status, Insulin Secretory Capacity, and VDR Genotype in Bangladeshi Asians Diabetes,2002,51, 2294-2312
42. **Hipponen E** Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association ? diabetes Obes Metab, 2010, 12,9, 737-743
43. **Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG, Gautam S si col** Vitamin d receptor (FokI, BsmI, TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: A North Indian study Ind J Med Sci, 2009,63,5,187-194
44. **Buzinschi S** ....
45. **Reis JP, Muhlen D, Miller E, Michos ED, Appel LJ** Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk in the United State Adolescent Population Pediatrics, 2009,124,e371-e379
46. **Schleithoff AA, Zitterman A, Tenderich G, Berthold HK si col** Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a cohort duple-blind, randomized, placebo-controlled trial Am J Clin Nutr, 2006, 83, 754-759
47. **Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA si col** Plasma 25-hydroxivitamin D levels and risk of incident hypertension Hypertension, 2007,49,1063-1069
48. **Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, Massaro JM si col** Genetic and non-genetic correlates of vitamin K and D Eur J Clin Nutr, 2009, 63,4, 458-464