



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE e CHIRURGICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,
CLINICHE E SPERIMENTALI

Indirizzo: Metodologia Clinica e Scienze Endocrinologiche

CICLO XXIV

Tesi:

Vitamina D e tessuto adiposo: quali possibili interazioni?

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisore :Ch.mo Prof. Franco Mantero

Tutors: Ch.mo Prof. Giovanni Luisetto

Dr.ssa Valentina Camozzi

Dottorando: Dr.ssa Francesca Sanguin

RIASSUNTO

Introduzione: Recenti ricerche hanno suggerito l'esistenza di una correlazione fra massa grassa e livelli sierici di 25OH Vitamina D [Vit D o 25(OH)D]. Non è ancora noto invece se il tipo di grasso corporeo, sottocutaneo o viscerale, possa interferire con lo stato vitaminico D. L'eccesso di adiposità centrale talora si associa all'insulino-resistenza (IR), la quale a sua volta sembra essere condizionata anche dai livelli di Vitamina D. Scopo del nostro studio è valutare i livelli di Vit D ed l'indice di IR, HOMA, dopo carico orale di colecalciferolo in soggetti con diverso Body Mass Index (BMI) e diversa distribuzione del grasso corporeo.

Casistica: sono state reclutate 61 donne sane che non assumevano terapie interferenti con il metabolismo osseo, suddivise in base al BMI in N (= 20, BMI < 25, età 48,6+/-10, 8), S (= 21, BMI > 25<30 età media: 50,2+/-12,1), O (= 20, BMI > 30, età media 51,8+/-7,4). Ogni paziente è stata supplementata con 300.000 U di colecalciferolo per os nella stagione invernale e sottoposta ad analisi della composizione corporea con densitometro a raggi X con valutazione della sub-regione addominale R1, questionario alimentare e dosaggio di Vit D, 1,25 di-idrossivitamina D [(1,25(OH)₂D)], Paratormone (PTH), glicemia e insulinemia, per calcolo dell'indice HOMA, al basale (T0) e dopo 7 (T1), 30 (T2) e 90 giorni (T3) dal carico.

Risultati: i valori della Vit D basali erano ridotti nei tre gruppi ma significativamente più bassi in O (p=0,04), nel gruppo O il PTH risultava significativamente più elevato (p=0,04) e la 1,25(OH)₂D più bassa (p=0,004). WC e R1 erano significativamente differenti nei 3 gruppi; i livelli di glicemia, insulinemia e l'HOMA IR risultavano più elevati nei soggetti in sovrappeso e obesi.

Dopo il carico, la Vit D aumentava significativamente in T1 e T2 (p<0,0001; p=0,002) raggiungendo un picco maggiore nei gruppi N ed S rispetto ad O, in T3 la Vit D era ridotta rispetto a T1 e T2 ma ancora aumentata rispetto al basale. Il PTH si riduceva significativamente in N ed S al tempo T1 (p=0,03; p=0,05), mentre in O i livelli rimanevano pressoché stabili.

La 1,25 (OH)₂D dopo il carico aumentava significativamente in tutti i gruppi in T1 (p=0,008; p<0,0001), raggiungendo livelli più elevati in N. Vi era una relazione inversa fra PTH e Vit D ai limiti della significatività statistica (p=0,07) al basale, mentre diventava statisticamente significativa dopo carico. Analizzando l'andamento della 25(OH)D dopo carico, l'R1 si è dimostrato l'indice predittivo migliore per determinare la risposta della Vitamina D al carico rispetto a BMI e WC. L'HOMA IR dopo il carico aveva un comportamento differente in base al BMI, riducendosi significativamente nei soggetti obesi, con nadir in T2 (p=0,007) per poi tornare a livelli simili al basale in T3.

Conclusioni: In conclusione il nostro lavoro mostra come i livelli di vitamina D dipendano non solo dalla quantità totale (BMI) di grasso ma anche dalla sua distribuzione (R1) essendo maggiormente sequestrata e/o consumata a livello di grasso viscerale. L'indice di insulino-resistenza migliora dopo carico solo nei soggetti obesi, dove il deficit di Vitamina D è più manifesto.

SUMMARY

Introduction: Recent studies have suggested the existence of a correlation between fat mass and serum levels of 25OH vitamin D [Vit D o 25(OH)D]. It is not yet known, however, if the type of body fat, subcutaneous or visceral, can interfere with vitamin D status. Excess central adiposity is associated sometimes to insulin resistance (IR), which in turn appears to be conditioned by the levels of Vit D. The aim of our study is to assess the levels of vitamin D and the index of IR, HOMA, after oral loading of cholecalciferol in subjects with varying body mass index (BMI) and different distribution of body fat.

Case Study: We have recruited 61 healthy women not taking therapy interfering with bone metabolism, divided according to BMI in N (= 20, BMI <25, age 48.6 +/-10, 8), S (= 21 BMI > 25 <30 mean age: 50.2 +/-12.1), O (= 20, BMI > 30, mean age 51.8 +/-7.4). Every patient was supplemented with 300,000 U of oral cholecalciferol in the winter season and subjected to analysis of body composition by x-ray densitometer with assessment of sub-abdominal region (R1), questionnaire of calcium intake and sun exposure; at baseline (T0) and after 7 (T1), 30 (T2) and 90 days (T3) from the load serum Vit D, 1,25 di-hydroxyvitamin D [(1,25(OH)₂D)], Parathyroid hormone (PTH), glucose and insulin (for calculating HOMA index) were determined.

Results: Baseline values of Vit D were reduced in the 3 groups but significantly lower in O (p = 0.04), in O group PTH was significantly higher (p = 0.04) and 1,25(OH)₂D was lower (p = 0.004). WC and R1 were significantly different between the 3 groups, the levels of blood glucose, insulin and HOMA index were higher in overweight and obese patients. After loading, Vit D levels increased significantly in T1 and T2 (p <0.0001, p = 0.002), reaching a peak higher in the N and S with respect to O, in T3 Vit D was reduced compared to T1 and T2 but still increased from baseline. PTH was significantly reduced in N and S at time T1 (p=0,03; p=0,05), while in O remained fairly stable. The levels of 1,25(OH)₂D after loading increased significantly in all groups at T1 (p=0,008; p<0,0001) with the achievement of higher levels in N. There was an inverse relationship between PTH and Vitamin D to the limits of statistical significance (p = 0.07) at baseline, that became

statistically significant after loading. Analyzing the performance of 25(OH)D after load, R1 was the better index to predict the response of vitamin D to the load with the respect to BMI and WC.

The HOMA index after loading behaved differently according to BMI, decreasing significantly in obese subjects, with a nadir in T2 ($p=0,007$) and then return to similar baseline levels at T3.

Conclusions: In conclusion our work shows that vitamin D levels depend not only on the total amount (BMI) of fat but also on its distribution (R1), being most seized and/or consumed at the visceral fat sites. The index of insulin resistance improves after load only in obese subjects, where vitamin D deficiency is more evident.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è aperto un vasto panorama in cui la vitamina D non è più solamente legata al metabolismo fosfo-calcico ma diventa un ormone chiave in diverse patologie metaboliche, immunologiche e neoplastiche (1-3).

Le crescenti evidenze sull'esistenza di una relazione fra stato vitaminico D e peso corporeo hanno dimostrato come la presenza di massa grassa sia inversamente correlata ai livelli sierici di 25 idrossi-vitamina D [25(OH)D]. Soggetti obesi, infatti, hanno una bassa concentrazione sierica di 25 (OH)D rispetto ai non obesi, ma anche nei soggetti non obesi l'adiposità è inversamente correlata con i livelli di vitamina D (4-11).

Tra le diverse ipotesi per spiegare tale relazione, le più accreditate sostengono che gli individui obesi si espongono meno al sole per una limitata capacità motoria e per l'uso di indumenti coprenti, che riducono la possibilità di produzione endogena di vitamina D da parte della cute, o che vi sia una aumentata produzione renale di 1,25 di-idrossivitamina D [1,25(OH)₂D] con conseguente feedback negativo sulla produzione epatica di 25(OH)D, anche se in tal senso i dati non sono univoci; inoltre è stato ipotizzato che vi sia un'aumentata clearance metabolica e/o un aumentato up-take della vitamina D nel tessuto adiposo, che giustificherebbe una bassa biodisponibilità di 25(OH)D in circolo nei soggetti obesi (12-13). Inoltre, il Body Mass Index (BMI) e l'adiposità non sono soltanto stati negativamente correlati con lo stato vitaminico D, ma da alcuni studi emerge che la risposta nei livelli di vitamina D dopo supplementazione possa essere condizionata dal BMI o dall'adiposità, (14-16) con dati talora contrastanti (17-18).

Recenti evidenze hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione fra deficit di vitamina D e sviluppo della sindrome metabolica (SM), infatti alcuni studi mostrano una associazione inversa tra livelli sierici di 25(OH)D e insulino-resistenza (2,4,19-22).

In particolare sembra che un migliore stato vitaminico D sia predittore indipendente di migliore funzione beta-cellulare a livello del pancreas e di migliore controllo glicemico (23).

E' noto che esistono due diversi tipi di tessuto adiposo, quello sottocutaneo e quello viscerale, con differenti caratteristiche endocrino-metaboliche. Numerosi studi dimostrano che gli adipociti viscerali svolgono una maggiore attività endocrina e sono maggiormente correlati con insulino-resistenza e sviluppo della SM (24-25). I meccanismi che contribuiscono allo sviluppo di uno stato di insulino-resistenza sono diversi e comprendono un'aumentata attività iperlipolitica, la produzione endocrina di adipochine, quali adiponectina e citochine infiammatorie (interleuchina 6, Tumor Necrosis Factor α , proteina C reattiva) che a loro volta favoriscono lo stato pro-infiammatorio, pro-trombotico e ipertensivo nell'obesità viscerale (26-29).

Data l'importanza cruciale dell'obesità viscerale nello sviluppo della SM, è quindi fondamentale avere uno strumento che distingua il tipo di grasso e la sua distribuzione a livello addominale.

Nelle classificazioni utilizzate per definire la sindrome metabolica viene sempre considerato almeno un parametro antropometrico per stabilire se vi sia o meno obesità: il BMI e il rapporto vita/fianchi (WHR) nella WHO o la circonferenza vita (WC) nella definizione dell'ATPIII (30).

E' ancora aperto il dibattito su quale fra questi parametri sia il migliore nel rappresentare l'adiposità correlata al rischio metabolico. Uno studio di *Reaven et al.* dimostra come sia il BMI che il WC permettono di individuare i soggetti a rischio di sindrome metabolica (31). Data l'importanza di tale dato, si sono cercate tecniche più sofisticate per la misurazione del grasso ed in particolare per tentare di differenziare l'adiposità di tipo viscerale. Sono state utilizzate la TAC e la RMN, metodiche che, mediante slices a livello ombelicale, riescono a discriminare fra tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale (32).

Tali tecniche tuttavia sono costose, impiegano molto tempo e sottopongono il paziente ad alta dose di radiazioni. Per lo studio della composizione corporea è stata recentemente applicata anche la metodica DEXA (Dual energy X-ray absorptiometry) che si basa sull'attenuazione esponenziale dei raggi X a doppia energia ottenuta durante il passaggio attraverso diversi dei tessuti corporei (ad esempio osso e tessuto molle). E' una tecnica accurata, precisa e con minima dose di radiazione, in grado di stimare non solo il contenuto minerale dello scheletro ma anche la massa magra e la massa grassa, sia di tutto il corpo (total body) che di regioni specifiche (33-36). Il suo limite è di fornire misure bidimensionali che non possono differenziare correttamente il tessuto adiposo viscerale da quello sottocutaneo. Tuttavia la DEXA è usata per stimare il grasso viscerale utilizzando la regione del tronco (standard) o definendo manualmente una sotto-regione a livello addominale. Tali regioni hanno mostrato una buona correlazione con la TAC nel misurare l'adiposità addominale, tanto che la DEXA può rappresentare una buona alternativa alle altre tecniche di imaging (37-38).

SCOPO dello STUDIO

Nel nostro lavoro abbiamo analizzato una popolazione di soggetti volontari sani con differente BMI e differente distribuzione del grasso corporeo per valutare se la quantità e la distribuzione del grasso possano condizionare in modo differente lo stato vitaminico D e l'indice di insulino-resistenza al basale e dopo carico orale di colecalciferolo.

CASISTICA

Sono stati reclutate 61 donne volontarie sane paragonabili per età e suddivise in base al BMI in 3 gruppi:

20 soggetti normopeso (BMI <25)

21 soggetti sovrappeso (BMI >25<30)

20 soggetti obesi (BMI ≥30)

METODI

Per ogni soggetto sono stati valutati al basale (T0):

- 1) Peso, altezza e BMI ($\text{peso}/\text{altezza}^2$), misura della circonferenza vita (WC): è stata valutata con misurazione soggettiva a livello dell'ombelico; la presenza di obesità centrale è stata considerata secondo i criteri dell'ATPIII, ovvero $WC >88$ cm per la donna; misura del rapporto vita/fianchi (WHR): è stata calcolata dal rapporto fra misura della circonferenza vita e la misura della circonferenza a livello dei fianchi, intesa come maggiore diametro del bacino visto dal davanti;
- 2) misurazione della pressione arteriosa: paziente in posizione seduta, a riposo da 10 minuti di riposo, ripetuta 2 volte e considerata la media fra le 2 misure;
- 3) anamnesi alimentare mediante questionario autosomministrato per valutare l'introito giornaliero di calcio - punteggio da 0 a 9; >7 introito sufficiente- e l'esposizione solare - punteggio 1= ≤ 20 minuti/die; 2= $20-40$ minuti/die; 3= >40 minuti/die da Marzo a Settembre-, secondo questionari validati in letteratura (39-40).

I soggetti sono stati sottoposti, durante la stagione invernale, a prelievo di sangue venoso per il dosaggio al basale (T0) di 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, paratormone (PTH), calcemia (Ca) e fosforemia (P), glicemia e insulinemia a digiuno.

Ad ogni paziente sono state quindi somministrate 300.000 U di colecalciferolo per os in unica dose su supporto solido a stomaco pieno.

Un prelievo di sangue è stato raccolto dopo 7 (T1), 30 (T2) e 90 (T3) giorni dal carico e sono stati dosati i livelli di 25OHD, 1,25(OH)₂D, PTH, glicemia e insulinemia. Come indice di insulino-resistenza è stato utilizzato l'Homeostatic Model of Insulin Resistance (HOMA IR) calcolato mediante l'equazione (41): $\text{HOMA IR} = \text{Insulinemia} \times \text{Glicemia} / 22,5$

Al basale è stata eseguita, previo consenso, una densitometria ossea con tecnica DEXA con scansione Total Body per analisi della composizione corporea; in particolare è stata effettuata

l'analisi manuale della sotto-regione a livello addominale che corrisponde al box R1, formato da 3 pixels al di sopra della linea delle creste iliache.

Tale box è stato già usato in letteratura nello studio di *Snijder et al.* (38; Figura 1) e si è dimostrato attendibile nella stima dell'adiposità viscerale quanto quella rilevata dalla TAC.

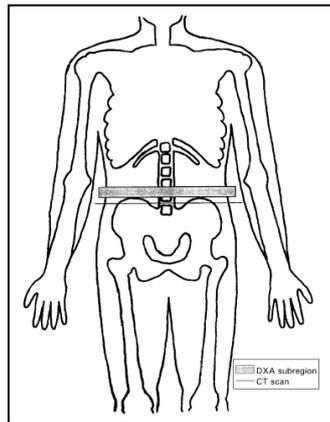


Figura 1: Localizzazione della sotto-regione addominale da DEXA e da TAC per misurare il grasso addominale

Il PTH è stato dosato con test LIAISON[®] N-tact[™]PTH che impiega la tecnologia della chemioilluminiscenza (CLIA) in un saggio immunologico per la determinazione quantitativa del paratormone umano intatto nel siero (detection limit –DL-10 pg/ml, inter- e intra-assay coefficient of variation-CV- 4% e 3.5%); la 25OHD è stata dosata con metodo immunologico diretto competitivo CLIA con test LIAISON[®] 25OH vitamin D total per la determinazione quantitativa della 25-OH vitamina D totale nel siero (DL 1.5 nmol/L; inter-intra assay CV9%); la 1,25 di-idrossivitamina D è stata misurata con il kit 1,25-Di-hydroxyvitamin D RIA IDS[®] kit (DL 5 pmol/L; inter-e intra-assay CV 8.6-16.6% e 11.9-20%); glicemia e insuline mia sono stati dosati con i comuni metodi di laboratorio. L'analisi della composizione è stata eseguita con apparecchio Discovery HOLOGIC QDR Delphy. Il coefficiente di variazione è stato misurato, in vitro, ed è risultato pari a 0,6%; in vivo la riproducibilità è stata misurata ripetendo la scansione 2 volte, nell'arco di una settimana, a 10 volontari sani: il CV è risultato pari a 1,2%. Sono state eseguite le comuni statistiche descrittive per ogni parametro utilizzando il programma PRISM 3.0 della GRAPH PAD (CA, U.S.A.).

La differenza fra i due gruppi è stata calcolata secondo il metodo non parametrico di t test per dati non appaiati; per valutare le differenze dei parametri misurati dopo carico è stato usato il metodo del t test per dati appaiati; il livello di significatività è stato stabilito a $p=0,05$. Le relazioni fra i parametri più significativi sono state analizzate mediante test di Kruskal Wallis con programma

SAS. La qualità della stima del modello statistico valutato è stato misurato con il Test di verifica delle informazioni di Akaike.

RISULTATI

Le caratteristiche antropometriche ed i risultati al basale (T0) della nostra casistica sono riassunte in Tabella 1.

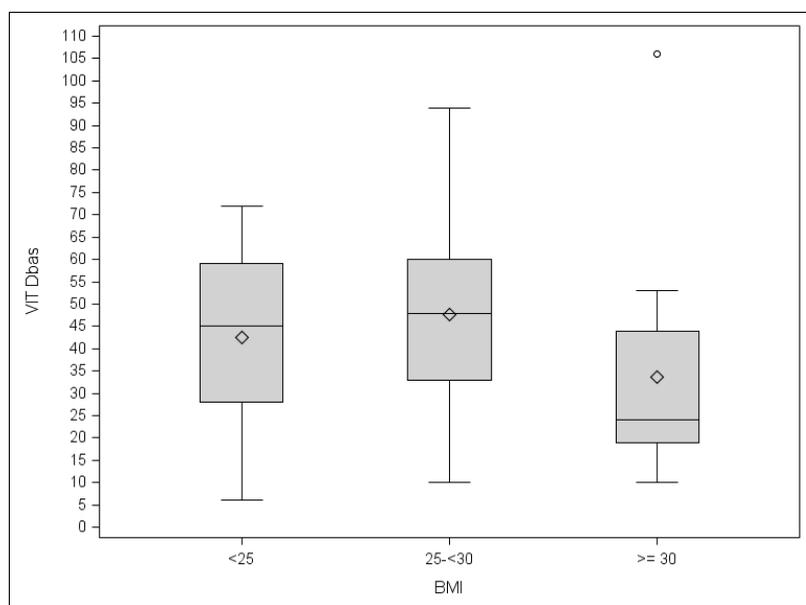
	Normopeso (a)	Sovrappeso (b)	Obesi (c)	valore di p
Nr soggetti	20	21	20	Ns
Età (ys)	48,6+/-10,8	50,2+/-12,1	51,8+/-7,4	Ns
BMI (Kg/m²)	21,6+/-1,7	26,4+/-1,2	33,6+/-4,2	p=0,0005*;p<0,0001**
nWC (cm)	78,3+/-7,3	86,4+/-5,6	103,5+/-11	p=0,0005*;p<0,0001**
WHR	0,82/-0,1	0,8+/-0,07	0,9+/-0,09	p=0,0005*;p<0,0001**
PTH(pmol/L)	63,5+/-26,3	81,3+/-59,3	89,9+/-39,7	p=0,04*
25(OH)D(nmol/L)	43,1+/-19,8	48,3+/-21,9	35,9+/-22	p=0,04*
1,25 (OH)₂D(pmol/L)	102,6+/- 40,6	91+/-65	73+/-33	p= 0,004*
Ca(nmol/L)	2,3+/-0,1	2,3+/-0,1	2,2+/-0,15	Ns
P(nmol/L)	1,2+/-0,2	1,1+/-0,2	1,2+/-0,2	Ns
Glicemia (mmol/L)	2,3+/- 0,15	4,8+/-0,87	5,4+/-1,16	p=0,017*, p=0,0008**
Insulinemia (mmol/L)	4,6+/-4,5	6,9+/-5,2	11,3+/-6	p=0,015*, p=0,0006**, p=0,03***
HOMA IR	0,88+/-0,99	1,71+/-1,5	2,89+/-1,18	p=0,004*p=0,02** p=0,0001***
%Fat	28,6+/- 4,4	35,3+/-5,7	40,5+/-4,3	p =0,0003*p=0,04** p<0,0001***
%trunk	25,6+/-6	35,7+/-6,7	40,6+/-5,3	p<0,0001*, p=0,0002**
%R1Fat	31,4+/-7,7	39,9+/-7,8	44,2+/-5,5	p=0,02*; p=0,005**
Introito calcico (score >7)(%)	10/20 (50)	11/21(52)	13/20(65)	Ns
Esposizione al sole(%)	1:3/20(15) 2:11/20(55) 3:6/20(30)	1:0/21 2:14/21(67) 3:7/21(33)	1:3/20 (15) 2:12/20 (60) 3:5/20 (25)	Ns

Tabella 1: caratteristiche antropometriche e biochimiche della nostra casistica al basale . BMI= body mass index (kg/m²); WC= waist circumference; WHR= waist-to-hip ratio; PTH= paratormone (vn 16-8pmol/L); 25(OH)D= 25 idrossi-vitamina D (sufficienza>50 nmol/L); 1,25(OH)₂D= 1,25 dihydroxyvitamin D (43-148 pmol/L); HOMA IR= homeostatic model of insulin resistance, calcolato come: [Insulina x Glicemia] /22,5, vn <2; Esposizione solare :punteggio 1=<20 minuti/die; 2=20-40 minuti/die; 3= >40 minuti/die da Marzo a

Settembre; %fat= percentuale di grasso totale; %trunk= percentuale di grasso troncature; % R1fat= percentuale di grasso in R1

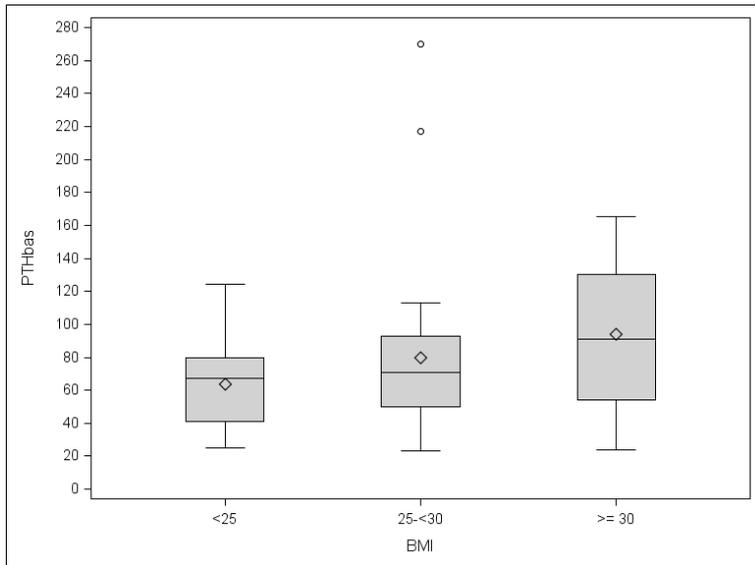
BMI: *a vs b; **b vs c, a vs c; WC*a vs b; **b vs c, a vs c; WHR *a vs b; **b vs c, a vs c; PTH * a vs c; 25(OH)D: *b vs c; 1,25(OH)₂D *b vs c; glicemia: *a vs b, **a vs c; insulinemia: *a vs b, ** a vs c, *** b vs c; HOMAIR: *a vs b, ** b vs c, ***a vs c; % Fat: *a vs b, ** b vs c, ***a vs c; % trunk * a vs b, a vs c; ** b vs c; %R1 Fat: a vs b; **b vs c

Al basale tutti e 3 i gruppi mostravano livelli di vitamina D ridotti, statisticamente significativi solo nei soggetti obesi (Figura 2); i livelli di PTH tendevano ad aumentare con l'aumentare del BMI ma risultavano significativamente più elevati solo nei soggetti obesi (Figura 3); la 1,25(OH)₂D risultava significativamente più bassa nei soggetti obesi (Figura 4).



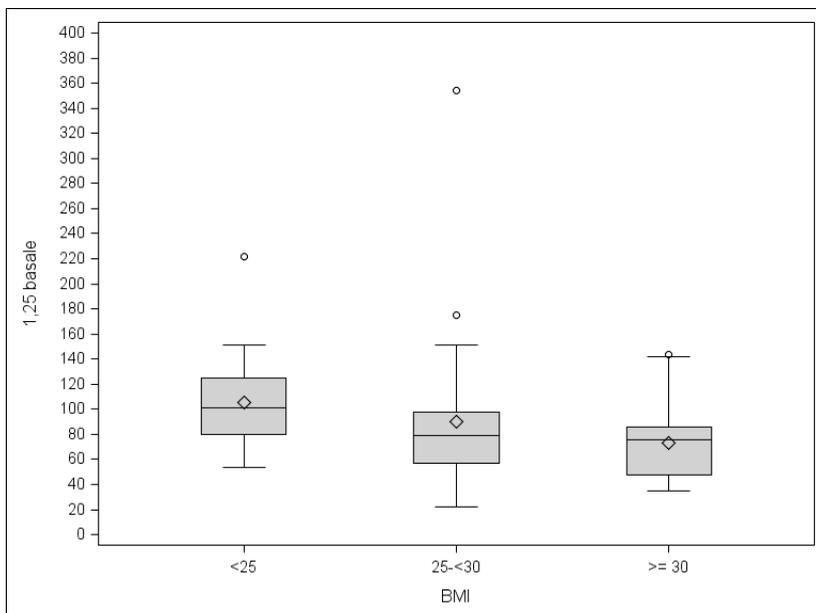
Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	6.1540
DF	2
Pr > Chi-Square	0.0461

Figura 2: distribuzione dei livelli di vitamina D al basale in base a terzili di BMI. Analisi eseguita considerando la mediana. ° = outliers, ◇ = media



Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	4.0461
DF	2
Pr > Chi-Square	0.04

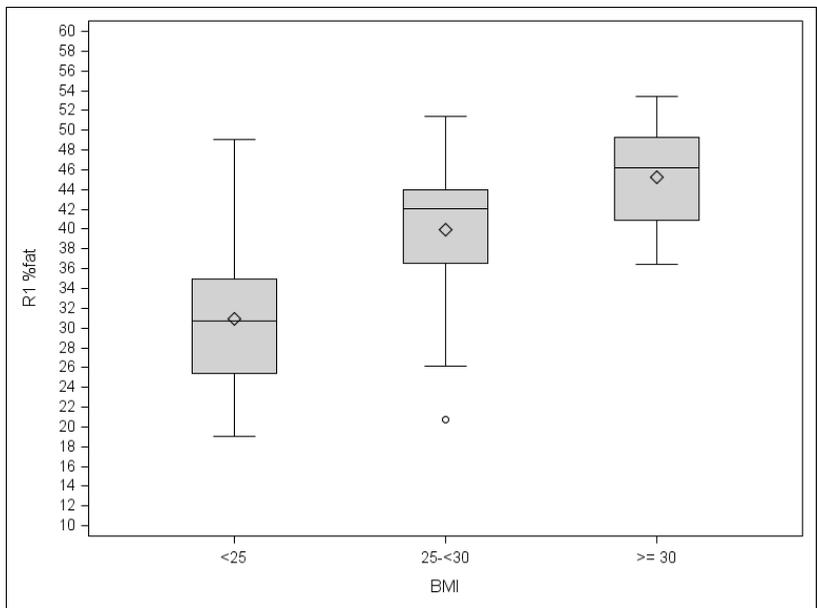
Figura 3: distribuzione dei livelli di PTH al basale in base a terzi di BMI. Analisi eseguita considerando la mediana. ° = outliers, ◇ = media



Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	6.9258
DF	2
Pr > Chi-Square	0.0313

Figura 4: distribuzione dei livelli di 1,25(OH)₂D al basale in base a terzi di BMI. Analisi eseguita considerando la mediana. ° = outliers, ◇ = media

Come atteso gli indici antropometrici diretti ed indiretti di adiposità erano significativamente differenti nei 3 gruppi. Tale differenza statisticamente significativa si confermava anche usando la percentuale di grasso ricavata dal box R1 (figura 5).



Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	22.7615
DF	2
Pr > Chi-Square	<.0001

Figura 5: distribuzione percentuale dei livelli di grasso in R1 in base a terzili di BMI. Analisi eseguita considerando la mediana. ° = outliers, ◇ = media

I livelli di glicemia, insulinemia e l'HOMA IR risultavano significativamente diversi nei 3 gruppi e più elevati nei soggetti in sovrappeso e obesi; in questi ultimi in particolare l'HOMA IR risultava patologico (>2).

L'introito calcico e l'esposizione solare non risultavano statisticamente differenti nei 3 gruppi.

Dopo il carico l'andamento della 25(OH)D è mostrato in Fig.6. La curva mostra come i livelli di vitamina D aumentavano significativamente in tutti e 3 i gruppi raggiungendo però un minore picco nei soggetti O ed S ed una tendenza al progressivo declino di tali livelli dopo 90 gg dal carico (T3) senza tuttavia raggiungere quelli basali. I livelli di vitamina D dipendevano sia dalla variabile BMI che dal tempo.

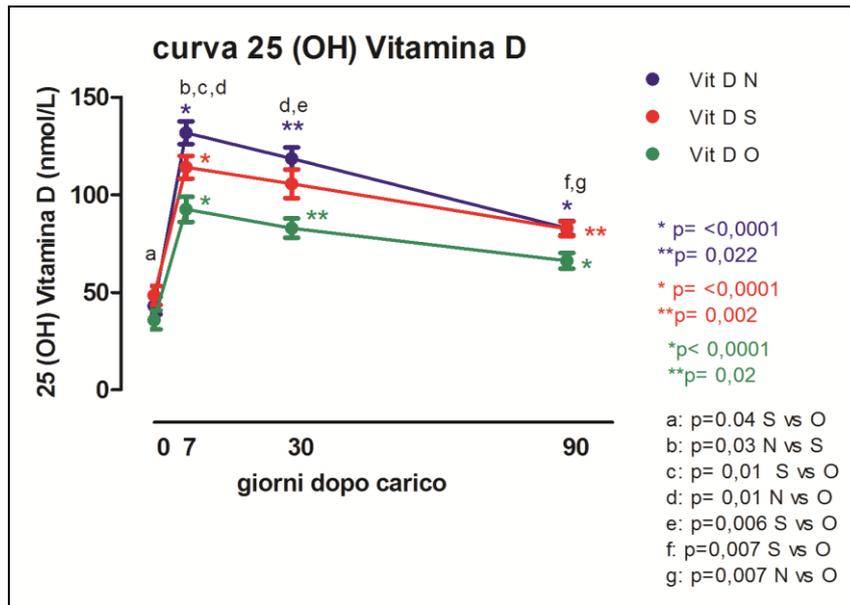


Figura 6: modifica nel tempo dei livelli di 25(OH)D dopo carico di colecalciferolo in base al BMI; N= normopeso (BMI<25), S= sovrappeso (BMI>25<30), O= obesi (BMI >30).

L'andamento dei livelli di PTH dopo carico sono mostrati in Figura 7. Il PTH si riduceva in tutti e 3 gruppi con raggiungimento della significatività statistica solo in N ed S con tendenza poi al ripristino dei valori basali nei tempi successivi. In O i livelli di PTH rimangono pressoché stabili e statisticamente più elevati rispetto ai soggetti normopeso nei 90 giorni dopo il carico.

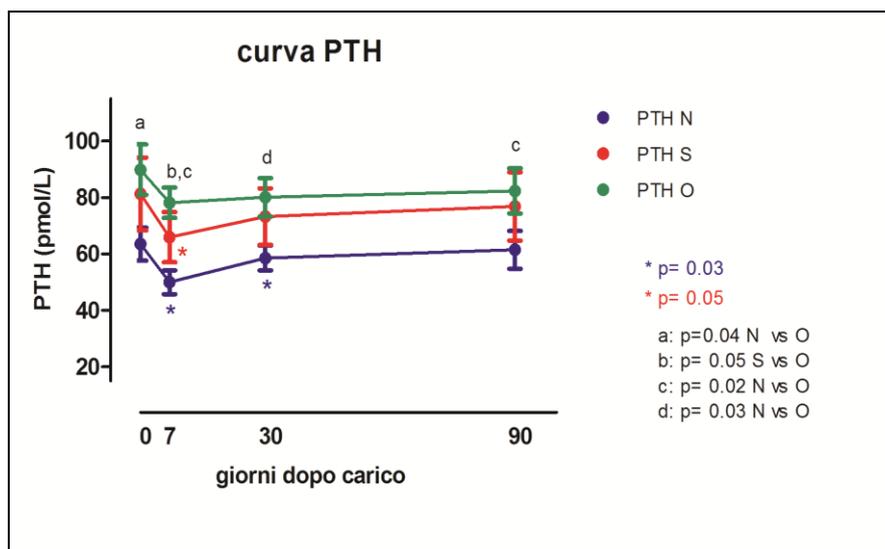


Figura 7: modifica nel tempo dei livelli di PTH dopo carico di colecalciferolo in base al BMI; N= normopeso (BMI<25), S= sovrappeso (BMI>25<30), O= obesi (BMI >30).

L'andamento della 1,25 (OH)₂D dopo il carico è mostrata in Figura 8. Vi era un aumento statisticamente significativo in tutti i gruppi dopo 7 gg dal carico con raggiungimento di livelli maggiori nei soggetti normopeso; si assisteva a progressiva riduzione dei livelli in relazione al tempo ed al BMI.

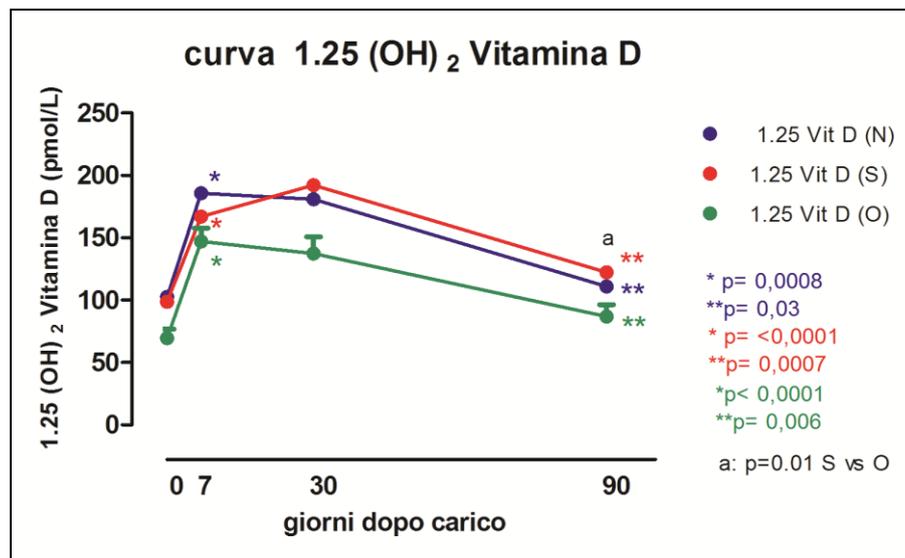


Figura 8: modifica nel tempo dei livelli di 1,25(OH)₂D dopo carico di colecalciferolo in base al BMI; N= normopeso (BMI<25), S= sovrappeso (BMI>25<30), O= obesi (BMI >30)

Analizzando la casistica nel suo complesso vi era una correlazione inversa fra PTH e vitamina D ai limiti della significatività statistica (p=0,07) al basale mentre diventava statisticamente significativa dopo carico in T1 T2 e T3 (p=0,002).

Suddividendo l'intera casistica in base al valore del WC (>o <= di 88cm), l'andamento dei livelli di 25OHD mostrava un picco di vitamina D a 7gg meno evidente nei pazienti con WC patologico e progressiva diminuzione dei livelli in dipendenza del tempo (p=0,04); il PTH tendeva inizialmente a ridursi per poi tornare ai livelli basali nei soggetti con WC normale mentre non subiva modifiche significative nei soggetti con WC patologico (p=0,11).

Analizzando l'andamento della 25 (OH)D dopo carico, l'R1% fat si è dimostrato l'indice predittivo migliore della risposta della vitamina D al carico rispetto a BMI e WC (Tabella 3).

Effetto su Vit D	AIC	P
BMI	2090.9	0.0002
Tempo		<.0001
BMI x Tempo		0.0037
Waist	2099.9	0.0006
Tempo		<.0001
Waist x Tempo		0.0641
R1%fat	2058.0	0.0011
Tempo		<.0001
R1%fat x Tempo		0.0002

Tabella 3: calcolo dell'effetto dei parametri sull'andamento della vitamina D dopo carico; la qualità della stima è stata misurata con il Test di verifica delle informazioni di Akaike (indicato come AIC), l'AIC più basso si associa a migliore predittività.

L'HOMA IR è risultato più elevato nei soggetti sovrappeso e negli obesi rispetto ai normopeso raggiungendo un livello patologico negli obesi. Dopo il carico esso ha un comportamento differente in base al BMI, riducendosi significativamente nei soggetti obesi con nadir dopo 30 gg poi tornare a livelli simili al basale dopo 90 gg dal carico. Le curve dei soggetti normopeso e sovrappeso sono differenti fra loro ma rimangono stabili nel tempo (Figura 9).

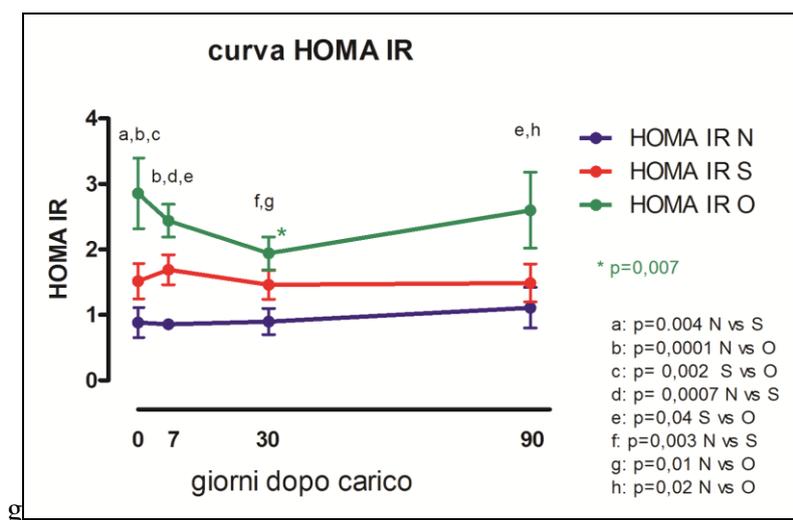


Figura 9: modifica nel tempo dell'Homeostatic Model of Insulin Resistance (HOMA IR) dopo carico di colecalciferolo in base al BMI; N= normopeso (BMI<25), S= sovrappeso (BMI>25<30), O= obesi (BMI >30).

DISCUSSIONE

Il nostro studio conferma il dato già noto della presenza di ridotti livelli di vitamina D in donne di nazionalità italiana provenienti da un'area ad adeguato apporto alimentare di calcio (42-43).

In particolare al basale 59 soggetti su 61 mostravano livelli di vitamina D insufficienti indipendentemente dal loro BMI; uno status vitaminico D sufficiente infatti si considera per valori di vitamina D > 75 nmol/L (44).

Nella nostra casistica inoltre la carenza risultava più grave nei soggetti con BMI maggiore con una correlazione inversa fra livelli di 25(OH)D e indici di adiposità sia totale (BMI) che viscerale (WC e R1%fat). Il PTH risultava significativamente più elevato nei soggetti obesi, pur non trovando una correlazione significativa positiva fra PTH e BMI.

Tali dati trovano conferma in alcuni studi precedenti in cui i livelli di vitamina D erano inversamente correlati sia al BMI, sia alla adiposità. Per quanto riguarda la correlazione fra BMI e PTH, pur essendoci una tendenza ad una relazione diretta, anche in letteratura non sempre si raggiunge la significatività statistica (4-10).

Tra le numerose ipotesi ideate negli anni per spiegare l'associazione fra vitamina D e obesità l'ipotesi che troverebbe riscontro anche nei nostri dati è che nel tessuto adiposo vi sia un'aumentata clearance metabolica e/o un aumentato up-take della vitamina D che giustificherebbe la bassa biodisponibilità di 25(OH)D in circolo nei soggetti obesi. Come sostiene nel suo studio *Wortzman et al* (12-13) la vitamina D verrebbe quindi sequestrata a livello di tessuto adiposo e non sarebbe più disponibile in circolo; tale ipotesi contrasta con quella di *Rosenstreich et al.* secondo cui il tessuto adiposo rappresenta una riserva di vitamina D in grado di ri-cederla in circolo nei periodi di deprivazione (45).

Dopo somministrazione di una dose acuta di colecalciferolo i livelli di vitamina D si modificavano in modo differente in base al BMI; nei soggetti obesi la vitamina D, molto bassa al basale, aumentava in modo statisticamente significativo in T1 e T2 raggiungendo però livelli sierici inferiori rispetto ai normopeso e sovrappeso per poi lentamente ridursi nel tempo; a 90 gg dal carico i livelli di 25(OH)D erano ridotti rispetto al picco post-carico ma più elevati rispetto al basale.

I nostri dati quindi confermerebbero che il BMI condiziona la risposta della vitamina D al carico; tale ipotesi trova dati contrastanti in letteratura in quanto alcuni autori confermano (14-16) altri smentiscono tale relazione (17-18). E' necessario però sottolineare che gli studi sono difficilmente confrontabili per una differente scelta della casistica ed un diverso protocollo di studio con differenti dosaggi di di colecalciferolo e differente tempo di somministrazione e di osservazione.

A nostra conoscenza il nostro è il primo studio che analizza la risposta sia a breve (7giorni) che a medio termine (30 e 90 giorni) di 25(OH)D, PTH e 1,25(OH)₂D dopo un carico in acuto di colecalciferolo (300.000 U) su soggetti con differente BMI.

Nel nostro studio mentre la 25(OH)D si stratificava bene nei 3 gruppi in base al BMI mentre la 1,25 vitamina D sembrava essere più bassa solo nei soggetti obesi mentre nei sovrappeso ha un comportamento simile ai soggetti normopeso. In letteratura i dati sono contrastanti; alcuni vecchi studi su piccole casistiche avevano evidenziato un livello di 1,25(OH)₂D maggiore nei soggetti obesi tanto da far ipotizzare che fosse proprio tale ormone ad avere un ruolo nello sviluppo dell'obesità (46-49). In studi più recenti e con casistiche maggiori invece la 1,25(OH)₂D è risultata più bassa nei soggetti obesi (50-51). Tale discrepanza non era stata attribuita alla stagionalità dei prelievi né all'esposizione solare dato che questo parametro sembrava condizione più la 25(OH)D che la 1,25 quanto ad una possibile metodica diversa di analisi nei vari studi (radio recettoriale con possibile interferenza del contenuto lipidico sierico nei vecchi studi, radioimmunologico nei più recenti) e soprattutto ad una numerosità della casistica nettamente superiore negli studi di *Parikh et al* e *Konradsen et al* rispetto ai precedenti. Come è noto i livelli di 1,25(OH)₂D dipendono dalla idrossilazione a livello renale della 25(OH)D regolata dal PTH ma anche dai livelli di substrato 25(OH)D disponibili. Se da un lato l'aumento del PTH negli obesi non sembra influenzare l'idrossilazione a livello renale, sembra verosimile ipotizzare che sia la carenza di substrato 25(OH)D a giustificare la riduzione dei livelli di 1,25(OH)₂D negli obesi.

Lo scopo del nostro studio era anche quello di valutare se non solo la quantità di grasso ma anche la sua distribuzione potesse interferire con i livelli di vitamina D. Per discriminare il tipo di grasso abbiamo utilizzato un indice indiretto (WC) ed uno diretto mediante l'analisi manuale della sottoregione a livello addominale che corrisponde al box R1, già dimostrato attendibile nella stima dell'adiposità viscerale quanto quella rilevata dalla TAC (38).

Dai nostri risultati la buona correlazione fra WC e percentuale di grasso in R1 confermava come tale box possa rappresentare una valida misura surrogata dell'adiposità viscerale.

Dai nostri dati si confermava come i livelli di vitamina D fossero diversi considerando WC ed R1, confermando come all'aumentare della adiposità centrale lo status vitaminico D fosse peggiore; inoltre analizzando l'andamento della vitamina D dopo il carico, l'R1 si dimostrava il parametro che meglio prediceva la risposta della vitamina D.

I nostri dati quindi mostrano che lo stato vitaminico D sembra dipendere in modo inverso non solo dalla quantità di grasso totale ma in particolare dalla sua distribuzione in sede viscerale.

Dato che tale tipo di grasso è un organo metabolicamente attivo si potrebbe ipotizzare che il maggior consumo di 25 (OH) vitamina D nel grasso viscerale avvenga anche per un effetto extra-scheletrico della vitamina D. E' noto infatti come nel tessuto adiposo l'infiltrazione di macrofagi abbia una cruciale importanza nella infiammazione tissutale e nello sviluppo di insulino-resistenza (52-54). Nei soggetti obesi un tessuto adiposo viscerale ricco di macrofagi potrebbe essere responsabile non solo del sequestro ma anche del maggior consumo di vitamina D a tale livello.

Per quanto riguarda i dati relativi all'insulino-resistenza, nella nostra casistica è stato misurato l'indice HOMA. Al basale esso si confermava maggiore nei soggetti sovrappeso e obesi risultando patologico solo nei soggetti obesi; dopo il carico di colecalciferolo l'HOMA IR tendeva a ridursi negli obesi raggiungendo la significatività statistica dopo 30 gg, tendeva poi tornare verso i valori basali parallelamente al progressivo declino dei livelli di vitamina D. Tali dati confermerebbero un miglioramento dell'insulino-resistenza con il miglioramento dello stato vitaminico D, in accordo con alcuni dati di letteratura dove si ipotizza un ruolo della vitamina D nel migliorare l'insulino-sensibilità dei tessuti periferici insieme ad una riduzione degli indici di infiammazione correlati all'insulino-resistenza (23, 55-57).

Nel nostro studio non è stato possibile dosare un marker di infiammazione per convalidare tale ipotesi e questo rappresenta un limite, tuttavia tale dato si può mutuare dalla letteratura dove è ormai dato noto che nell'obesità viscerale vi è un aumento di PCR e IL6, indici di infiammazione tissutale (58).

In conclusione il nostro lavoro mostra come i livelli di vitamina D dipendano non solo dalla quantità totale (valutata con il BMI) di grasso ma anche dalla sua distribuzione (calcolata nella regione R1) ed è possibile che essa sia maggiormente sequestrata e/o consumata a livello di grasso viscerale. L'indice di insulino-resistenza migliora dopo carico solo nei soggetti obesi, dove il deficit di vitamina D è più manifesto.

Data la endemica carenza di vitamina D nella popolazione generale, si conferma quindi la necessità di un'adeguata supplementazione con colecalciferolo; inoltre, alla luce delle nostre considerazioni, è necessario che nei soggetti obesi i dosaggi siano più elevati in relazione al BMI ed alla presenza di obesità centrale così da ottenere in circolo livelli di vitamina D sufficienti a migliorarne anche il profilo glico-metabolico.

BIBLIOGRAFIA

1. Holick MF Vitamin D deficiency 2007 N Engl J Med 357, 266-281
2. Forouhi NG, Luan J, Cooper A, Boucher BJ, Wareham NJ. Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemc status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes*. 2008 Oct;57(10):2619-25. Epub 2008 Jun 30
3. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Neaney RP, Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial; *Clin Nutr* 2007 June; 85(6):1586-91
4. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women, *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88 157-161
5. Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M, Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationships with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity and season; *Metabolism* 2008 feb; 57(2):183-91
6. Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Villafruela JJ, Balsa JA, Vazquez C, Escobar-Morreale HF, Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbidly obesity, *Clin Nutr*, 2007 Oct 26 (5): 573-80,
7. Ernst B, Thurnheer M, Schmid SM, Wilms B, Schultes B, Seasonal variation in the deficiency of 25-hydroxyvitamin D3 in mildly to extremely obese subjects; *Obes Surg* 11695-008-9636-2
8. Snijder MB, Vab Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, Seideli JM, Lips P; Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population based study in older men and women; *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Jul; 90 (7):4119-23
9. Rueda S, Fernandez-Fernandez C, Romero F, Martinez de Osab J, Vidal J, Vitamin D, PTH, and the metabolic syndrome in severely obese subjects, *Obes Surg* 2008 feb; 18(2):151-4
10. Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, Mason BH, Horne AM, Gamble GD and Reid IR, The effect of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency *An J* 2007 *Clin Nutr* 86; 959-64
11. Bluma M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, Saltzman E, Dawson-Hughes B, Vitamin D3 in fat tissue; *Endocr* 2008,33:90-94
12. Liel Y, Ulmer E, Shary J, Hollis BW, Bell NH, Low circulating vitamin D in obesity *Calcif.Tiss.Int.*1988, 43, 199-201

13. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z and Holick MF Decreased bioavailability of vitamin D in obesity *Am J Clin Nutr* 2000; 72:690-3
14. Blum M, Dallal GE and Dawson-Hughes B Body size and serum 25 hydroxyvitamin D response to oral supplements in healthy older adults *J Am Coll Nutr* 2008; 27(2):274-279;
15. Lee P, Greenfield JR, Seibel MJ, Eisman JA, Center JR Adequacy of vitamin D replacement in severe deficiency is dependent on body mass index *Am J Med* 2009 122;1056-1060
16. Forsythe LK, Livingstone MB, Barnes MS, Horigan G, McSorley EM, Bonham MP, Magee PJ, Hill TR, Lucey AJ, Cashman KD, Kiely M, Strain JJ and Wallace JMW Effect of adiposity on vitamin D status and the 25-hydroxycholecalciferol response to supplementation in healthy young and older Irish adults *Br J Nutr* 2011 DOI:10.1017/S007114511002662
17. Canto-Costa MH, Kunii I and Hauache OM 2006 Body fat and cholecalciferol supplementation in elderly homebound individuals. *Braz J Med Biol Res* 39, 91-98
18. Nelson ML, Blum JM, Hollis BW, Rosen C and Sullivan SS (2009) Supplements of 20 mcg/d cholecalciferol optimized serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in 80% of premenopausal women in winter. *J Nutr* 139, 540-546
19. McGill AT, Stewart JM, Lithander F, Poppit C, Poppit SD, Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight obesity; *Nutr J* 2008;7:4
20. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5):820–825
21. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middleaged and older US women. *Diabetes Care.* 2005;28(12):2926–2932
22. Salekzamani S, Neyestani TR, Alavi-Majd H, Houshiarrad A, Kalayi A, Shariatzadeh N, Gharavi A Is vitamin D status a determining factor for metabolic syndrome? A case-control study. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2011;4:205-12. Epub 2011 Jun 10
23. Sheena Kayaniyil, Ravi Retnakaran, Stewart B. Harris, Reinhold Vieth, Julia A. Knight, Hertz C. Gerstein, Bruce A. Perkins, Bernard Zinman, and Anthony J. Hanley. Prospective Associations of Vitamin D With b-Cell Function and Glycemia The PROspective Metabolism and Islet cell Evaluation (PROMISE) Cohort Study *Diabetes* 60:2947–2953, 2011

24. Kohrt WM, Abdominal obesity and associated cardiovascular comorbidities in the elderly, *Coron Artery Dis* 1998;9:489-494; Bonora E, Del Prato S, Bonadonna RC, Total body fat content and fat topography are associated differently with in vivo glucose metabolism in non-obese and obese non-diabetic woman. *Diabetes* 1992; 41:1151-1159
25. Yamashita S Nakamura T, Shimomora I et al., Insuline resistance and body fat distribution: contribution of visceral fat accumulation to the development of insuline resistance and atherosclerosis, *Diabetes Care* 1996; 19; 287-291
26. Despres JP and Lemieux I Abdominal obesity and metabolic syndrome *Nature* 2006 vol 444/14 December
27. Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodes-Cabau J, Bertrand OF and Poirier P Abdominal Obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk *Arteroscлер Thromb Vasc Biol* 2008, 28:1039-1049
28. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I and Despres JP Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension and cardiovascular disease *Hypertension* 2009, 53:577-584
29. Mathieu P, Lemieux I and Despres JP Obesity, inflammation and cardiovascular risk *Nature publishing group, Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2010 vol 87 (4)
30. Day C Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology"; *Diabetes and Vascular Disease Research* 2007, vol 4 issue 1 march
31. Ryan MC, Festen Farin HM, Abbassi F, Reaven GM, Comparison of waist circumference versus body mass index in diagnosing metabolic syndrome and identifying apparently healthy subjects at increased risk of cardiovascular disease. *the American Journal of Cardiology*, vol 102 issue 1 July 2008; 40-46
32. Tanaka S, Yoshiyama M, Imanishi Y, Nakahira K, Hanaki T Tanaka M, MR measurement of visceral fat: assessment of metabolic syndrome, *Magn Reason Med Sci*2006, vol 5 nr 4 207-210
33. Mazess RB, Barden HS, Bisek JP, Hanson J. Dual energy X-ray absorbpiometry for total body and regional bone mineral and soft-tissue composition. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 1106-112
34. Lee CC, Glickman SG, Dengel DR, Brown MD, Supiano MA; Abdominal Adiposity Assessed by Dual Energy X-ray absorpiometry provides sex-independent predictor of Insulin Sensitivity in Older Adults, *Journal of Gerontology* 2005 7,872-877
35. Coin A, Sergi G, Minicuci N, Giannini S, Barbiero E, Manzato E, Pedrazoni M, Minisola S, Rossini M, Del Puent A, Zamboni M, Inelmen EM, Enzi G; Fat –free mass and fat mass

- reference values by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) in a 20-80 year-old Italian population, *Clinical Nutrition* 2008 27, 87-94
36. Park Y-W, Meymsfiel SB, Gallagher D, Are dual-energy X-ray absorptiometry regional estimates associated with visceral adipose tissue mass? *International Journal of Obesity* 2002, 26, 978-983
 37. Sievanen H, Kannus P, Nieminem V, Heionen A, Oja P, Vuori I; Estimation of various mechanical characteristics of human bones using dual energy X ray absorptiometry: methodology and precision; *Bone* 1996, vol 18, No 1, 17S-27S
 38. Snijder MB, Visser M, Dekker JM, Seidell JC, Fuerst T, Tylavsky F, Cauley J, Lang T, Nevitt M and Harris TB; The prediction of visceral fat by dual-energy X-ray absorptiometry in the elderly a comparison with computed tomography and anthropometry; *International Journal of Obesity* (2002) 26, 984-993
 39. Montomoli M, Gonnelli S, Giacchi M, Mattei R, Cuda C, Rossi S, Gennari C 2002 Validation of a food frequency questionnaire for nutritional calcium intake assessment in Italian women. *Eur J Clin Nutr* 56; 21-30
 40. Adami S, Bianchi G, Brandi ML, Giannini S, Ortolani S, Di Munno O, Frediani B, Rossini M, on behalf of the BONTURNO study group 2009 Determinants of bone turnover markers in healthy premenopausal women. *Calcif Tissue Int* 82; 341-347
 41. Matthews DR, JP. H. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419
 42. Isaia G, Giorgino R, Rini GB, Bevilacqua M, Maugeri D, Adami S. Prevalence of hypovitaminosis D in elderly women in Italy: clinical consequences and risk factors. *Osteoporos Int*. 2003 Jul;14(7):577-82. Epub 2003 Jul 11.
 43. Rossini M, Viapiana O, Gatti D, James G, Girardello S, Adami S. The long term correction of vitamin D deficiency: comparison between different treatments with vitamin D in clinical practice. *J. Minerva Med*. 2005 Apr;96(2 Suppl 2):1-7
 44. Grant WB, Holik MF Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review, 2005 *AI Med Rev* 10:94-111
 45. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest* 1971; 50:679-687
 46. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S (1985) Evidence for alteration of the vitamin D endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest* 76:370-373

47. Hey H, Stokholm KH, Lund B, Lund B, Sørensen OH (1982) Vitamin D deficiency in obese patients and changes in circulating vitamin D metabolites following jejunoileal bypass. *Int J Obes* 6:473–479
48. Kerstetter J, Caballero B, O'Brien K, Wurtman R, Allen L (1991) Mineral homeostasis in obesity: effects of euglycemic hyperinsulinemia. *Metabolism* 40:707–713
49. Liel Y, Enoch U, Shary J, Hollis BW, Bell NH (1984) Low circulating vitamin D in obesity. *Calcif Tissue Int* 43:199–201
50. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, Yanovski JA (2004) The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endo Metab* 89:1196–119
51. Konradsen S, Ag H, Lindberg F, Hexeberg S, Jorde R Serum 1,25-dihydroxy vitamin D is inversely associated with body mass index, *Eur J Nutr.* 2008 Mar;47(2):87-91. Epub 2008 Mar 4
52. Xu H, Barnes GT, Yang Q, ...and Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112:1821-1830
53. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003 ; 112: 1796-1808.
54. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Forsyst-Ludwig A, Clemenz A, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth FE, ...and Marx N T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue; a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1304
55. Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, Pittas AG Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic β cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2011 Aug;94(2):486-94. Epub 2011 Jun 29
56. von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient - a randomised, placebo-controlled trial *Br J Nutr.* 2010 Feb;103(4):549-55. Epub 2009 Sep 28.

57. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R: The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International Journal of Clinical Practice* 2003, 57:258-261.
58. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B: The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in non-diabetic adults. *Diabetes Care* 2007, 30(4):980-986.