

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**POSSIBILE RUOLO DELLA CO-INTEGRAZIONE DELLA VITAMINA
D E DEI PROBIOTICI SULLA SALUTE PSICO-FISICA**

Relatore

Prof. Silvia Fallarini

Candidato

Brizzi Giorgio

Anno Accademico 2023-24

SESSIONE ESTIVA A.A. 2023/2024

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

1,25(OH)2D3 = Forma attiva della vitamina D

25(OH)D3 = Vitamina D

APC = Cellule presentati antigene

AR = Artrite reumatoide

BAI = Questionario sull'ansia

BDI = Questionario sulla depressione

BMI = Indice di massa corporea

CFU = Colonia per capsula

CHD = Malattie coronariche

CRP = Proteina C-reattiva

DBP = Proteina legante la vitamina D

DC = Cellule dendritiche

ESR = Velocità di sedimentazione degli eritrociti

FAO = "Food and agriculture organization"

FBS = Zucchero nel sangue a digiuno

GALT = Tessuto linfoide diffuso nell'apparato intestinale

GDM = Diabete mellito gestazionale

GHQ = Questionario sulla salute generale

HOMA-IR = Insulino-resistenza

hs-CRP = Proteina C-reattiva ad alta sensibilità

IBD = Malattie infiammatorie croniche intestinali

IBS = Sindrome dell'intestino irritabile

IMA = Infarto acuto al miocardio

iNOS = Ossido nitrico sintasi inducibile

LES = Lupus eritematoso sistemico

MDA = Malondialdeide

mDC = Cellule dendritiche mieloidi

NK = Natural killer

NO = Ossido nitrico

OMS = Organizzazione mondiale della sanità

PAMP = Recettori per il riconoscimento dei pattern molecolari associati ai patogeni

PANSS = Positive and negative syndrome scale

PCOS = Sindrome dell'ovaio policistico

pDC = Cellule dendritiche plasmocitoidi

PTH = Paratormone

QUICKI = Sensibilità insulinica

RAS = Sistema renina-angiotensina-aldosterone

SCFA = Acidi grassi a corta catena

SHBG = Globuline leganti gli ormoni sessuali

SIBO = Sovraccrescita batterica nell'intestino tenue

SM = Sclerosi multipla

SNC = Sistema nervoso centrale

T2DM = Diabete di tipo 2

TAC = Capacità antiossidante totale

TBW = Acqua corporea totale

TC = Colesterolo totale

TLR = Toll like receptors

TOA = Valutatore degli esiti del trial

UI = Unità internazionale

VDR = Recettore della vitamina D

INDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUZIONE | 1 |
| 1 FONDAMENTI DELLA VITAMINA D | 2 |
| 1.1. Vitamina D: struttura e biosintesi | 2 |
| 1.2. Fonti alimentari, metabolismo e regolazione della vitamina D..... | 4 |
| 1.3 I livelli di vitamina D nel corpo umano | 7 |
| 2 PATOLOGIE METABOLICHE E CARENZE DI VITAMINA D | 8 |
| 2.1. Patologie correlate all'eccesso di vitamina D | 8 |
| 2.2. Patologie correlate al deficit di vitamina D | 9 |
| 2.2.1. Patologie ossee | 11 |
| 2.2.2. Patologie muscolari | 14 |
| 2.2.3. Malattie cardiovascolari | 15 |
| 2.2.4. Malattie autoimmuni | 17 |
| 2.2.5. Diabete | 20 |
| 2.2.6. Cancro/neoplasie | 21 |
| 2.2.7. Depressione..... | 22 |
| 3 COME LA VITAMINA D REGOLA IL SISTEMA IMMUNITARIO | 23 |
| 3.1. Ruolo della vitamina D nella regolazione della risposta immunitaria..... | 23 |
| 3.2. Vitamina D e cellule dendritiche | 24 |
| 3.3. Vitamina D e immunità innata | 26 |
| 3.4. Vitamina D e immunità adattativa | 29 |
| 4 COME IL SISTEMA IMMUNITARIO È REGOLATO DAL MICROBIOTA INTESTINALE | 31 |
| 4.1. Cos'è il microbiota intestinale | 31 |
| 4.2. Ruolo del microbiota sul sistema immunitario | 33 |
| 4.3. Disbiosi/microbiota intestinale alterato | 35 |
| 4.3.1. Cause di disbiosi | 37 |
| 4.3.2 Patologie correlate alle disbiosi intestinali..... | 39 |
| 5 L'USO DI PROBIOTICI PER CONTRASTARE LE DISBIOSI | 42 |
| 5.1. Cosa sono i probiotici..... | 42 |
| 5.2. L'effetto dei probiotici sulla salute umana | 43 |
| 5.3. L'uso dei probiotici per contrastare le patologie in cui è correlata un'alterazione del microbiota | 45 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6 | EFFETTI SULLA SALUTE UMANA DATI DALLA CO-SOMMINISTRAZIONE DI VITAMINA D CON I PROBIOTICI | 47 |
| 6.1.1. | Studio che valuta l'effetto della co-integrazione in pazienti affetti da schizofrenia | 49 |
| 6.1.2. | Studio che valuta gli effetti della co-somministrazione sulle donne in postmenopausa che soffrono di osteopenia | 56 |
| 6.1.3. | Studio che valuta gli effetti della co-integrazione sui parametri della salute mentale e sullo stato metabolico nei pazienti diabetici di tipo 2 affetti da malattie coronariche | 57 |
| 6.1.4. | Studio che valuta gli effetti della co-supplementazione sullo stato metabolico e sugli esiti della gravidanza nelle donne affette da diabete gestazionale | 60 |
| 6.1.5. | Studio che valuta gli effetti della co-integrazione sulla salute mentale, sui parametri di stress ormonale, infiammatorio ed ossidativo nelle donne con la sindrome dell'ovaio policistico | 63 |
| 6.1.6. | Studio che valuta gli effetti della co-somministrazione sulle coliche infantili | 66 |
| 6.1.7. | Studio che valuta gli effetti della co-assunzione nei pazienti affetti dalla sindrome dell'intestino irritabile | 70 |
| 6.1.8. | Studio che valuta gli effetti dello yogurt co-fortificato con vitamina D e probiotici negli adulti obesi | 74 |
| | CONCLUSIONI | 77 |
| | BIBLIOGRAFIA | 79 |
| | RINGRAZIAMENTI | 94 |

INTRODUZIONE

Il microbiota intestinale è conosciuto anche come flora batterica intestinale ed è un complesso ecosistema di microrganismi (circa 1.014 batteri commensali) che popolano il tratto gastrointestinale.

È noto come uno degli attori chiave nella promozione della salute umana poiché influenza numerosi processi fisiologici come l'immunità, la digestione degli alimenti e la sintesi di nutrienti essenziali. Negli ultimi anni l'attenzione della ricerca scientifica si è focalizzata sulle interazioni tra il microbiota intestinale e l'assunzione di sostanze nutritive atte a mantenerlo funzionale o ripristinarlo in caso di disbiosi, in particolare recentemente si studiano gli effetti di formulazioni che contengono vitamina D e probiotici.

La vitamina D è nota per il suo ruolo nella salute ossea e negli ultimi anni è apparso rilevante anche il suo ruolo nel sistema immunitario, e la influenza sul microbiota intestinale; parallelamente anche i probiotici hanno suscitato interesse per il loro potenziale nell'influenzare la composizione e la funzione del microbiota e di conseguenza anche alcune patologie.

Questa tesi si propone di esaminare criticamente l'impatto della co-integrazione di vitamina D e probiotici per favorire la salute del microbiota intestinale e migliorare la salute generale dell'individuo.

1 FONDAMENTI DELLA VITAMINA D

1.1. Vitamina D: struttura e biosintesi

La vitamina D è una molecola/nutriente essenziale per la salute umana, è fondamentale per il suo ruolo nella regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo. Questa vitamina liposolubile è indispensabile per la salute ossea, ma possiede anche tanti altri effetti fisiologici che coinvolgono altri sistemi nel corpo umano. [1]

La vitamina D esiste in cinque diverse forme e le più importanti sono la vitamina D2 (ergocalciferolo) e la vitamina D3 (colecalfiferolo). La struttura chimica essenziale di entrambi i composti consiste in un nucleo di cicloesano con un lato aperto che contiene un doppio legame e che è connesso tramite un ponte metilenico ad un anello ciclo-pentanico. La sua attività biologica è determinata dalla posizione e dalla presenza di gruppi ossidrilici e alcolici.

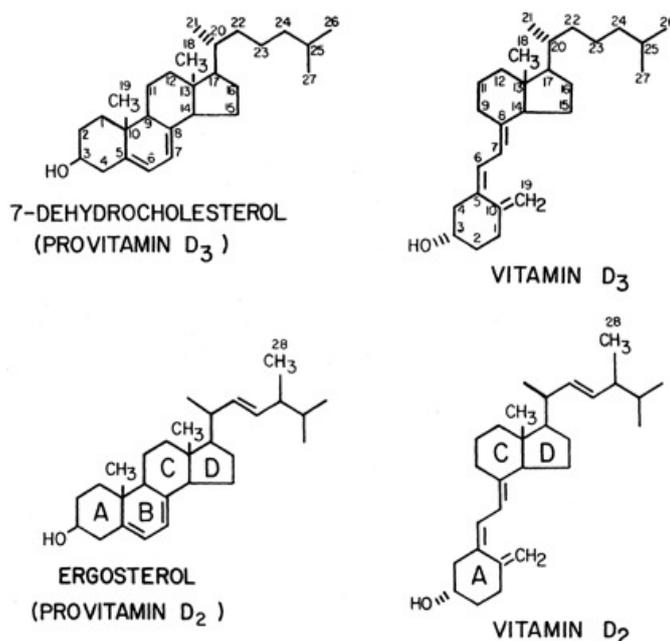


Figura 1.1 Strutture delle forme di vitamina D [2]

La vitamina D può essere sintetizzata endogenamente grazie all'esposizione alla luce solare oppure può essere assunta mediante l'alimentazione o l'uso di integratori.

È nella pelle che avviene la sua biosintesi, grazie alla luce ultravioletta del sole che converte il 7-deidrocolesterolo presente nei cheratinociti in pre-vitamina D3; questa subisce poi una termoisomerizzazione spontanea che darà origine alla vitamina D3. La vitamina D3 viene trasportata al fegato tramite la circolazione sanguigna, dove viene idrossilata nella posizione C25 dal citocromo P450 per formare la 25-idrossivitamina D3; questa poi viene condotta ai reni e qui viene ulteriormente idrossilata per formare il metabolita biologicamente attivo 1,25-diidrossivitamina D3, noto anche come calcitriolo. [2]

1.2. Fonti alimentari, metabolismo e regolazione della vitamina D

Le fonti di vitamina D sono principalmente l'esposizione al sole e il consumo di diversi alimenti che la contengono.

La produzione di vitamina D₃ avviene nella pelle grazie all'esposizione alle radiazioni UVB con una lunghezza d'onda compresa tra 290 e 315 nm, queste trasformano il 7-deidrocolesterolo in pre-vitamina D, che a temperatura corporea si converte in vitamina D₃ o colecalciferolo.

La pigmentazione della pelle, la percentuale di superficie cutanea esposta, la latitudine, l'altitudine, la stagione e l'uso di creme solari sono i principali fattori che influenzano la biosintesi della vitamina D nella cute, inoltre in misura minore la vitamina D può essere ottenuta anche attraverso l'assunzione di cibi contenenti vitamina D₂, che viene convertita in vitamina D₃. [3]

Gli alimenti più ricchi di vitamina D sono il pesce grasso (come il salmone, il tonno, l'aringa e lo sgombro), i latticini fortificati (come il latte, lo yogurt e alcuni tipi di formaggi), i tuorli d'uovo e alcuni tipi di funghi (soprattutto quelli esposti alla luce ultravioletta perché essendo esseri viventi possono sintetizzare la vitamina D quando sono a contatto con la luce solare o luce artificiale UV).

Nonostante la vitamina D sia presente in svariate fonti alimentari, è stato verificato che spesso la dieta non è sufficiente per raggiungere l'apporto giornaliero raccomandato; questo soprattutto per chi segue diete particolarmente limitate o per individui che vivono in regioni con poca esposizione solare. In questi casi, può essere particolarmente utile integrare la vitamina D tramite integratori dietetici. [4]

Tabella 1.1 Fonti alimentari di vitamina D

| Alimento | Vitamina D in UI |
|-------------------|------------------|
| Latte | 3-40/L |
| Yogurt | 89/100 g |
| Formaggi | 12-44/100 g |
| Funghi freschi | 100/100 g |
| Funghi secchi | 1660/100 g |
| Tuorlo d'uovo | 20-25/tuorlo |
| Sgombro crudo | 360/100 g |
| Aringa cruda | 1628/100 g |
| Aringa affumicata | 120/100 g |

La vitamina D assume un ruolo cruciale nell'equilibrio del calcio e del fosfato nel corpo umano; la sua forma attiva, il 1,25-(OH)₂-colecalciferolo, favorisce diverse azioni:

- incremento dell'assorbimento intestinale di calcio e fosforo;
- stimolazione della deposizione di calcio nel tessuto osseo;
- modulazione della funzione delle paratiroidi;
- aumento del riassorbimento renale di calcio.

Queste azioni concorrono nel mantenimento di livelli adeguati di calcio nel sangue, favorendo la mineralizzazione ossea e la crescita corporea normale. [5]

In particolare il 1,25-(OH)₂-colecalciferolo viene trasportato nel circolo ematico e si lega al recettore della vitamina D (VDR) nei tessuti bersaglio come l'intestino e il tessuto osseo. Questa interazione, insieme all'ormone paratiroideo, regola la trascrizione dell'mRNA, promuovendo la sintesi di proteine (come la calbindina) coinvolte nell'assorbimento del calcio intestinale.

La vitamina D nel fegato viene idrolizzata in posizione 25, da enzimi mitocondriali simili al citocromo P450, e il metabolita ottenuto è la 25-idrossivitamina D (o 25(OH)D₃ o calcifediolo), questa poi viene trasportata nel flusso sanguigno dalla proteina legante la vitamina D (DBP) e viene attivata a livello renale dall'enzima 1 α -idrossilasi che catalizza la sua idrossilazione in 1,25 (OH)₂ D₃ (o 1,25-diidrossivitamina D). [2] [6]

La regolazione del metabolismo della vitamina D coinvolge diversi meccanismi complessi, con particolare coinvolgimento di calcio, fosforo e alcuni ormoni chiave, tra cui il paratormone (PTH) e la calcitonina.

Il PTH viene prodotto dalle paratiroidi, la sua secrezione è stimolata da bassi livelli di calcio nel sangue e le sue azioni sono:

- in sede renale riduce il riassorbimento del fosforo nel tubulo contorto prossimale e aumenta il riassorbimento del calcio nel tubulo contorto distale;
- a livello osseo favorisce il rilascio di calcio stimolando l'attività degli osteoclasti e degli osteociti;
- nell'intestino stimola l'idrossilazione della 25(OH)D₃ a 1,25(OH)₂D₃ cioè la forma metabolica più attiva della vitamina D.

La calcitonina invece è prodotta dalle cellule parafollicolari della tiroide, viene secreta in risposta a elevati livelli di calcemia e le sue azioni sono:

- stimola l'enzima 1α -idrossilasi renale che converte la vitamina D in una forma attiva circolante;
- nei reni aumenta la clearance renale del calcio e del fosforo;
- nelle ossa inibisce il riassorbimento del calcio da parte degli osteociti e previene l'osteolisi indotta dal PTH. [7]

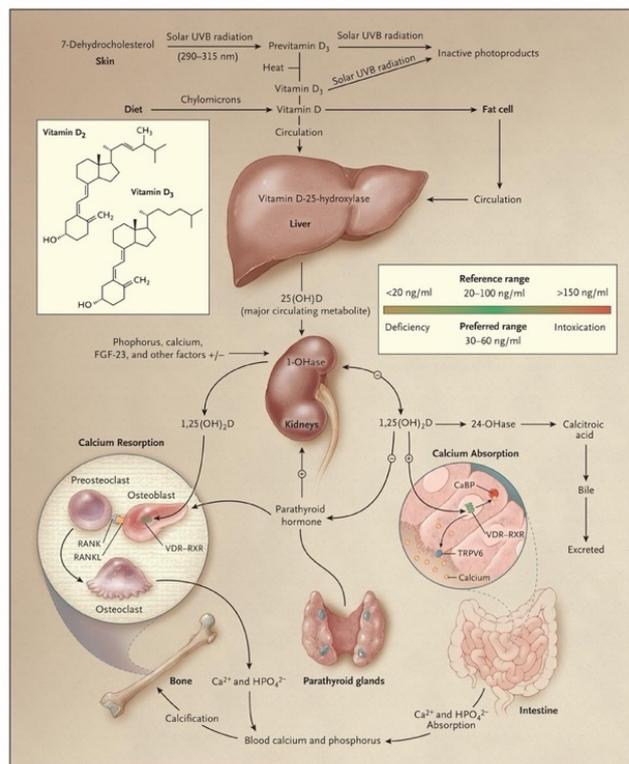


Figura 1.2 Metabolismo della vitamina D [1]

1.3 I livelli di vitamina D nel corpo umano

I quantitativi di vitamina D nell'uomo vengono valutati usando come indicatore i livelli di 25-idrossivitamina D, in quanto è la forma principale della vitamina D presente nel circolo ematico, riflette sia l'apporto cutaneo che quello alimentare, ed è un precursore dell'1,25-diidrossivitamina D (cioè la forma attiva della vitamina D). L'1,25-diidrossivitamina D non è usato come indicatore per la valutazione diagnostica poiché i suoi livelli possono essere sia normali sia elevati in presenza di carenza di vitamina D e questo la rende un marcatore inaffidabile.

Anche se si discute ancora in ambito medico sulla definizione precisa di carenza di vitamina D normalmente si definisce:

- sufficiente quando i livelli sierici sono maggiori di 30 ng/ml (75 nmol/l);
- carenza lieve quando i livelli si trovano tra 20 e 30 ng/ml (50-75 nmol/l);
- carenza moderata-grave quando i livelli sono minori di 20 ng/ml (50 nmol/l) [8];
- intossicazione quando i livelli sono superiori a 150 ng/ml (374 nmol/l). [4]

Questi limiti sono stati stabiliti considerando che i livelli di PTH rimangono stabili per valori di 25-idrossivitamina D superiori a 30 ng/ml; si è anche notato che l'assorbimento intestinale di calcio è ottimale per valori intorno ai 30 ng/ml mentre i benefici clinici sulla salute si manifestano con livelli superiori a 40 ng/ml. [3] [8]

2 PATOLOGIE METABOLICHE E CARENZE DI VITAMINA D

2.1. Patologie correlate all'eccesso di vitamina D

La vitamina D è una sostanza liposolubile perciò si deposita nel tessuto adiposo dell'organismo e tale accumulo, se risulta essere superiore ai livelli normali può creare problemi di sovradosaggio (chiamati ipervitaminosi D) ed in alcuni casi può risultare anche nello sviluppo di tossicità. [4]

L'accumulo di vitamina D può essere dato dell'aumentato assorbimento intestinale di questa o da un'eccessiva ritenzione renale del calcio; questo eccesso crea diversi effetti collaterali tra cui:

- problemi respiratori e cardiovascolari dati dalla formazione di depositi di calcio nei polmoni e nei vasi sanguigni; inoltre può generare problemi gastrointestinali che compromettono la qualità della vita e che possono portare a situazioni di simil malnutrizione;
- l'accumulo di calcio nel circolo sanguigno porta a uno stato di ipercalcemia che causa sintomi di debolezza muscolare, stitichezza, nausea, aumento della minzione e in casi più rari danni ai tessuti o ad organi vitali; può aumentare anche il rischio di una calcolosi renale con dolori acuti che possono richiedere un intervento di rimozione dei calcoli che sono venuti a formarsi. La presenza di questi elevati quantitativi di calcio nel sangue inoltre può dare problemi al cuore e al sistema cardiovascolare con possibili aritmie e altri disturbi cardiaci;
- il mal funzionamento dei sistemi organici a causa dell'accumulo di calcio che inducono affaticamento e debolezza generale. [4] [9]

2.2. Patologie correlate al deficit di vitamina D

Quando i valori di vitamina D risultano essere inferiori ai livelli corretti si generano problemi di salute e patologie serie.

In generale le cause che possono portare a difficoltà di produzione di vitamina D negli individui (indipendentemente dall'età) dipendono dalla presenza di melanina (abbondante nelle persone con carnagione scura ma ridotta in quelle chiare), dall'uso di creme solari con alto fattore di protezione, dall'abbigliamento che impedisce l'esposizione solare alla maggior parte del corpo e della latitudine, infatti si è notato che i livelli di 25(OH)D3 sono inversamente correlati sopra il 37° di latitudine e che durante i mesi invernali si ha una minore sintesi cutanea di vitamina D. [10]

Anche la riduzione della funzione renale (spesso presente nei soggetti con età avanzata) comporta una diminuzione dell'enzima 25(OH)-1 α -idrossilasi che si traduce in una minor conversione della vitamina D nella sua forma attiva. Lo stesso varrà per la riduzione dell'espressione del recettore VDR a livello osseo, muscolare e intestinale, che causerà così una resistenza alla vitamina D. [11]

Ulteriore fattore che favorisce la carenza di vitamina D può essere l'utilizzo di farmaci in grado di aumentare il suo catabolismo come glucocorticoidi, barbiturici, rifampicina, antiepilettici; [8] ma anche l'aumento della massa grassa ha lo stesso effetto perché la forma attiva della vitamina D tende a legarsi al tessuto adiposo riducendo così la sua disponibilità. [12]

Questa carenza costituisce un problema mondiale molto grave soprattutto per gli anziani. In questa categoria di individui si verifica una ridotta capacità di sintesi cutanea di colecalciferolo causata dalla diminuzione dei livelli cutanei di 7-deidrocolesterolo, pertanto la produzione di vitamina D risulta ridotta circa del 75% rispetto a quella dei soggetti di 20-30 anni esposti alla stessa quantità di luce. [11] [13]



Figura 2.1. Cause che portano al deficit di vitamina D

Lo stato di salute di un individuo perciò risulta essere enormemente dipendente dall'azione della vitamina D, la quale può portare numerosi effetti positivi oppure se risulta in deficit può causare parecchie ripercussioni/patologie importanti su molti sistemi dell'organismo quali: l'omeostasi del tessuto osseo, il sistema immunitario, l'apparato cardiocircolatorio, il sistema muscolo-scheletrico, le cellule β -pancreatiche e quelle cerebrali. [4]

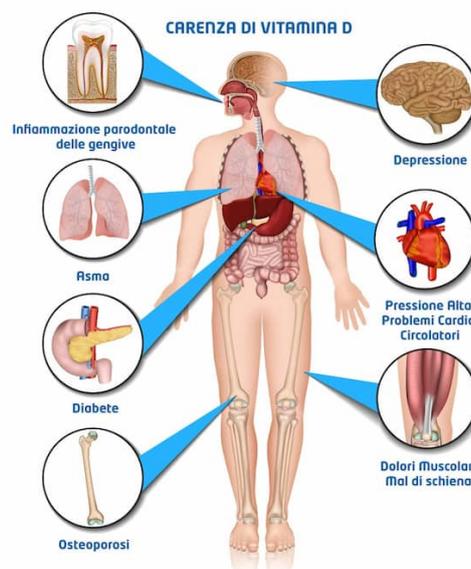


Figura 2.2. Sintomi da carenza di vitamina D [A]

2.2.1. Patologie ossee

La vitamina D ha una funzione essenziale nei processi di mineralizzazione dello scheletro in tutte le fasi della vita quindi la presenza di ridotte quantità di 25(OH)D3 portano a diverse patologie metaboliche dell'osso tra cui l'osteomalacia e l'osteoporosi nell'adulto, mentre nei bambini porta al rachitismo. [14]

Quando si verifica una carenza significativa di vitamina D, si generano nell'individuo delle condizioni di ipocalcemia e ipofosforemia, queste danno origine a gravi difetti nei meccanismi di mineralizzazione della matrice organica e portano alla comparsa di tessuto osteoide; quindi il deficit di questa vitamina causa una diminuzione della disponibilità degli osteoclasti e rende più difficile la loro maturazione. [15] [16]

Le tre patologie ossee conseguenti sono il rachitismo, l'osteomalacia e l'osteoporosi:

- il rachitismo è caratterizzato da una mineralizzazione inadeguata sia dello scheletro che delle cartilagini di accrescimento, le quali presentano una densità ridotta e margini irregolari. Esistono due varianti di rachitismo dipendenti dalla vitamina D ed entrambe hanno ereditarietà autosomica recessiva:
 - rachitismo di tipo I caratterizzato da un difetto nell'attività dell'enzima renale, ovvero l' α 1-idrossilasi, che si manifesta prima dei due anni di età (spesso nei primi sei mesi di vita);
 - rachitismo tipo II che è causato da una carente sintesi dei recettori per l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a livello cellulare; [17]

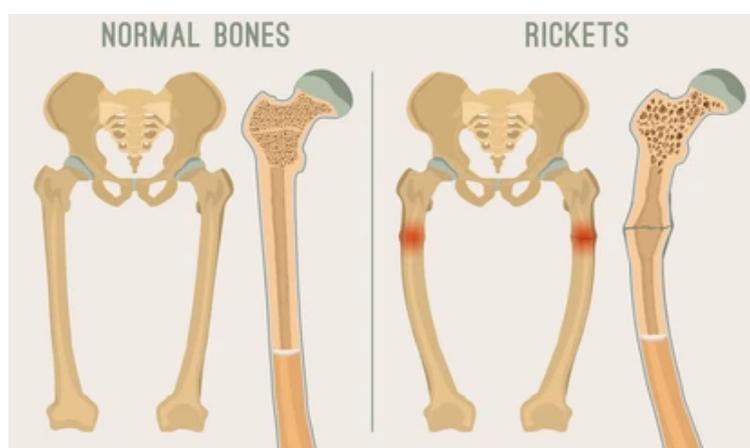


Figura 2.3. Differenza tra le ossa dei soggetti rachitici e quelle dei soggetti sani [B]

- l'osteomalacia è una patologia generata da una carenza di vitamina D al termine della fase di crescita dello scheletro quindi la mineralizzazione risulta inadeguata e questo causa conseguente fragilità e vulnerabilità alle fratture anche se la microarchitettura ossea rimane intatta e mantiene il suo volume normale. [4] In condizioni normali, la percentuale di tessuto osteoide è compresa tra lo 0 e il 4% mentre nelle forme più gravi di osteomalacia questa percentuale può arrivare fino al 70%. [18]

L'osteomalacia può manifestarsi in tre forme diverse:

- forma lieve: dove c'è un'elevata attività osteoclastica e un iperparatiroidismo secondario;
- forma intermedia: caratterizzata prevalentemente dalla fibrosi midollare e dalla presenza di osso a fibre intrecciate;
- forma avanzata: dove si ha una riduzione del ricambio osseo e osteoblasti appiattiti che rivestono i grossi bordi osteoidi; [18]



Figura 2.4. Radiografia delle ginocchia di un soggetto affetto da osteomalacia [C]

- l'osteoporosi è una patologia cronica del sistema scheletrico generata da alterazioni nella microarchitettura del tessuto osseo che portano una graduale perdita di massa e fragilità ossea con il conseguente aumento del rischio di fratture. [4] Questo avviene soprattutto alla colonna vertebrale, all'anca e al polso causando dolore, disabilità importanti e un aumento del rischio di mortalità precoce; [4] [19]

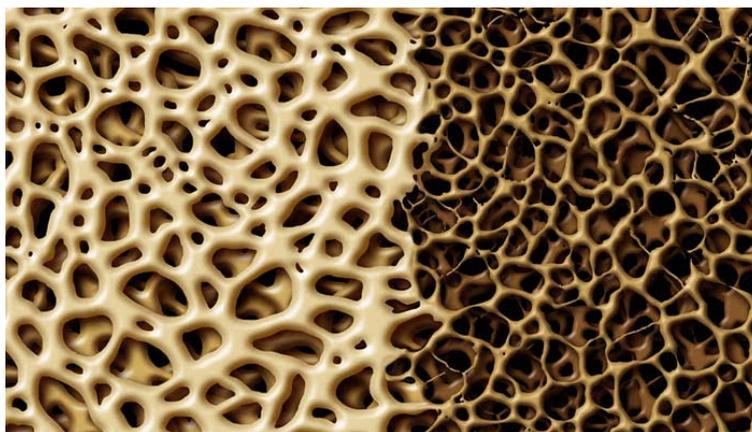


Figura 2.5. Confronto tra il tessuto osseo di un soggetto sano e quello di un paziente che soffre di osteoporosi [D]

La vitamina D quindi svolge un ruolo fondamentale nell'assorbimento del calcio nell'intestino tenue e rappresenta un fattore essenziale per la formazione e il mantenimento di ossa forti e sane; di conseguenza senza un suo adeguato apporto o uno squilibrio nel suo assorbimento si ha una diminuzione della mineralizzazione ossea e un aumento del rischio di fratture, soprattutto negli anziani.

2.2.2. Patologie muscolari

La vitamina D ha anche una notevole influenza sul tessuto muscolare in quanto attraverso i suoi recettori specifici (VDR) presenti nei muscoli ha un effetto sulla forza muscolare. [20]

La mancanza di questa vitamina può causare infatti indebolimento muscolare (in particolare nei gruppi muscolari prossimali) e dolori diffusi che però nelle forme lievi risultano sintomi reversibili e quindi eliminabili attraverso la somministrazione di vitamina D. [21]

Diversi studi condotti su anziani che presentavano una carenza di vitamina D hanno dimostrato che se viene somministrata una adeguata integrazione di questa vitamina allora migliorano la forza, la funzionalità muscolare e l'equilibrio (in base alla dose fornita) e ne consegue perciò una diminuzione delle cadute. [22] È stato osservato che con dosaggi giornalieri compresi tra 700-1.000 UI o in generale con il raggiungimento di una concentrazione di 25(OH)D superiore a 60 nmol/L (24 ng/ml) si può ridurre il rischio di cadute del 19% o arrivare addirittura al 26%. [23]

Tuttavia, un'altra ricerca ha riportato un aumento del rischio di cadute e fratture nelle donne anziane che hanno ricevuto una somministrazione annuale di 500.000 UI di vitamina D; si è dedotto che questo risultato sia dovuto al dosaggio elevato somministrato nell'anno. Ulteriori approfondimenti per stabilire la dose realmente ottimale di vitamina D devono quindi ancora essere effettuati. [24]

La vitamina D sembra agire positivamente sia sul sistema muscolare (perché stimola la sintesi proteica), sia sull'equilibrio posturale che sulla capacità dell'attenzione negli anziani. [25]

Uno studio condotto dal ricercatore Dhesi ha infatti evidenziato che fornire quantità adeguate di vitamina D negli individui anziani migliora i tempi di reazione, la performance funzionale e l'equilibrio ma non la forza muscolare. L'analisi di questi studi ha portato ad ipotizzare che questa vitamina migliora la coordinazione neuromuscolare non la forza muscolare vera e propria e tramite questa determini un miglior equilibrio e riduzione delle cadute. [25]

2.2.3. Malattie cardiovascolari

Il VDR è stato individuato anche nei tessuti del sistema cardiovascolare in particolare nei fibroblasti cardiaci, nei cardiomiociti e nell'endotelio in particolare nelle cellule muscolari lisce dei vasi. [26] [27]

Da alcune ricerche cliniche è emerso uno stretto collegamento tra i fattori di rischio comuni per le malattie cardiovascolari e la carenza di vitamina D. [28] Ad esempio, è stato fatto uno studio (2008) che ha preso in considerazione la relazione tra i livelli di 25(OH)D e il rischio di infarto miocardico (IMA) su un'ampia popolazione maschile priva di malattie cardiache preesistenti e si è scoperto che i pazienti con livelli di vitamina D superiori a 30 mg/dl avevano circa la metà del rischio di sviluppare un IMA dopo 10 anni di follow-up, senza che avessero vincoli di altri fattori di rischio cardiovascolari. [29]

Non è però ancora del tutto chiaro il meccanismo fondamentale tramite il quale la concentrazione adeguata di vitamina D può proteggere dalle malattie cardiovascolari ma è stato dimostrato che la vitamina può agire sia direttamente che indirettamente sul miocardio.

Tra le azioni dirette associate vi sono:

- la regolazione del flusso di calcio all'interno della cellula;
- il blocco del sistema RAS (cioè il sistema renina-angiotensina-aldosterone);
- l'influenza sulla differenziazione e la proliferazione dei cardiomiociti. [30]

Le azioni indirette che può dare invece sono:

- l'annullamento dei processi immunologici ed infiammatori;
- la prevenzione delle infezioni e dell'iperparatiroidismo secondario;
- l'aumento degli effetti antipertensivi ed anti-aterosclerotici. [30] [31]

Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che la vitamina D influenza anche la pressione arteriosa in quanto svolge un ruolo diretto nella regolazione del sistema renina-angiotensina infatti la sua forma attiva sopprime direttamente l'espressione del gene della renina. [32]

La vitamina D regola la crescita e lo sviluppo delle cellule muscolari lisce dei vasi e dei cardiomiociti ed inibisce il rilascio di citochine da parte dei linfociti; [26] inoltre sembra che influenzi anche i vasi sanguigni riducendo il rischio calcificazione

arteriosa e di trombosi migliorando la funzione endoteliale e regolando l'infiammazione coinvolta nella patogenesi dell'aterosclerosi. [30] [32]

Recentemente è stato osservato come la supplementazione di vitamina D migliora anche la funzione endoteliale attraverso la riduzione dello stress ossidativo e della perossidazione lipidica. [33]

Alcuni studi randomizzati hanno anche mostrato che un fattore di rischio per lo sviluppo di ictus fatali può essere rappresentato dalla carenza di questa vitamina. [34]

2.2.4. Malattie autoimmuni

La vitamina D nei macrofagi può esercitare un'azione autocrina stimolando la produzione di catelicidina ma può anche avere una funzione paracrina sui linfociti T e B controllando la regolazione della sintesi di citochine e immunoglobuline. [4]

Questa scoperta ha dato origine a numerosi studi osservazionali sugli effetti del deficit di vitamina D in relazione alle diverse malattie autoimmuni quali:

- l'artrite reumatoide (AR): patologia nella quale sono colpite principalmente le articolazioni con danni alle membrane sinoviali che causano danni ossei che possono portare a deformità e disabilità. I sintomi più diffusi sono rigidità, dolore, gonfiore, calore e arrossamento delle articolazioni interessate soprattutto alle prime ore dal risveglio. [16] La giusta quantità di vitamina D potrebbe contribuire a ridurre l'infiammazione articolare, con possibili benefici nel rallentamento della progressione della malattia.



Figura 2.7. Articolazioni sinoviali della mano di un paziente affetto da AR [E]

- la sclerosi multipla (SM): l'infiammazione danneggia la mielina dei neuroni provocando così lesioni e cicatrici alle fibre nervose nel SNC; i sintomi più comuni includono disturbi visivi, debolezza muscolare, problemi di mobilità, di coordinamento, di sensibilità e di tipo cognitivo. [35] In diverse ricerche è stata evidenziata una possibile correlazione tra livelli elevati di vitamina D e

un minor rischio di sviluppare questa malattia autoimmune che colpisce il sistema nervoso centrale;

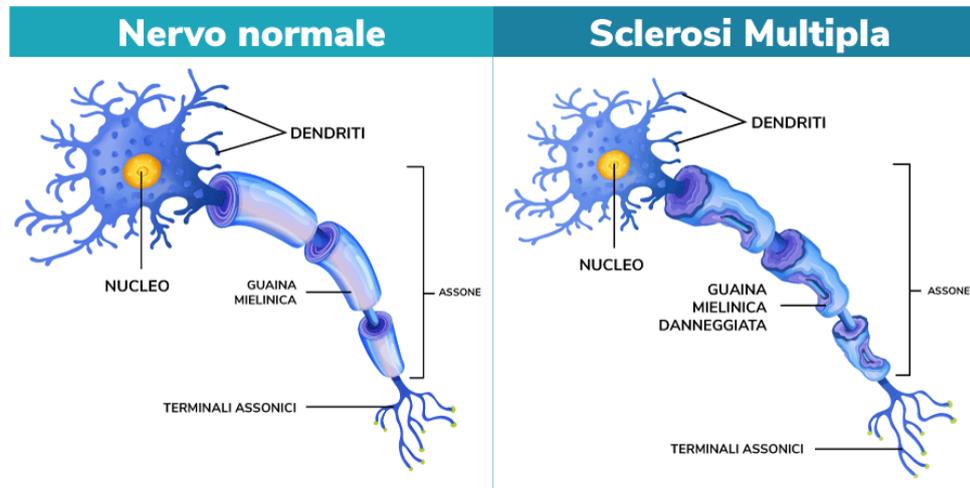


Figura 2.6. Differenze tra un nervo sano e quello di un paziente affetto da SM [F]

- il lupus eritematoso sistemico (LES): dove i bersagli sono i tessuti d'origine mesenchimale dell'individuo e questo genera un'inflammazione che colpisce principalmente cuore, reni, polmoni, pelle, articolazioni e sistema nervoso. I sintomi che si possono osservare vanno da dolori articolari, eruzioni cutanee, ulcere orali, affaticamento e febbre; mentre nei casi più gravi si possono sviluppare problemi renali, cardiaci e neurologici. [36] Nonostante i dati siano ancora limitati, si suppone che ci sia un'associazione tra i bassi livelli di vitamina D e l'aumento del rischio di questa malattia autoimmune sistemica;



Figura 2.8. Tipici rash cutanei in un soggetto affetto da LES [G]

- il morbo di crohn e colite ulcerosa: sono malattie infiammatorie croniche che colpiscono le pareti intestinali portando addirittura a volte alla formazione di ulcere; i sintomi più frequenti sono dolori, febbre e crampi al ventre associati a diarrea persistente e talvolta con presenza emorragica nelle feci semiliquide. Le ricerche ipotizzano che la vitamina D possa svolgere un ruolo molto importante nella salute e nella gestione di queste malattie, tuttavia per avere dati attendibili sono necessarie ulteriori analisi correlate a queste patologie. [\[37\]](#)

2.2.5. Diabete

Con la scoperta della presenza dei recettori VDR nelle cellule pancreatiche si è ipotizzata la correlazione tra vitamina D e il potenziale impatto del deficit di questa vitamina sulla secrezione insulinica. [38]

Numerose ricerche hanno evidenziato che nei pazienti con un alto rischio di sviluppo diabetico e in quelli con diabete conclamato si osserva una minore concentrazione di 25(OH)D3 rispetto ai gruppi di controllo [39] [40]; inoltre queste analisi hanno evidenziato anche che nelle donne con diabete mellito di tipo II si riscontra una maggiore frequenza di ipovitaminosi D. [39]

Studi successivi hanno suggerito che la carenza di vitamina D è associata all'aumento del rischio di sviluppare diabete di tipo II, sia a una sensibilità insulinica ridotta, che ad un rischio maggiore di sviluppare la sindrome metabolica. [41]

Si è perciò ipotizzato che la vitamina D stimoli la secrezione insulinica e influenzi la modulazione del sistema immunitario agendo direttamente sui recettori presenti sulle cellule β e pertanto la sua carenza potrebbe generare una risposta infiammatoria eccessiva associata alla resistenza insulinica. [42] [43]

Per confermare se la vitamina D possa effettivamente influenzare il rischio di diabete però sono indispensabili nuovi trial specifici che valutino questa ipotesi. [44]

2.2.6. Cancro/neoplasie

La vitamina D svolge anche un ruolo cruciale come ormone nel controllo della crescita cellulare promuovendo la differenziazione nelle cellule sane ed inibendo la progressione di mutazioni che portano allo sviluppo di cellule neoplastiche.

Le evidenze scientifiche odierne suggeriscono che la vitamina D possa rallentare la progressione tumorale attraverso varie azioni, tra cui la diminuzione della proliferazione cellulare, l'inibizione dello sviluppo di metastasi, la riduzione dell'angiogenesi e l'incremento dell'apoptosi nelle cellule trasformate. [14]

Si è osservato che vivere ad alte latitudini aumenta il rischio di sviluppare e morire di cancro questo probabilmente anche a causa della minore produzione di vitamina D in queste zone. Ne consegue perciò l'ipotesi di un legame tra carenza di vitamina D ed insorgenza di tumori, che è stata confermata anche da alcune metanalisi che hanno trovato una correlazione importante tra bassi livelli ematici di questa vitamina e il rischio di tumore alla mammella e al colon-retto; questi studi suggeriscono che livelli sierici di 25(OH)D3 superiori a 32 ng/ml possono diminuire del 50% la probabilità di insorgenza di tumori al colon-retto. [45] [46] [47]

Un trial clinico randomizzato condotto nel 2007 ha evidenziato una importante calo del rischio di tumori nei soggetti che hanno assunto una associazione di 1.100 UI di vitamina D e calcio rispetto a chi ha preso solo calcio o placebo. [48]

Tuttavia, altri studi simili non hanno rilevato alcun effetto della terapia con calcio e vitamina D sull'incidenza di tumori alla mammella e al colon-retto. [49]

Al momento attuale quindi non esistono evidenze certe e significative che confermino in modo definitivo una relazione tra carenza di vitamina D, incidenza di tumori o mortalità da cancro.

2.2.7. Depressione

I VDR sono presenti in diverse regioni cerebrali, pertanto, si è ipotizzata anche un'associazione tra disturbi psichiatrici e la carenza di vitamina D. Diversi studi osservazionali hanno evidenziato che gli individui che presentavano maggiori probabilità di essere depressi avevano i più bassi livelli di 25(OH)D3. [50]

In particolare, due studi clinici randomizzati hanno preso in esame l'efficacia di una somministrazione ulteriore di vitamina D nei pazienti affetti da depressione, evidenziando un discreto miglioramento dei sintomi depressivi. I risultati però non possono essere estesi all'intera popolazione in quanto queste ricerche presentano delle limitazioni poiché coinvolgono un numero circoscritto di pazienti e solo alcune categorie di essi. [51] [52]

Per ottenere risultati certi ed attendibili quindi sono necessari ulteriori studi condotti per tempi più lunghi per determinare se la carenza di vitamina D sia partecipata a determinare lo sviluppo di depressione o se sia semplicemente una conseguenza di essa.

3 COME LA VITAMINA D REGOLA IL SISTEMA IMMUNITARIO

3.1. Ruolo della vitamina D nella regolazione della risposta immunitaria

Ormai è accertato che la vitamina D nella sua forma attiva, con la formula 1,25(OH)2D3, ha un ruolo fondamentale nella regolazione del sistema immunitario influenzando il fenotipo delle cellule presentanti l'antigene (APC) e delle cellule dendritiche (DC), ed esercitando un controllo anche sulle funzioni dei linfociti T e B. Questa regolazione è esercitata principalmente dall'azione della vitamina D sui fattori di trascrizione nucleari (come NF- κ B), ma anche dall'interazione diretta sui promotori che regolano l'espressione genica delle citochine.

La scoperta del ruolo della vitamina D nella regolazione del sistema immunitario è stata possibile grazie all'identificazione del recettore della vitamina D (VDR) all'interno del nucleo di diverse cellule del sistema immunitario; come i linfociti T-helper, citotossici, i linfociti B, i neutrofili, le APC, le DC e i macrofagi. [53]

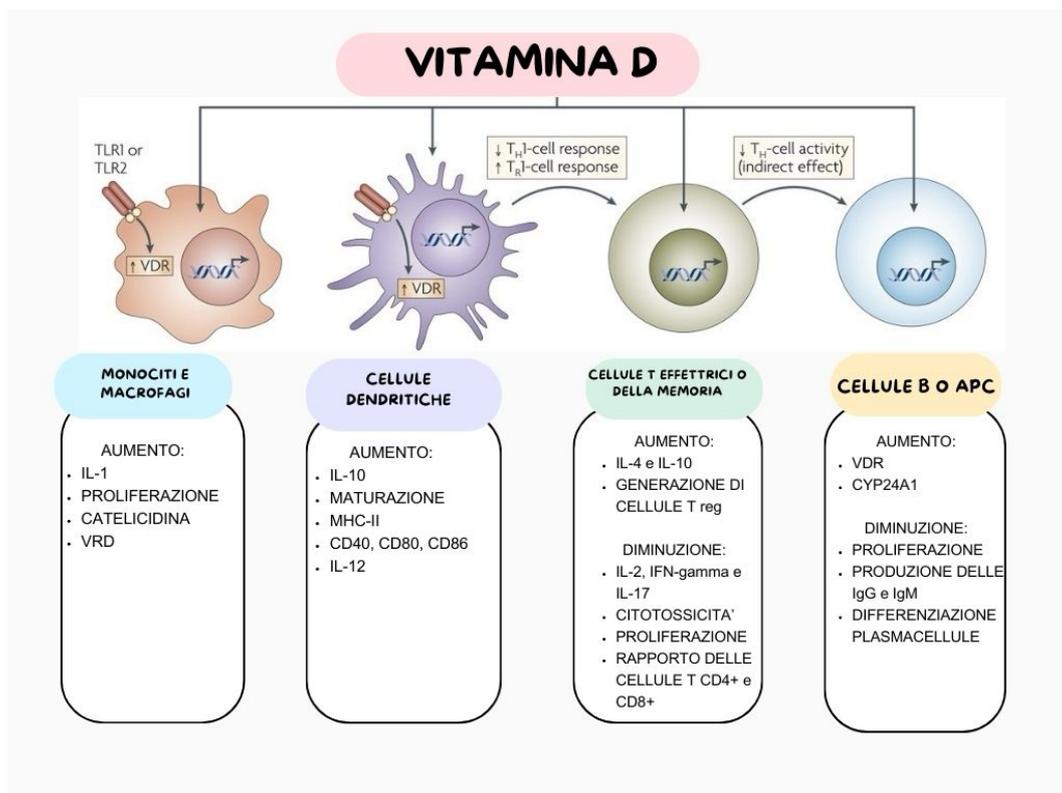


Figura 3.1. Azioni della vitamina D sulle cellule del sistema immunitario

3.2. Vitamina D e cellule dendritiche

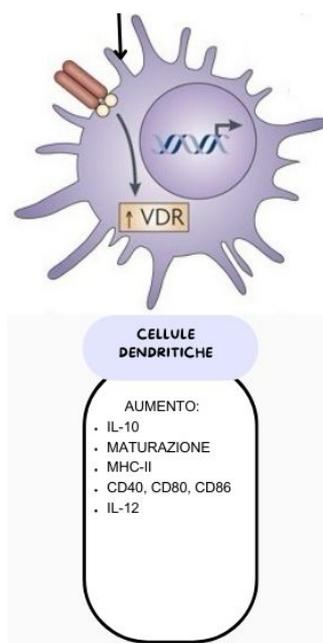


Figura 3.2. Azioni sulle cellule dendritiche

Le DC sono cellule presentanti l'antigene professionali, sono quindi altamente specializzate per la cattura, l'elaborazione e la presentazione dello stesso alle cellule T sia nel timo che nei linfonodi periferici. Una presentazione efficace richiede che le DC immature catturino l'antigene e vadano incontro ad un processo di maturazione indotto da segnali del microambiente in cui si trovano. Se l'antigene viene catturato processato e presentato senza la maturazione delle cellule DC queste inducono tolleranza verso l'antigene. [54] [55]

La somministrazione di vitamina D alle DC CD1+ immature impedisce loro di completare la loro differenziazione infatti mantengono l'espressione dei marker monocitici. [53]

Questo fenomeno trova la sua spiegazione nel fatto che la 1,25-diidrossivitamina D è in grado d'inibire il fattore di trascrizione NF- κ B; tutto ciò genera una soppressione dell'espressione del MHC-II, CD40, CD80 e CD86 (che sono delle molecole costimolatorie), questo porterà ad una diminuzione della capacità delle DC di presentare l'antigene in modo efficace e quindi anche di attivare i linfociti T. [5] [55]

La vitamina D, sempre attraverso l'inibizione NF- κ B, influenza la produzione di citochine da parte delle DC portandole a produrre e rilasciare principalmente IL-10 e riducendo notevolmente la sintesi e rilascio di IL-12 e IL-23. Questo shift nella produzione di citochine si traduce in una ridotta stimolazione dei linfociti Th1 e Th17 a favore della differenziazione delle cellule T regolatorie immunosoppressive Treg1. La vitamina D, quindi, influenza la differenziazione delle DC favorendo la genesi di DC con funzione immunosoppressiva. [53]

Si ritiene però che la vitamina D, oltre a tutte queste azioni inibitorie sulle cellule dendritiche, svolga anche un ruolo essenziale nell'attivare la risposta immunitaria, perché aumenta l'espressione del recettore per il mannosio migliorando così la cattura dell'antigene ed aumentando la capacità di endocitosi. [53]

È stato osservato come durante il processo di maturazione, si assista ad un aumento dell'espressione dell' 1α -idrossilasi associato ad una diminuzione del recettore della vitamina D (VDR). Questo fa sì che le DC mature risultino abbastanza insensibili alla vitamina D, mantenendo così la loro capacità di avviare una risposta linfocitaria e stimolare l'immunità acquisita.

Contemporaneamente la vitamina D che ha origine da queste cellule agisce sul VDR espresso sulle DC immature, frenando ulteriormente la loro maturazione, che altrimenti comporterebbe una sovrastimolazione delle cellule T. [53] [56]

3.3. Vitamina D e immunità innata

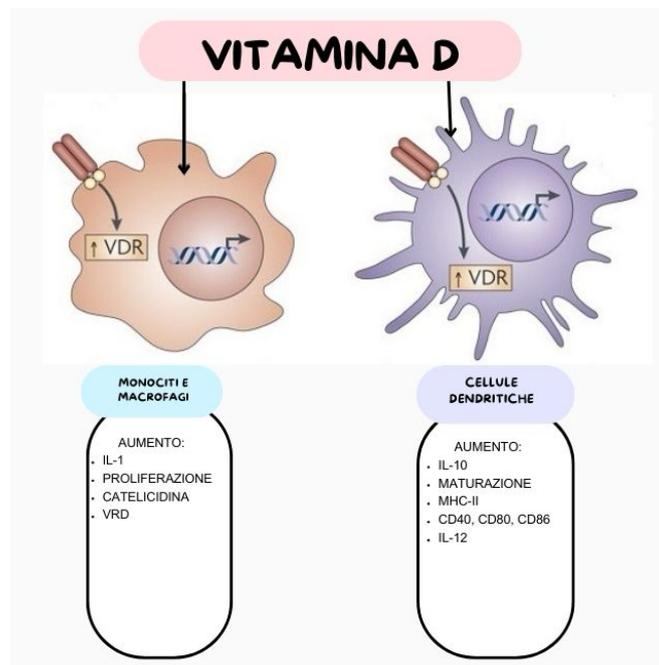


Figura 3.3. Azioni sulle cellule dell'immunità innata

La prima barriera di difesa contro un ampio spettro di microrganismi patogeni (batteri, virus, funghi e protozoi) è rappresentata dall'immunità innata, le cui cellule esprimono i recettori per il riconoscimento di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP).

Tra i recettori di riconoscimento dei PAMP, un ruolo cruciale è svolto dalla classe *Toll Like Receptors* (TLR), che sono dei recettori trans-membrana che attivano la risposta immune mediante il riconoscimento di componenti presenti sui patogeni e sono ampiamente espressi su macrofagi, monociti e cellule polimorfonucleate. [56] Le risposte ai segnali trasmessi dai TLR includono la produzione di citochine e di peptidi antimicrobici; tra quest'ultimi i più prodotti dall'uomo sono la catelicidina, le α -defensine e le β -defensine. [56]

La vitamina D agisce come collegamento positivo tra l'attivazione dei TLR e la produzione di catelicidina, quindi ha un ruolo cruciale nel controllo della risposta antibatterica del sistema immunitario innato.

La catelicidina svolge diverse funzioni nell'immunità innata oltre alla sua azione antibatterica:

- stimola l'aumento dell'espressione e del rilascio di citochine che portano al differenziamento dei linfociti T-helper di tipo 2 (come IL-6, IL-10 e IL-18);
- induce la chemiotassi dei neutrofili, monociti, macrofagi e cellule T;
- stimola il recettore del fattore di crescita epidermico (portando all'attivazione di STAT-1 e STAT-3) che quindi porterà ad un aumento della proliferazione, differenziazione e sopravvivenza delle cellule degli epitelii;
- fa da ponte tra l'immunità innata e quella acquisita/adattativa e questo fa sì che l'organismo possa innescare delle risposte specifiche in base ai diversi patogeni con cui entra in contatto. [5]

Sembrerebbe avere anche un effetto sulla ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) i dati esaminati sono però discordanti tra loro, in quanto alcuni studi suggeriscono un'induzione di iNOS in cellule macrofagiche umane mentre altre ricerche hanno dimostrato che questa vitamina ha degli effetti inibitori. [53]

La vitamina D promuove inoltre l'attività antimicrobica delle cellule mieloidi, ma allo stesso tempo non permette l'espressione dei recettori TLR2 e TLR4 sui monociti, portando queste cellule ad una ridotta risposta ai PAMP; quest'effetto si manifesta con un picco dopo circa 72 ore dalla somministrazione ed ha un ruolo di feedback negativo per evitare un'eccessiva attivazione dei TLR. [53]

Durante il processo di differenziazione in macrofagi o in cellule dendritiche i monociti riducono l'espressione del recettore della vitamina D (VDR), quindi con il progredire della maturazione questi diventano meno sensibili a questa vitamina. La vitamina D possiede un duplice effetto sulla produzione citochinica da parte delle cellule monocitarie: la produzione di IL-1 aumenta ma quella sia di TNF- α che di IL-6 si riduce. [53]

Per quanto riguarda l'effetto della vitamina D sulle cellule Natural Killer (NK), come per la produzione di iNOS, i risultati degli studi sono contrastanti poiché alcuni indicano effetti soppressivi indiretti sull'attività dei NK, mentre altri evidenziano una stimolazione dose-dipendente sulla citotossicità dei NK. [57]

Riassumendo la vitamina D promuove la differenziazione dei monociti in macrofagi, stimolandone il reclutamento la fagocitosi dei patogeni, l'espressione dei *Pathogen-*

Recognition Receptors (PRR) e rendendoli quindi pronti a riconoscere e rispondere all'invasione dei patogeni.

3.4. Vitamina D e immunità adattativa

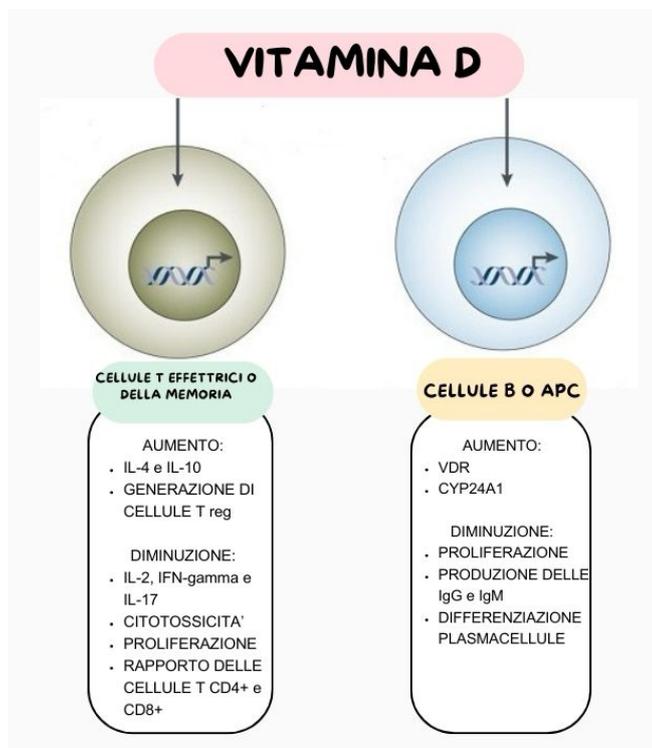


Figura 3.4. Azioni sulle cellule dell'immunità adattativa/acquisita

La vitamina D ha un impatto significativo sia diretto che indiretto sulle cellule T, contribuendo alla regolazione della produzione di citochine cruciali per il differenziamento linfocitario.

L'effetto indiretto sulle cellule T comporta l'inibizione della produzione di citochine che favoriscono i linfociti Th1 (come IFN-gamma e IL-12) e l'attivazione delle risposte dei linfociti Th2 tramite un aumento della produzione di IL-4, IL-5 e IL-10. In più poiché la vitamina D diminuisce la produzione di IL-6 e IL-23 allora limita la risposta dei linfociti Th17 (cellule T-helper il cui ruolo principale è richiamare i leucociti nella zona dell'infezione per contrastare i funghi e batteri) e favorisce la differenziazione e/o l'espansione dei linfociti Treg CD4+/CD25+ (cellule fondamentali per la tolleranza del sistema immunitario) che producono IL-10,

ostacolando così lo sviluppo dei linfociti Th1 e bloccando la produzione di IL-17. [5] [58] [59]

Gli effetti inibitori diretti della vitamina D si possono osservare chiaramente sulle cellule T della memoria perché queste hanno un numero maggiore di VDR rispetto alle cellule naive. [53] In queste cellule la forma attiva della vitamina D aumenta anche l'espressione dei recettori chemochinici CCR10, CCR27 ed inibisce l'espressione di CCR9. [56]

La vitamina D riduce la proliferazione, la differenziazione e la produzione di anticorpi sui linfociti B; e ne aumenta loro apoptosi. [60]

Riassumendo la vitamina D induce differenziazione dei linfociti regolatori e va ad inibire la produzione di IL-6, IL-23 e l'espressione di CCR9.

4 COME IL SISTEMA IMMUNITARIO È REGOLATO DAL MICROBIOTA INTESTINALE

4.1. Cos'è il microbiota intestinale

Il microbiota intestinale rappresenta un ecosistema complesso e dinamico costituito da batteri, virus, protozoi e funghi, adattatisi a colonizzare la mucosa e il lume intestinale, grazie allo sviluppo nel corso dell'evoluzione umana di un rapporto simbiotico con l'organismo umano. [61]

Le stime indicano che il numero di microrganismi presenti nel tratto gastrointestinale sia maggiore ai centomila miliardi di cellule microbiche per grammo, e che queste siano appartenenti a circa duemila specie diverse. [62]

La variabilità intra-individuale del microbiota intestinale, ovvero le differenze nel profilo di specie batteriche tra individui, è influenzata da molteplici fattori quali l'assunzione di antibiotici, le diverse abitudini culturali-alimentari e lo stile di vita. [62] Tuttavia, esiste un insieme di circa 57 specie batteriche comuni a tutti gli individui; i phyla microbici prevalenti nell'intestino umano sono:

- Firmicutes = sono dei gram positivi, rappresentano il phylum predominante nell'intestino, e questo gruppo è composto da tantissimi generi diversi come Lactobacillus, Bacillus, Clostridium ed Enterococcus;
- Bacteroidetes = sono dei gram negativi, rappresentano il secondo phylum intestinale come presenza, e sono rappresentati principalmente dai generi Bacteroides e Prevotella;
- Proteobacteria;
- Fusobacteria;
- Actinobacteria;
- Verrucomicrobia. [63]

Il microbiota intestinale subisce un continuo processo di evoluzione dall'infanzia all'età adulta ed anche durante l'invecchiamento:

- al momento della nascita, la tipologia di parto influisce sulla composizione del microbiota, infatti i neonati nati per via vaginale mostrano una composizione uguale al microbiota delle vie genitali della madre, mentre i

neonati nati per cesareo presentano una composizione simile alla pelle del genitore; [64]

- durante l'allattamento e lo svezzamento il microbiota si arricchisce, i neonati allattati al seno ricevono le comunità microbiche dal latte materno e dalla superficie del seno mentre quelli che assumono latte artificiale mostrano una minore diversità batterica; [65]
- nell'età adulta, il microbiota si completa e rimane stabile, sebbene con composizione e densità differente nei diversi tratti intestinali;
- durante l'invecchiamento invece si verificano modifiche principalmente dovute a scelte alimentari (dovute ad una possibile incapacità nella masticazione) e ad una digestione rallentata. [66]

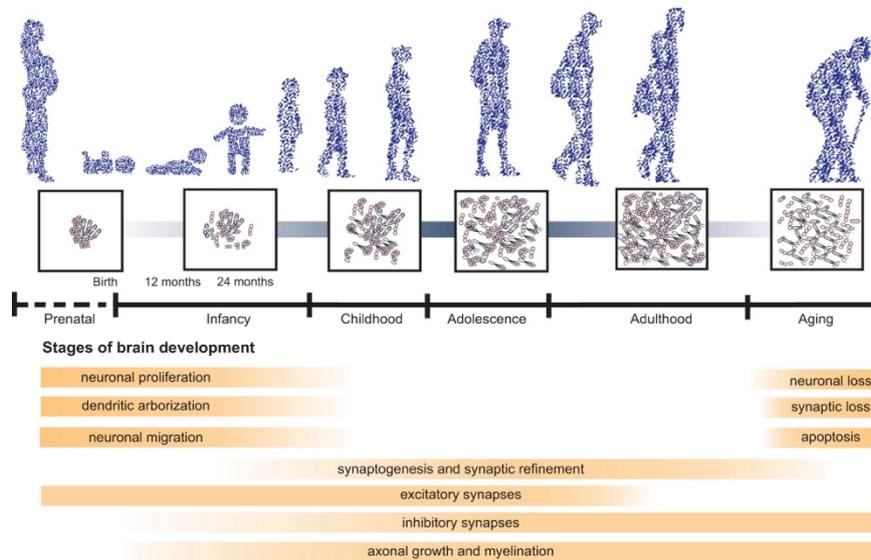


Figura 4.1. Evoluzione del microbiota con il passare dell'età [67]

Una composizione finale del microbiota intestinale equilibrata e sana è caratterizzata da un'ampia e diversificata comunità microbica; tuttavia possono verificarsi situazioni di alterazione della composizione batterica intestinale (note come disbiosi) che sono causate da differenti fattori come l'assunzione di farmaci, l'invecchiamento, le infezioni, la dieta non equilibrata e gli interventi chirurgici. [62]

4.2. Ruolo del microbiota sul sistema immunitario

L'interazione tra i microbi intestinali e l'organismo è rappresentata da un rapporto simbiotico caratterizzato da reciproci benefici; infatti l'ospite fornisce un ambiente ricco di nutrienti, mentre il microbiota offre elementi essenziali per la salute umana.

[63]

Il microbiota intestinale ha un impatto significativo su diversi aspetti della fisiologia umana, infatti è coinvolto in:

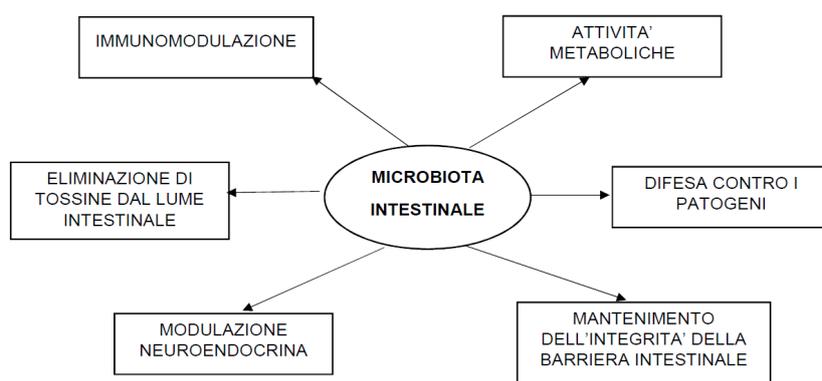


Figura 4.2. Ruoli del microbiota sulla salute umana

1. attività metaboliche:
 - fermenta i carboidrati producendo così acidi grassi a catena corta (SCFA);
 - modula l'omeostasi energetica;
 - amplifica il metabolismo proteico e lipidico;
 - produce vitamine come la K2, la niacina, la tiamina e l'acido nicotinico;
 - metabolizza le ammine e gli antiossidanti;
 - metabolizza/recupera gli acidi biliari;
2. difesa contro i patogeni:
 - abbassa il pH;
 - produce sostanze antibiotiche e antibatteriche;
 - compete per i recettori sulle cellule dell'ospite;
 - da concorrenza per le sostanze nutritive;
3. mantenimento dell'integrità della barriera intestinale, grazie alla produzione di SCFA, enzimi, poliammine e monossido d'azoto il microbiota è in grado di regolare la proliferazione cellulare e le funzioni dell'intestino;

4. modulazione neuroendocrina, produce una numerosa gamma di mediatori che regolano l'attività di vari organi, incluso il cervello;
5. eliminazione di tossine dal lume intestinale;
6. immunomodulazione, stimola il sistema immunitario intestinale (GALT cioè il tessuto linfoide diffuso che si trova nell'apparato intestinale). [68] [69]

Il microbiota intestinale interagisce di continuo con le cellule immunitarie del tessuto intestinale attraverso complessi segnali molecolari; questa comunicazione contribuisce al mantenimento dell'equilibrio tra la tolleranza e la risposta immunitaria, influenzando così la produzione di alcune citochine e mediatori dell'infiammazione. [70]

In aggiunta, il microbiota produce un'ampia varietà di metaboliti bioattivi, come gli SCFA, che possiedono potenti effetti immunomodulatori ed in particolare sono implicati nella regolazione dell'infiammazione. Inoltre, il microbiota è anche coinvolto nella modulazione dell'immunità adattativa perché coopera alla differenziazione e alla funzione delle cellule T e B. Diversi microrganismi (ad esempio il *Lactobacillus*) possono portare alla produzione di anticorpi specifici, offrendo così una protezione contro determinati patogeni. [69]

Durante l'infanzia, il microbiota intestinale prende parte allo sviluppo e alla maturazione del sistema immunitario, favorendo una risposta immunitaria adeguata; fornisce una corretta tolleranza verso i microbi non patogeni (che sono quelli commensali) mentre quelli pericolosi (sono i patogeni riconosciuti come non self) verranno aggrediti e distrutti.

Tuttavia, in presenza di disbiosi, nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) e in altre patologie autoimmuni, si può verificare uno squilibrio nel microbiota. Questo squilibrio porta ad un'infezione cronica e ad una risposta immunitaria iperattiva, portando quindi a numerosi danni al tessuto ospite e causando sintomi dolorosi e invalidanti. [71]

4.3. Disbiosi/microbiota intestinale alterato

Il termine "disbiosi" indica un qualsiasi squilibrio (sia quantitativo che qualitativo) della popolazione batterica intestinale che può causare alterazioni della sua funzione metabolica e della sua distribuzione lungo il tratto intestinale. [68]

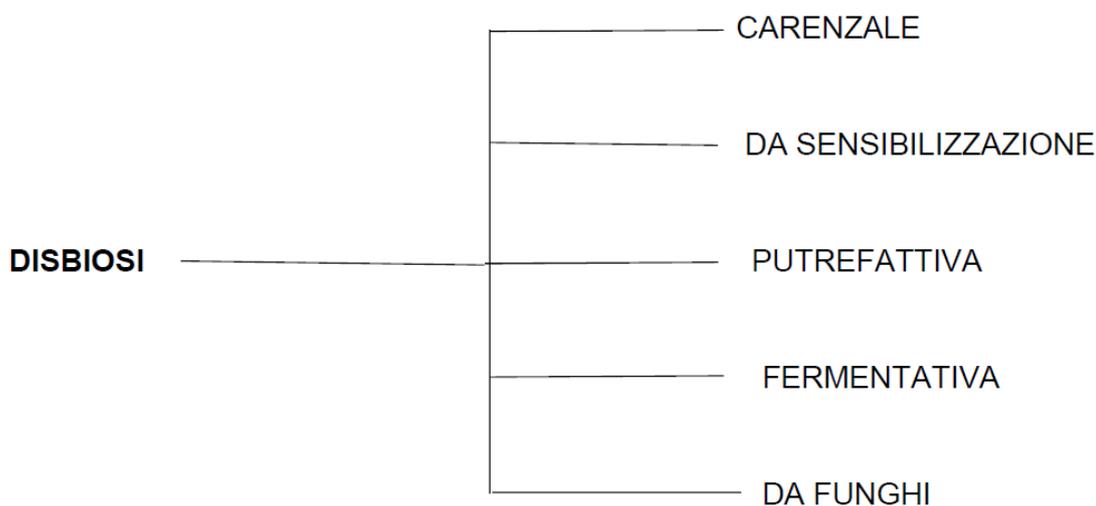


Figura 4.3. Tipologie di disbiosi

Le disbiosi intestinali sono suddivise e classificate in cinque principali tipologie:

1. disbiosi carenziale caratterizzata da un deficit della flora batterica (soprattutto di bifidobatteri e lattobacilli), questa tipologia è favorita da un'alimentazione povera di fibre solubili e ricca di alimenti confezionati/raffinati, oppure può essere causata da trattamenti farmacologici a base di antibiotici;
2. disbiosi da sensibilizzazione causata da una risposta immunitaria diretta contro i batteri della microflora fisiologica;
3. disbiosi putrefattiva favorita da una dieta ricca di carni e grassi di origine animale ma anche povera di fibre, questa porta ad un aumento del numero di batterioidi, clostridi e peptococchi;
4. disbiosi fermentativa che può derivare da un'intolleranza ai carboidrati o da un'esagerata assunzione di zuccheri semplici, perché questa dieta provoca un'elevata fermentazione batterica nell'intestino tenue causando così una sovracrescita dei batteri;

5. disbiosi da funghi associata alla sovracrescita di saccaromiceti o dalla patologia chiamata Candida, è avvantaggiata da un'alimentazione ricca di zuccheri semplici, cibi lievitati, prodotti raffinati e povera di fibre. [68]

Le due tipologie di disbiosi più comuni sono quella da candida e la “small intestinal bacterial overgrowth” (SIBO, sovracrescita batterica nell'intestino tenue). Quest'ultima forma è causata da una concentrazione non fisiologica di batteri che si può verificare attraverso l'aspirato digiunale o dalla presenza di un'atipica flora batterica. Causa manifestazioni che vanno da forme asintomatiche a sindromi da grave malassorbimento.

La SIBO può provocare principalmente nella stragrande maggioranza dei casi sintomi gastrointestinali lievi come gonfiore/dolore addominale e diarrea; inoltre può interferire con l'assorbimento di proteine, grassi, carboidrati, vitamine e altri micronutrienti e spesso è fortemente associata a stati depressivi e di ansia. [72]

4.3.1. Cause di disbiosi

Nell'analisi delle cause di disbiosi intestinale, si parte dall'esame dell'alimentazione del soggetto, questo poiché i batteri intestinali si nutrono soprattutto dei residui non digeriti e non assorbiti degli alimenti consumati.

Si considerano anche i comportamenti e gli stili di vita (come la sedentarietà, l'igiene e il consumo di sigarette); inoltre si studia anche l'interazione iatrogena, dove tra i vari farmaci, sono gli antibiotici quelli principalmente coinvolti nello sviluppo della disbiosi, seguiti poi dagli antiacidi, dai lassativi ed infine dai trattamenti a base di ormoni.

Ulteriori fattori che possono influenzare la disbiosi intestinale sono rappresentati dalle patologie che compromettono il normale funzionamento del sistema digerente, queste includono malattie epatiche, gastriche, delle vie biliari e disordini come la celiachia e l'intolleranza al lattosio. Inoltre, si è osservato come anche che gli stati emotivi come lo stress, la depressione e l'ansia possono essere una causa di questi di queste alterazioni dell'ecosistema microbico. [68]

1. Cause alimentari

- un'assunzione ridotta di fibre può compromettere il nutrimento essenziale dei batteri;

- lo squilibrio tra gli acidi grassi omega-6 e omega-3 può influenzare la composizione del microbiota, aumentando il rischio di malattie infiammatorie intestinali;

- l'eccessivo consumo di zuccheri semplici e farine raffinate può favorire un'elevata fermentazione batterica;

- l'eccesso di proteine può generare metaboliti dannosi (perché quelle non del tutto digerite vengono fermentate nel colon e possono portare alla produzione di ammoniaca, ammine e solfiti);

- una dieta senza glutine può influenzare la composizione del microbiota, ma non può completamente ripristinare l'equilibrio naturale in caso di disbiosi causata da un'alta sensibilità al glutine/celiachia. [68] [73]

2. Stile di vita

- il consumo di alcol può alterare la qualità e la quantità dei microrganismi del microbiota intestinale (perché l'alcol fa sì che i monociti producano più TNF- α); [68] [74]
- il fumo di sigaretta può modificare la composizione del microbiota intestinale, infatti attraverso delle analisi fecali si è notato che i soggetti fumatori hanno una riduzione del rapporto Firmicutes/Bacteroidetes, ma questa situazione può tendere a normalizzarsi in chi smette di fumare; [75]
- l'esercizio fisico può influenzare positivamente il microbiota perché provoca delle modifiche su questo ecosistema intestinale e quindi spesso è usato per prevenire/curare diverse patologie croniche;
- un'eccessiva igiene può compromettere lo sviluppo normale del microbiota intestinale perché riduce la diversità microbica (soprattutto nelle prime fasi di vita) e perciò aumenta il rischio di colonizzazione da agenti infettivi. [76]

3. Cause iatrogene

- gli antibiotici possono portare alla selezione di batteri resistenti e causano uno squilibrio nel microbiota, consentendo quindi la proliferazione di organismi patogeni (come la Candida); [68]
- i lassativi possono favorire la proliferazione selettiva di alcuni ceppi;
- gli inibitori di pompa protonica invece possono aumentare il rischio di sovracrescita batterica nell'intestino tenue a causa della diminuzione del pH gastrico. [77]

4. Stress psico-fisico

I ricercatori hanno osservato notevoli variazioni nelle popolazioni di determinate specie batteriche negli individui che sono sottoposti a forte stress psico-fisico, e questo fenomeno è attribuibile al rilascio elevato di adrenalina in questi stati emotivi, la quale favorisce il flusso biliare che a sua volta promuove la crescita di specifiche specie batteriche nell'intestino.

4.3.2 Patologie correlate alle disbiosi intestinali

Negli ultimi decenni, si è notata una crescente correlazione tra le disbiosi intestinali e diverse patologie come i disturbi autoimmuni, le malattie infiammatorie intestinali (IBD) e le sindromi metaboliche (come l'obesità e il diabete). [78]

Malattie infiammatorie intestinali (IBD)

Le IBD (come la colite ulcerosa e il morbo di Crohn) sono patologie dove sono presenti infiammazioni croniche dell'intestino. Recenti studi hanno rilevato significative modifiche nella composizione e nella funzione del microbiota intestinale in pazienti affetti da queste patologie.

È stata osservata una diminuzione della diversità microbica nei pazienti che soffrono di IBD, nel dettaglio si è osservato un aumento del numero di Proteobacteria e Bacteroidetes e una diminuzione di quello di Firmicutes e Clostridium. A questo è risultata associata una ridotta produzione di SCFA. Diversi studi hanno sottolineato come gli SCFA abbiano un ruolo antiinfiammatorio in diversi modelli, la loro riduzione in queste patologie potrebbe contribuire alla cronicizzazione della malattia infiammatoria intestinale. [78] [79]

Inoltre, è stato osservato anche un aumento del batterio *Escherichia coli*, che causa infiammazione intestinale, e nei pazienti che soffrono del morbo di Chron è stato identificato un nuovo patotipo cioè AIEC (adherente-invasive *Escherichia coli*). [80]

Obesità

È un disturbo medico dove si ha un accumulo eccessivo di grasso corporeo, è una condizione che costituisce una minaccia per la salute dell'individuo ed è un disturbo sempre più presente negli ultimi anni.

Questa condizione è stata collegata, in moltissimi studi, a cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale, perché in questi soggetti c'è un aumento dei Firmicutes e una diminuzione dei Bacteroidetes rispetto agli individui normopeso. [81] [82]

Il microbiota intestinale può influenzare la patogenesi dell'obesità attraverso meccanismi di traslocazione dei batteri che superano lo strato epiteliale della mucosa e quindi causano processi infiammatori. [81] [83]

Diabete

Anche nel diabete di tipo 2 è stata osservata un'alterazioni del microbiota intestinale. Questa malattia ha spesso un'insorgenza tardiva ed è caratterizzata da una quantità insufficiente d'insulina prodotta dalle cellule β del pancreas e anche un'insulino-resistenza.

Attraverso degli studi è stato osservato che i pazienti affetti da questa patologia spesso hanno anche una lieve disbiosi intestinale, un minor numero di batteri che producono SCFA ed un maggior numero di patogeni opportunisti. [84]

Artite reumatoide (AR)

L'artrite reumatoide rappresenta la forma più diffusa d'artrite infiammatoria e provoca un progressivo deterioramento fisico, complicanze sistemiche e una ridotta aspettativa di vita.

Nonostante la sua eziologia non sia ancora completamente conosciuta, alcune disbiosi del microbiota intestinale e orale sono state riscontrate in dei modelli murini che sono stati resi geneticamente suscettibili all'artite reumatoide, quindi recentemente è stato suggerito che i batteri commensali orali possano essere coinvolti nello sviluppo della patologia. [85]

Studi recenti infatti hanno evidenziato che il microbiota presente a livello subgingivale, nei pazienti appena diagnosticati con questa patologia, contiene un quantitativo quasi doppio di *Porphyromonas gingivalis* in confronto agli individui sani. È stato osservato inoltre come dato che avvalorare quest'ipotesi che la disbiosi può essere in parte corretta tramite l'uso di farmaci anti-reumatici. [86]

Psoriasi

La psoriasi rappresenta una condizione cutanea caratterizzata da un'eccessiva proliferazione dei cheratinociti, è originata da un'infiammazione di tipo cronico mediata dalle cellule Th1, Th17 e Th22.

Attualmente le due teorie predominanti che riguardano la natura degli antigeni responsabili della psoriasi sono: la prima che l'antigene sia una proteina riconosciuta come non self, mentre la seconda suggerisce che la psoriasi possa essere scatenata da una disbiosi microbica. [87]

In particolare, la teoria che evidenzia una possibile relazione tra la psoriasi e una compromessa tolleranza nei confronti dei batteri commensali della pelle è supportata dall'osservazione di un'elevata incidenza di malattie come il morbo di Crohn nei pazienti affetti da psoriasi; questo è attribuito a una mancata tolleranza del microbiota intestinale nei soggetti con psoriasi. [88]

Gli studi sulla disbiosi e le patologie ad essa correlate sono ormai diffusi e si osservano in molte condizioni mediche che spaziano da quelle principalmente a livello intestinale, alle allergie, fino a patologie del SNC, come ad esempio l'epilessia e depressione.

Questo ampio campo di ricerca ha catturato molto interesse nella comunità scientifica, poiché le interazioni tra il microbiota intestinale e la salute umana si stanno rivelando molto più intersecate di quanto prima si pensasse. Le ricerche in questo ambito stanno esplorando come la disbiosi possa influenzare la patogenesi di diverse malattie e potenzialmente offrire nuove prospettive per la diagnosi, il trattamento e la prevenzione.

5 L'USO DI PROBIOTICI PER CONTRASTARE LE DISBIOSI

5.1. Cosa sono i probiotici

I probiotici, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e la "Food and Agriculture Organization" (FAO), sono definiti come "microrganismi vivi che, quando somministrati in quantità adeguate, conferiscono benefici per la salute dell'ospite"; inizialmente vennero isolati da colture di prodotti lattiero-caseari.

Questi batteri protettivi includono specie come *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus*, *Clostridium butyricum* e il ceppo *Escherichia coli* Neissle 1917 (non patogeno). [99] [90]

Per essere considerati utili i probiotici devono soddisfare vari criteri:

- appartenere a specie batteriche d'origine umana;
- essere sicuri per l'uso anche in pazienti immunocompromessi;
- essere capaci di sopravvivere al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale, aderire alle cellule intestinali e proteggerle dai patogeni (quindi devono rimanere attivi e vitali in questo ambiente per un lasso di tempo ragionevole a svolgere il loro effetto);
- capaci di produrre sostanze antimicrobiche e battericide. [90]

L'assunzione di probiotici influenza, in maniera benefica, la composizione e la funzione del microbiota intestinale, perché promuove l'equilibrio salutare e previene i disturbi gastrointestinali.

Ai giorni d'oggi i probiotici iniziano ad essere impiegati come integratori da usare insieme ai farmaci per il trattamento di patologie infiammatorie autoimmuni (come l'artrite reumatoide, la colite ulcerosa e il morbo di Chron) e sono anche utilizzati nel cercare di contrastare le patologie metaboliche (come l'obesità ed il diabete). [89]

5.2. L'effetto dei probiotici sulla salute umana

I probiotici sono impiegati per promuovere positivamente la salute umana, potenziando le difese intestinali e inducendo effetti benefici che possono essere di natura immunologica e non.

Gli effetti immunologici sono: l'attivazione dei macrofagi locali, la maggiore produzione di immunoglobuline, la modulazione dei profili delle citochine e la riduzione della risposta agli antigeni alimentari.

Quelli non immunologici invece includono: il supporto alla digestione, la competizione con agenti patogeni per quanto riguarda nutrienti e siti di adesione intestinali, le variazioni del pH e la produzione di batteriocine.

I meccanismi d'azione dei probiotici includono:

1. la modifica del pH intestinale tramite la produzione di acido lattico e acetico, e questo determina lo sviluppo di un ambiente sfavorevole ai patogeni;
2. la produzione di batteriocine che inibiscono la crescita e la virulenza dei batteri patogeni;
3. la perturbazione della comunicazione interbatterica grazie alla produzione e secrezione di autoinducer, molecole di segnalazione che formano la base della comunicazione batterica;
4. il potenziamento della funzione della barriera mucosa grazie a: aumento della produzione/secrezione di muco dalle cellule epiteliali, una minor adesione ed invasione di queste cellule da parte di batteri enteroinvasivi, l'aumento della produzione di β -defensine 2, stabilizzazione delle giunzioni strette ed una continua rigenerazione delle cellule epiteliali;
5. la resistenza alla colonizzazione per competizione con i patogeni e i nutrienti e l'adesione nella nicchia microbiologica;
6. l'influenza sul sistema immunitario attraverso il cross-talk batterio-epitelio che interagisce con il GALT;
7. l'aumento della promozione di linfociti B a plasmacellule e la maggior produzione di immunoglobuline;
8. la modulazione/attivazione dei macrofagi, dei linfociti T e delle cellule natural killer. [91]

L'assunzione di probiotici favorisce una comunicazione a triplice direzione tra probiotico, microbiota intestinale e ospite, portando:

- miglioramenti nella funzione digestiva (riduce i sintomi della dispepsia, costipazione, diarrea e migliora sia la digestione che la regolarità intestinale);
- a rafforzare il sistema immunitario (riduce il rischio d'infezioni e malattie autoimmuni);
- sostegno alla salute mentale (riduce il rischio di ansia e depressione probabilmente grazie all'asse intestino-cervello);
- minor rischio di allergie nelle prime fasi della vita;
- un maggior controllo del peso e prevenzione dell'obesità. [92]

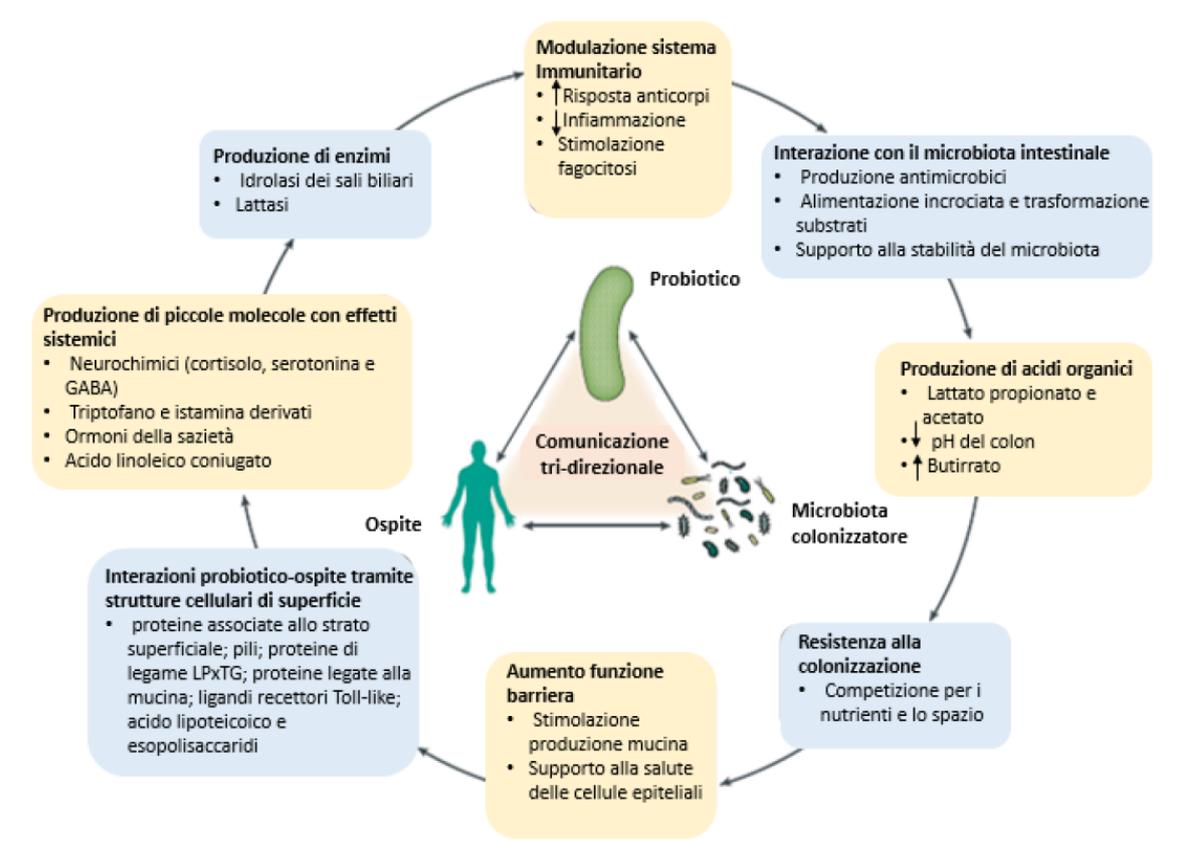


Figura 5.1. Meccanismo d'azione dei probiotici sulla flora intestinale e sulla salute umana [93]

5.3. L'uso dei probiotici per contrastare le patologie in cui è correlata un'alterazione del microbiota

Una gran parte degli studi clinici sull'applicazione dei probiotici si è concentrata sul loro impiego nel trattamento delle malattie infiammatorie intestinali, ma finora i risultati ottenuti non possono essere considerati conclusivi; questo perché alcune ricerche hanno evidenziato effetti promettenti, mentre altri studi non hanno riportato alcun effetto significativo. [94] [95]

| Disease | Probiotic(s) Strain | Participants and Duration of Study | Dose of Probiotics | Main Findings | References |
|---------|---|------------------------------------|---|--|------------|
| CD | <i>Saccharomyces boulardii</i> | 32 adults; 6 mo | 1 g daily | Maintenance of remission | 38 |
| | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | 45 adults; 12 mo | No data | No effect on recurrence | 39 |
| | <i>L. rhamnosus</i> GG | 11 adults; 6 mo | 2×10^9 CFU daily | No effect on moderate to active disease activity | 34 |
| | <i>L. rhamnosus</i> GG | 75 children; 2 yr | 1×10^{10} CFU twice daily | No effect on recurrence in pediatric patients | 40 |
| | <i>Lactobacillus acidophilus (johnsonii) La1</i> | 98 adults; 6 mo | 2×10^9 CFU daily | No effect on postoperative recurrence | 41 |
| | <i>Lactobacillus acidophilus (johnsonii) La1</i> | 70 adults; 12 wk | 1×10^{10} CFU daily | No effect on postoperative recurrence | 42 |
| UC | <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 | 116 adults; 12 mo | 5×10^{10} CFU twice daily (4 capsules) | Maintenance of remission | 32 |
| | <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 | 327 adults; 12 mo | 200 mg once daily | Maintenance of remission | 37 |
| | <i>Enterococci, Bifidus, Lactobacillus</i> | 30 adults; 8 wk | 1.26 g daily | Maintenance of remission | 43 |
| | <i>Bifidobacterium brevis, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus acidophilus</i> | 21 adults; 12 mo | 100 mL daily | Maintenance of remission | 44 |
| | <i>L. rhamnosus</i> GG | 187 adults; 12 mo | 18×10^9 CFU daily | Maintenance of remission | 45 |
| | <i>Bifidobacterium longum</i> | 18 adults; 4 wk | 2×10^{11} CFU daily | Decrease in inflammation | 46 |

CFU, colony-forming unit.

Figura 5.2. Effetti dei probiotici sui pazienti affetti da IBD [94]

Uno studio condotto nel 2013 da Shadnoush e colleghi ha osservato che l'assunzione di yogurt probiotico, contenente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, dopo otto settimane di assunzione ha ridotto significativamente i livelli sierici di IL-1 β , TNF- α e della proteina C reattiva e contemporaneamente ha indotto un aumentato delle concentrazioni di IL-6 e IL-10. [95]

Questi risultati perciò suggeriscono che i probiotici possono aiutare il mantenimento dell'omeostasi gastrointestinale e regolare le risposte immunitarie pro-infiammatorie e antinfiammatorie delle cellule immunitarie che compongono l'intestino.

La maggior parte degli studi sui probiotici utilizza il preparato noto come VSL#3; questo è composto da otto ceppi batterici: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

bulgarius, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium brevis* e *Bifidobacterium infantis*.

Attraverso diverse ricerche si è notato che la somministrazione di questo preparato causa un grande aumento della secrezione di IL-10 e un'inibizione della produzione di IL-12; inoltre è anche in grado di rafforzare l'integrità della barriera intestinale attraverso l'amplificazione dell'espressione delle proteine responsabili della formazione delle giunzioni strette. [96] [97]

La somministrazione di VSL#3 ai bambini affetti da colite ulcerosa ha portato alla remissione della malattia in quasi il 93% dei casi rispetto al gruppo di controllo, e grazie ad uno studio successivo di Shen e collaboratori si è potuto estendere l'uso di questo composto anche agli adulti affetti dalla stessa patologia anche in questi è stato osservato un effetto positivo sull'induzione e il mantenimento della remissione della malattia. [98] [99]

Sono stati condotti anche diversi studi sull'uso dei probiotici nel trattamento dell'obesità e delle patologie metaboliche, e da questi è emerso che l'assunzione di *Lactobacillus* riduce la massa grassa nei pazienti obesi o affetti da diabete di tipo 2; questo perché la somministrazione di questa classe di batteri è in grado di migliorare la sensibilità insulinica, quindi ciò suggerisce che alcuni interventi con i probiotici potrebbero invertire il fenotipo metabolico associato a una dieta ricca di grassi. [100] [101]

6 EFFETTI SULLA SALUTE UMANA DATI DALLA CO-SOMMINISTRAZIONE DI VITAMINA D CON I PROBIOTICI

Il microbiota intestinale svolge un ruolo fondamentale per la salute metabolica e la capacità immunitaria controllando il rinnovo delle cellule epiteliali, la sintesi delle vitamine, la disponibilità dei nutrienti che non sono direttamente ottenibili dalla dieta, l'accumulo di grasso, lo sviluppo cerebrale e stimola il sistema immunitario intestinale (GALT) attraverso complessi segnali molecolari contribuendo così al mantenimento dell'equilibrio tra la tolleranza e la risposta immunitaria. [102] La genetica, l'età, le modifiche dietetiche, lo stress fisiologico e psicologico risultano essere fattori che condizionano la costituzione del microbiota. [103]

Dati recenti suggeriscono che la vitamina D e il suo recettore (VDR) hanno un ruolo importante nella modulazione del microbiota intestinale, in quanto un incremento dell'espressione del VDR può: ridurre le disbiosi intestinali, aumentare l'espressione dei peptidi antimicrobici, migliorare la funzione della barriera intestinale e diminuire le citochine pro-infiammatorie nonché stimolare la produzione di acidi grassi a corta catena da parte dei batteri commensali. [104]

Di conseguenza, la carenza di vitamina D e le mutazioni o i difetti nel segnale del suo recettore (VDR) risultano essere associate a numerose malattie metaboliche e dello sviluppo di alcune patologie cardiovascolari come: rischio di infarto miocardico (IMA), ictus fatali, arteriosclerosi ed aterosclerosi.

Tuttavia, gli studi interventistici sull'assunzione della vitamina D hanno prodotto risultati contrastanti riguardo l'efficacia di tale trattamento per queste patologie. [105] [106]

Al contempo studi condotti sul microbiota intestinale suggeriscono un suo ruolo nel mantenimento dell'omeostasi ossea, nel proteggere l'integrità della barriera intestinale e nel regolare la produzione di metaboliti microbici che possono avere un ruolo sulla salute umana come gli acidi grassi a catena corta. Questi dati suggeriscono che i probiotici con il loro ruolo di ripristinare/mantenere un microbiota sano siano in grado di contribuire alla riduzione dell'infiammazione, prevenire e riparare i danni cellulari. [104]

Allo stesso modo dell'integrazione con la vitamina D, le ricerche sull'assunzione di probiotici hanno evidenziato risultati incerti sulla loro efficacia nel miglioramento di patologie allergie, disturbi gastrointestinali, sindrome metabolica e obesità. [107]

Studi recenti suggeriscono come l'integrazione combinata di vitamina D e probiotici possa avere effetti sinergici sulla modulazione del microbiota intestinale e quindi anche su tutte le funzioni fisiologiche che sembrano essere in parte regolate da esso. [108]

I probiotici hanno dimostrato di migliorare l'assorbimento intestinale della vitamina D e di potenziare l'espressione e l'attività trascrizionale del recettore della vitamina D (VDR). Parallelamente, lo stato del VDR sembra essere cruciale per modulare i meccanismi d'azione dei probiotici e i loro benefici antinfiammatori, immunomodulatori e antinfettivi.

Queste evidenze suggeriscono una reciproca interazione tra vitamina D e probiotici, generando inevitabilmente la possibilità che questo si possa ripercuotere con effetti benefici sulla salute umana. [105] [106]

I potenziali effetti benefici della co-assunzione di vitamina D e probiotici sulla salute umana ipotizzati sono:

- 1) sulla salute dell'intestino: la vitamina D può agire sulla composizione del microbiota intestinale, mentre l'uso dei probiotici può diminuire l'infiammazione e rafforzare la funzione della barriera intestinale, prevenendone la permeabilità; [108]
- 2) sul sistema immunitario: la vitamina D è essenziale per il funzionamento del sistema immunitario, e i probiotici possono modulare la risposta immunitaria migliorando la funzione dei linfociti T e di altre cellule immunitarie; infatti alcuni studi suggeriscono che l'assunzione di vitamina D con probiotici possa ridurre il rischio di infezioni respiratorie e gastrointestinali;
- 3) sull'assorbimento dei nutrienti: i probiotici possono aiutare l'assorbimento della vitamina D grazie a un microbiota intestinale più sano, ed avere una maggiore disponibilità di vitamina D può facilitare l'assorbimento del calcio e di altri nutrienti cruciali; [108]
- 4) sulla salute ossea: la vitamina D è cruciale per la salute delle ossa poiché favorisce l'assorbimento del calcio, mentre i probiotici possono migliorare l'assimilazione dei nutrienti e ridurre l'infiammazione, perciò contribuiscono alla salute del sistema osseo; [114]
- 5) sulla salute mentale: la vitamina D è stata associata alla riduzione dei sintomi depressivi e al miglioramento dell'umore, mentre i probiotici possono anche avere

effetti positivi sul benessere mentale grazie alle connessioni tra salute intestinale e la salute mentale (asse intestino-cervello). [110]

6.1. Studi che hanno valutato la co-somministrazione della vitamina D e dei probiotici

Le ricerche principali che hanno studiato l'applicazione della co-somministrazione di vitamina D e probiotici si sono concentrate principalmente sull'uso di questa co-integrazione per trattare: la schizofrenia, l'osteopenia, il diabete di tipo 2, il diabete gestazionale, la sindrome dell'ovaio policistico, le coliche infantili nei neonati, l'IBS (sindrome dell'intestino irritabile), le persone obese. [109]

6.1.1. Studio che valuta l'effetto della co-integrazione in pazienti affetti da schizofrenia

Lo studio è stato supportato da evidenze che dimostravano l'esistenza di una interazione tra nutrizione e salute mentale, questa relazione è mediata da un'intricata rete di neurotrasmettitori e percorsi ormonali situati nell'intestino, che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione delle funzioni cerebrali. [110]

In particolare, i neurotrasmettitori (come la serotonina e la dopamina), prodotti nell'intestino, influenzano direttamente il benessere psicologico, modulando l'umore, l'ansia e la risposta allo stress. Inoltre, gli ormoni intestinali interagiscono con il SNC facilitando una comunicazione bidirezionale che contribuisce alla regolazione dei processi cognitivi ed emotivi.

Questi risultati sottolineano l'importanza di una dieta equilibrata e ricca di nutrienti specifici, non solo per il benessere fisico ma anche per la salute mentale e il funzionamento ottimale del cervello.

Aver osservato bassi livelli di vitamina D nei pazienti schizofrenici ha fatto supporre che l'integrazione di 25(OH)D3 avrebbe potuto migliorare i profili clinici e metabolici nei disturbi neuropsichiatrici. A supporto anche studi precedenti, tra cui quello di McGrath nel 2003 e la ricerca di Humble nel 2010, hanno osservato come i pazienti che hanno ricevuto un'integrazione di vitamina D superiore a 2.000 UI/die hanno riportato un significativo miglioramento dei sintomi di psicosi, depressione e schizofrenia. [111] [112]

Successive sperimentazioni hanno mostrato che i disturbi neuropsichiatrici, sopra citati potrebbero essere modulati attraverso l'assunzione di probiotici e di substrati microbici. In particolare, l'integrazione con probiotici per 14 settimane ha eliminato i sintomi somatici comuni (tra cui: psicosi, deliri, allucinazioni, appiattimento dell'affettività, deficit cognitivi, ...) nei pazienti ambulatoriali affetti da schizofrenia. [113]

Questo suggerisce che i trattamenti con singoli integratori (di probiotici o di vitamina D) nelle malattie neuropsichiatriche possono produrre alcuni miglioramenti, e di conseguenza i ricercatori hanno ipotizzato che l'uso combinato di vitamina D e probiotici potesse determinare ulteriori miglioramenti, soprattutto nei pazienti schizofrenici con carenza di vitamina D. [113]

Lo studio condotto da Ghaderi ha avuto lo scopo di valutare gli effetti dell'integrazione di vitamina D e probiotici sui sintomi clinici della schizofrenia cronica. Si tratta di uno studio randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo, svolto nel 2017, che ha coinvolto 60 individui.

La gravità dei sintomi psichiatrici è stata misurata utilizzando la scala PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale*), uno strumento medico/analitico utilizzato per valutare la severità dei sintomi nei pazienti schizofrenici. [110]

I criteri di inclusione per partecipare al trial richiedevano che i partecipanti avessero una diagnosi di schizofrenia da almeno due anni, un punteggio PANSS di almeno 55, fossero stati trattati con clorpromazina e agenti anticolinergici negli ultimi sei mesi e avessero un'età compresa tra 25 e 65 anni.

Sono stati invece esclusi dallo studio i soggetti con ritardo mentale, dipendenza da alcol o sostanze stupefacenti, trattati con litio, carbamazepina o acido valproico, donne in allattamento, donne in gravidanza e individui che avevano assunto antidepressivi nei 6 mesi precedenti.

Nello studio sono stati coinvolti 60 pazienti affetti da schizofrenia cronica per il trattamento di una durata di 12 settimane. I partecipanti sono stati divisi in due gruppi: il primo gruppo ha ricevuto 50.000 UI di vitamina D3 ogni 2 settimane, insieme a 8×10^9 CFU (colonia per capsula) al giorno di integratori probiotici (*contenenti: Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus fermentum e Bifidobacterium bifidum*) mentre al secondo gruppo è stato somministrato un placebo. [110]

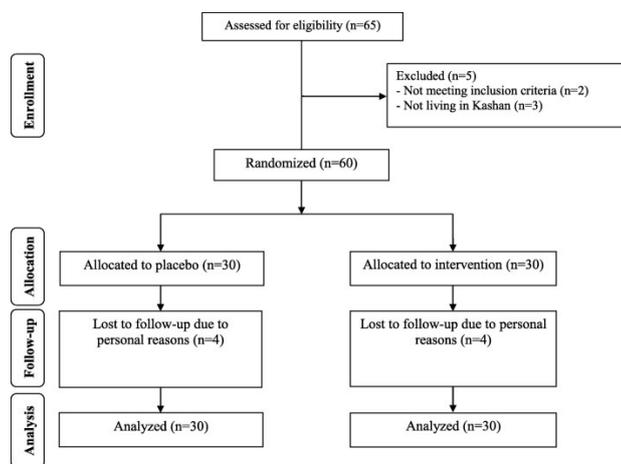


Figura 6.1.1. Strategia adottata per la divisione dei pazienti in questo studio [110]

I risultati ottenuti al termine delle 12 settimane hanno mostrato che la terapia con vitamina D insieme ai probiotici rispetto al placebo ha portato ad un:

- miglioramento significativo nei punteggi PANSS totali, nella capacità antiossidante totale (TAC) e nel rapporto HDL-colesterolo;
- diminuzione significativa dei livelli delle proteine C-reattive ad alta sensibilità (hs-CRP), del glucosio plasmatico a digiuno, delle concentrazioni d'insulina e dei livelli di colesterolo totale. [110]

Tabella 6.1.1. Cambiamenti delle variabili metaboliche dati dallo studio sui pazienti con schizofrenia trattati con placebo o con l'assunzione di vitamina D insieme ai probiotici [110]

| | Placebo group (n = 30) | Vitamin D plus probiotics group (n = 30) |
|------------------------------|---------------------------|---|
| PANSS subscales | | |
| Negative | -1.9 ± 0.6 | -4.0 ± 0.6 |
| Positive | -0.4 ± 0.6 | -0.2 ± 0.6 |
| General | 0.7 ± 0.7 | -3.5 ± 0.7 |
| Total | -1.8 ± 1.4 | -7.5 ± 1.4 |
| BPRS | 2.7 ± 1.6 | -2.4 ± 1.6 |
| 25-OH-vitamin D (ng/mL) | 0.2 ± 0.5 | 9.1 ± 0.5 |
| TAC (mmol/L) | -22.3 ± 17.2 | 52.7 ± 17.2 |
| GSH (μmol/L) | 16.6 ± 20.4 | 107.7 ± 20.4 |
| MDA (μmol/L) | 0.2 ± 0.1 | -0.3 ± 0.1 |
| hs-CRP (mg/L) | -0.2 ± 0.3 | -2.4 ± 0.3 |
| NO (μmol/L) | 0.8 ± 0.5 | 0.4 ± 0.5 |
| FPG (mg/dL) | -0.7 ± 1.6 | -6.5 ± 1.6 |
| Insulin (μU/mL) | 0.5 ± 0.4 | -2.7 ± 0.4 |
| HOMA-IR | 0.1 ± 0.1 | -0.8 ± 0.1 |
| QUICKI | 0.0001 ± 0.003 | 0.01 ± 0.003 |
| Triglycerides (mg/dL) | 11.5 ± 4.9 | -9.1 ± 4.9 |
| VLDL-cholesterol (mg/dL) | 2.3 ± 1.0 | -1.8 ± 1.0 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 6.6 ± 3.1 | -5.6 ± 3.1 |
| LDL-cholesterol (mg/dL) | 5.1 ± 2.7 | -3.1 ± 2.7 |
| HDL-cholesterol (mg/dL) | -0.6 ± 1.1 | -0.9 ± 1.1 |
| Total-/HDL-cholesterol ratio | 0.3 ± 0.1 | -0.04 ± 0.1 |

Le criticità di questo studio risiedono nel fatto che non è stato caratterizzato il microbiota intestinale, impedendo di stabilire se esso sia stato alterato dopo le 12 settimane di trattamento. Inoltre, avendo utilizzato un placebo come controllo, non è possibile determinare con certezza se i risultati ottenuti siano attribuibili alla co-integrazione o all'effetto di una delle due componenti somministrate.

Pertanto, per ottenere risultati più affidabili, sarebbe opportuno progettare nuovi trial che valutino anche la composizione del materiale fecale e che utilizzino, come controllo, esclusivamente la vitamina D o il probiotico, invece del placebo. Un'ulteriore ricerca che valuta gli effetti della co-somministrazione di probiotici e vitamina D sulla funzione cognitiva nei pazienti schizofrenici è stata condotta da Mohammadi nel 2024. Questo studio ha adottato un disegno randomizzato in doppio cieco controllato con placebo e ha coinvolto 70 pazienti per una durata di 12 settimane. [114]

I criteri di inclusione prevedevano un'età compresa tra i 18 e i 65 anni, l'assenza di problemi gastrointestinali e la manifestazione dei sintomi tipici della schizofrenia da almeno 6 mesi. I criteri di esclusione, invece, comprendevano la presenza di lesioni cerebrali, traumi cranici, ritardo mentale, Parkinson, epilessia, diabete ed epatite, nonché l'uso di oppioidi, farmaci antidepressivi e farmaci per la perdita di peso nei 3 mesi precedenti; inoltre, sono state escluse le donne in gravidanza e allattamento.

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi distinti: al primo gruppo sono stati somministrati giornalmente 400 UI di vitamina D e 2×10^9 CFU di un integratore probiotico (contenente: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium longum* e *Bacillus coagulans*), mentre al secondo gruppo è stato somministrato un placebo. [114]

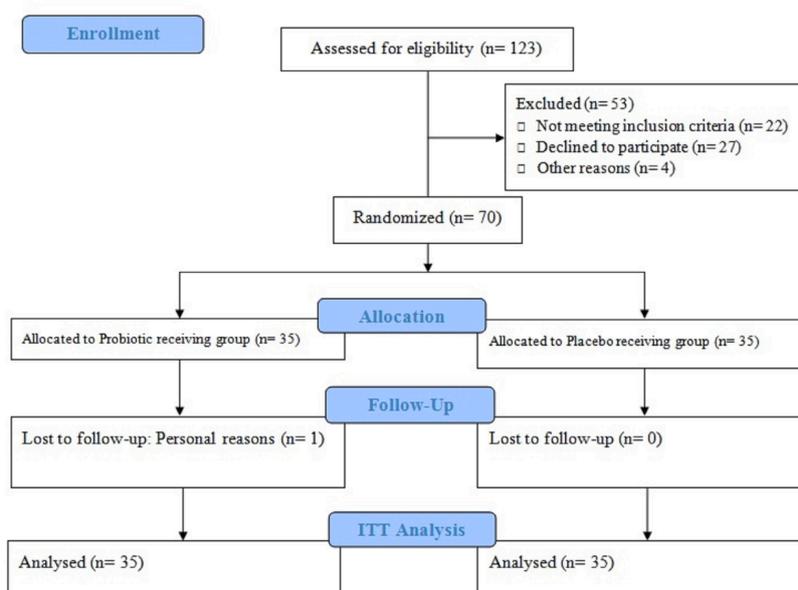


Figura 6.1.1.2 Strategia adottata per la divisione dei pazienti in questo studio [114]

La gravità della malattia e i sintomi cognitivi sono stati valutati come esiti primari utilizzando il test PANSS e il test MoCA. Quest'ultimo è un test di screening impiegato per valutare le funzioni cognitive, analizzando diverse aree tra cui attenzione e concentrazione, funzioni esecutive, memoria, linguaggio, abilità visivo-spaziali, abilità di calcolo e orientamento. La scala di punteggio del MoCA varia da 0 a 30, con un punteggio di 26 o superiore generalmente indicativo di uno stato cognitivo sano.

Gli esiti secondari considerati nello studio includevano il profilo lipidico, l'indice di massa corporea (BMI), i problemi gastrointestinali, i livelli sierici di proteina C-reattiva (CRP) e la velocità di sedimentazione degli eritrociti (ESR). [114]

Dopo 12 settimane di trattamento, i risultati ottenuti dalla co-integrazione di probiotici e vitamina D hanno mostrato:

- un aumento di 1,96 unità nel punteggio MoCA rispetto al gruppo placebo;

- un aumento della percentuale di soggetti con un punteggio MoCA superiore a 26;
- una diminuzione significativa del colesterolo totale (TC), della glicemia a digiuno (FBS) e dei livelli di CRP. [114]

Tabella 6.1.1.2 Cambiamenti delle variabili metaboliche dati dallo studio sui pazienti con schizofrenia trattati con placebo o con l'assunzione di vitamina D insieme ai probiotici [114]

| Variables | Groups | Time points | | | | | | Baseline adjusted MM | MMD | p-Value** | |
|-----------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------------|--------------|--------------|----------|
| | | Baseline | 2 weeks | 4 weeks | 6 weeks | 8 weeks | 10 weeks | | | | 12 weeks |
| PANSS | Placebo (n=35) | 43.49 ± 11.48 | 44.94 ± 12.98 | 42.40 ± 11.09 | 41.69 ± 10.16 | 42.54 ± 10.79 | 42.94 ± 11.66 | 42.17 ± 9.14 | 51.20 ± 1.50 | -2.82 ± 2.41 | 0.247 |
| | Probiotic (n=34) | 63.09 ± 12.02 | 61.09 ± 13.64 | 61.32 ± 15.26 | 59.18 ± 14.73 | 56.15 ± 16.88 | 54.47 ± 18.51 | 50.15 ± 16.03 | 48.36 ± 1.53 | | |
| | p-Value* | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.003 | 0.015 | | | |
| MoCA | Placebo (n=35) | 20.60 ± 6.18 | 21.06 ± 5.55 | 21.83 ± 5.42 | 21.43 ± 6.27 | 21.57 ± 5.53 | 21.26 ± 5.84 | 21.69 ± 5.50 | 19.47 ± 0.43 | 1.96 ± 0.65 | 0.004 |
| | Probiotic (n=34) | 15.23 ± 4.27 | 15.38 ± 4.48 | 17.50 ± 4.15 | 19.17 ± 3.92 | 20.29 ± 4.18 | 21.29 ± 4.19 | 22.58 ± 3.60 | 21.43 ± 0.44 | | |
| | p-Value* | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.078 | 0.283 | 0.976 | 0.423 | | | |

| Variable | Time point | Probiotic (n=35) | | Placebo (n=35) | | MMD | p-Value** |
|--------------------------|----------------------|------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|--------|-----------|
| | | Mean ± SD | MD | Mean ± SD | MD | | |
| BMI (kg/m ²) | Before | 27.26 ± 5.03 | 0.17 (-2.21; 1.96) | 25.50 ± 6.67 | 0.43 (-0.83; 4.61) | -0.32 | 0.169 |
| | After | 27.53 ± 5.25 | | 26.04 ± 6.61 | | | |
| | p-Value* | 0.086 | | 0.004 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 29.61 ± 0.16 | | 29.93 ± 0.16 | | | |
| TG (mg/dL) | Before | 141.24 ± 75.56 | -8.00 (-253.00; 212.00) | 158.88 ± 101.50 | 1.00 (-107.00; 22.00) | -12.43 | 0.317 |
| | After | 131.36 ± 79.67 | | 157.63 ± 92.46 | | | |
| | p-Value* | 0.453 | | 0.705 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 138.48 ± 8.83 | | 150.91 ± 8.57 | | | |
| TC (mg/dL) | Before | 164.69 ± 40.72 | -15.00 (-143.00; 78.00) | 153.08 ± 43.83 | 4.00 (-10.00; 24.00) | -17.79 | 0.011 |
| | After | 146.21 ± 34.18 | | 155.86 ± 45.91 | | | |
| | p-Value* | 0.019 | | 0.044 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 142.01 ± 4.88 | | 159.81 ± 4.74 | | | |
| LDL (mg/dL) | Before | 90.71 ± 30.25 | -7.00 (-56.00; 49.00) | 78.09 ± 31.20 | 1.00 (-8.00; 25.00) | -6.73 | 0.104 |
| | After | 81.97 ± 25.62 | | 78.80 ± 5.35 | | | |
| | p-Value* | 0.055 | | 0.525 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 76.71 ± 2.94 | | 83.45 ± 2.76 | | | |
| HDL (mg/dL) | Before | 40.89 ± 7.98 | 1.00 (-7.00; 10.00) | 41.82 ± 10.48 | -7.00 (-36.00; 32.00) | 5.68 | 0.002 |
| | After | 42.11 ± 6.90 | | 36.82 ± 9.17 | | | |
| | p-Value* | 0.062 | | 0.026 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 42.30 ± 1.21 | | 36.62 ± 1.25 | | | |
| LDL/HDL | Before | 2.28 ± 0.86 | -0.01 (-1.76; 1.33) | 1.91 ± 0.69 | -0.04 (-0.53; 0.61) | 0.20 | 0.135 |
| | After | 2.34 ± 0.78 | | 1.88 ± 0.73 | | | |
| | p-Value* | 0.481 | | 0.644 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 2.21 ± 0.09 | | 2.01 ± 0.08 | | | |
| FBS (mg/dL) | Before | 104.58 ± 13.60 | -8.00 (-58.00; 30.00) | 100.88 ± 12.02 | 3.00 (-12.00; 11.00) | -8.63 | 0.009 |
| | After | 96.09 ± 18.24 | | 102.77 ± 10.46 | | | |
| | p-Value* | 0.018 | | 0.036 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 95.09 ± 2.29 | | 103.73 ± 2.25 | | | |
| CRP (mg/L) | Before | 2.46 ± 8.48 | 0.00 (-42.00; 7.60) | 3.66 ± 1.51 | -0.50 (-3.20; 2.00) | -2.33 | <0.001 |
| | After | 0.77 ± 2.15 | | 3.19 ± 1.35 | | | |
| | p-Value* | 0.305 | | 0.002 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 0.82 ± 0.33 | | 3.15 ± 0.29 | | | |
| ESR (mm/h) | Before | 14.10 ± 14.83 | 8.00 (-23.00; 47.00) | 7.46 ± 4.33 | 3.00 (-4.00; 13.00) | 0.63 | 0.694 |
| | After | 11.63 ± 12.02 | | 7.09 ± 4.16 | | | |
| | p-Value* | 0.135 | | 0.227 | | | |
| | Baseline adjusted MM | 9.52 ± 1.15 | | 8.89 ± 1.06 | | | |

Le principali limitazioni di questa ricerca includono l'assenza di dati sullo stato della

vitamina D nei pazienti e la mancanza di informazioni dettagliate sui farmaci utilizzati dai soggetti durante lo studio, oltre alla co-somministrazione.

Studi che possano tenere in conto anche di questi aspetti permetterebbero di ottenere risultati più significativi che possano stabilire gli effetti specifici della co-integrazione di vitamina D e probiotici sui pazienti affetti da schizofrenia.

6.1.2. Studio che valuta gli effetti della co-somministrazione sulle donne in postmenopausa che soffrono di osteopenia

Come già dimostrato, la vitamina D è essenziale per la salute delle ossa, in particolare nelle donne che soffrono di osteopenia. Recenti studi hanno evidenziato che alcuni ceppi di probiotici possono aumentare i livelli plasmatici di questa vitamina e di conseguenza, si è ipotizzato che l'assunzione combinata di vitamina D e probiotici possa essere efficace sia nel trattamento sia nella prevenzione dell'osteoporosi nelle donne in menopausa.

Lo studio condotto da Jafarnejad nel 2017 aveva lo scopo di valutare gli effetti dell'integrazione di probiotici multispecie, insieme alla vitamina D, sui biomarcatori e sulla densità ossea nelle donne in postmenopausa con osteopenia.

Questo studio randomizzato in doppio cieco ha coinvolto 50 pazienti di età compresa tra i 50 e 72 anni, affette da osteopenia, suddivise in 2 gruppi e ha avuto la durata di 6 mesi.

Tutte le partecipanti hanno ricevuto una terapia quotidiana di 500 mg di calcio e 200 UI di vitamina D; la differenza però è stata che il primo gruppo ha assunto calcio, 25(OH)D3 e un placebo mentre il secondo gruppo ha ricevuto calcio, vitamina D e un integratore probiotico multispecie (*contenente Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium breve e Streptococcus thermophilus*).

I risultati ottenuti al termine del trattamento indicano che l'uso combinato di vitamina D e probiotici rispetto alla somministrazione della vitamina, ha determinato una significativa riduzione dei livelli:

- di fosfatasi alcalina specifica per l'osso;
- dell'ormone paratiroideo;
- del fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α).

Tuttavia, non sono stati osservati effetti sulla densità minerale ossea totale della colonna vertebrale e dell'anca. [114]

6.1.3. Studio che valuta gli effetti della co-integrazione sui parametri della salute mentale e sullo stato metabolico nei pazienti diabetici di tipo 2 affetti da malattie coronariche

Le malattie coronariche (CHD) e il diabete di tipo 2 (T2DM) rappresentano i principali fattori di rischio di mortalità. Queste patologie, prima di essere letali, spesso generano deterioramento cognitivo, sintomi depressivi, infiammazione cronica, stress ossidativo e disabilità funzionale. Inoltre, nelle persone affette da T2DM, l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia possono provocare disturbi metabolici che portano a una ridotta sintesi di ossido nitrico (NO) nelle pareti dei vasi sanguigni; quest'ultimo normalmente ha il compito di controllare la circolazione del sangue (dilatando le pareti vasali) e regola il rilascio di ormoni e neurotrasmettitori (come l'adrenalina). [117]

Studi iniziali hanno dimostrato che l'assunzione di vitamina D 50.000 UI ogni due settimane per 6 mesi nei pazienti diabetici affetti da CHD ha avuto effetti benefici sul controllo glicemico, sui livelli di proteina C-reattiva ad alta sensibilità e sulla sintesi di NO, glutatione e malondialdeide, senza tuttavia influenzare altri profili metabolici. [118]

In un altro studio, in pazienti affetti da steatosi epatica non alcolica l'integrazione di 25(OH)D3 50.000 UI settimanali per 10 settimane ha ridotto l'insulino-resistenza e i livelli di glucosio a digiuno. [119]

Parallelamente altre ricerche hanno dimostrato che l'integrazione con i probiotici nei pazienti che soffrono di T2DM migliora i valori del glucosio a digiuno e del colesterolo HDL, ma non influenza gli altri marcatori del controllo glicemico ed i profili lipidici; inoltre nello studio del 2013 condotto da Jones si è osservato che aumenta notevolmente la vitamina D circolante in risposta all'integrazione probiotica orale. [120]

Incrociando questi risultati e considerando gli effetti antiossidanti e antinfiammatori della vitamina D e dei probiotici, è stata ipotizzata l'utilità della co-integrazione di 25(OH)D3 e probiotici nelle persone diabetiche o affette da CHD.

Su queste basi è stato generato lo studio condotto da Raygan nel 2018, che ha valutato gli effetti di questa co-somministrazione sui parametri dello stato metabolico, depressivo ed ansiogeno.

La studio era randomizzato, in doppio cieco, controllata con placebo e ha avuto una durata di 12 settimane i pazienti arruolati avevano un'età compresa tra 45 e 85 anni e una diagnosi di diabete di tipo 2; sono stati esclusi i soggetti che avevano assunto vitamina D o probiotici negli ultimi 3 mesi e i pazienti con disturbi della tiroide.

I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi di 30 individui ciascuno, e tutti hanno ricevuto 50.000 UI di vitamina D3 ogni due settimane. Inoltre, il primo gruppo ha assunto 8×10^9 CFU al giorno di integratori probiotici (*contenenti Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus fermentum e Bifidobacterium bifidum*), mentre il secondo gruppo ha ricevuto un placebo insieme alla vitamina D.

[116]

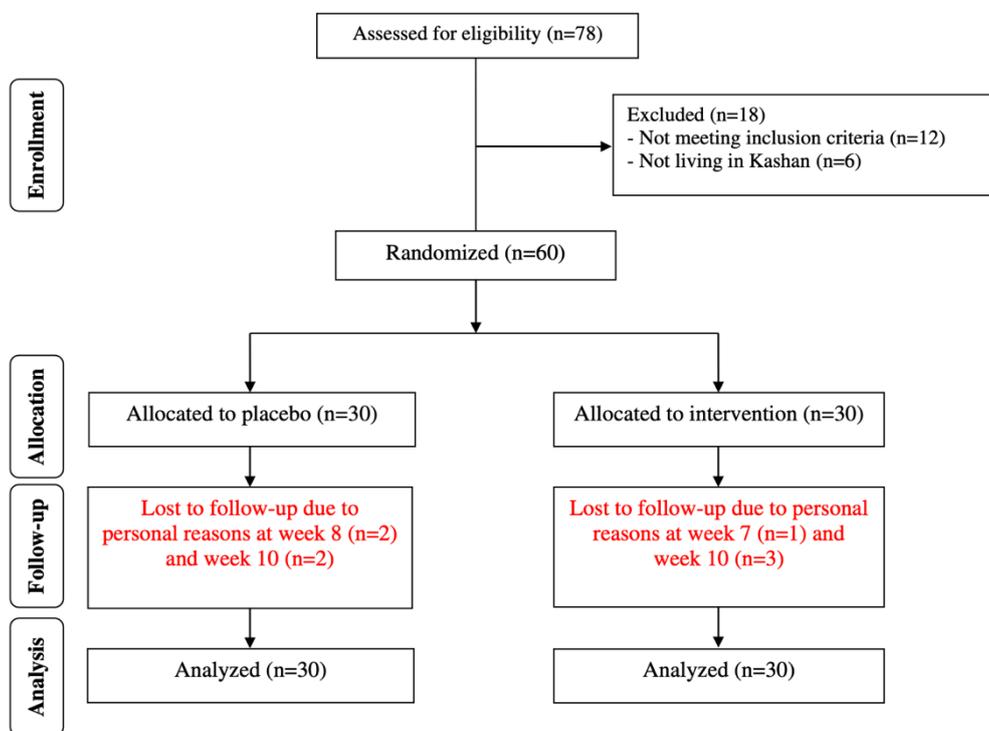


Figura 6.1.3. Strategia adottata per la divisione dei pazienti in questo studio [116]

I risultati osservati da questo studio hanno evidenziato che la co-integrazione di vitamina D e probiotici ha favorito:

- un miglioramento nei punteggi dei questionari redatti dai pazienti sulla depressione (BDI), sull'ansia (BAI) e sulla salute generale (GHQ);

- una riduzione vantaggiosa dei livelli di insulina e dell'insulino-resistenza (HOMA-IR);
- un aumento significativo dei livelli sierici di vitamina D, dell'indice di controllo quantitativo della sensibilità insulinica (QUICKI) e dei livelli sierici di colesterolo HDL;
- una variazione dei livelli di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP), di ossido nitrico plasmatico (NO) e della capacità antiossidante totale plasmatica (TAC). [116]

Tabella 6.1.3. Cambiamenti dei parametri della salute mentale e dello stato metabolico nei pazienti diabetici di tipo 2 affetti da CHD e trattati con placebo o con l'assunzione di vitamina D insieme ai probiotici [116]

| | Placebo group (n = 30) | | | Vitamin D plus probiotic group (n = 30) | | |
|-------------------------------|------------------------|-----------------|----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Baseline | End-of-trial | Change | Baseline | End-of-trial | Change |
| Serum 25-OH-vitamin D (ng/mL) | 13.8 ± 3.0 | 13.9 ± 3.4 | 0.1 ± 1.4 | 14.7 ± 2.9 | 26.5 ± 6.1 | 11.8 ± 5.9 |
| BDI score | 21.5 ± 3.9 | 20.6 ± 3.7 | -0.9 ± 2.1 | 23.2 ± 4.6 | 20.4 ± 3.4 | -2.8 ± 3.8 |
| BAI score | 16.5 ± 4.0 | 15.7 ± 3.7 | -0.8 ± 1.4 | 17.9 ± 4.7 | 15.8 ± 4.0 | -2.1 ± 2.3 |
| GHQ score | 46.5 ± 7.0 | 45.4 ± 5.7 | -1.1 ± 3.4 | 49.1 ± 7.7 | 45.1 ± 5.7 | -3.9 ± 4.1 |
| FPG (mg/dL) | 126.8 ± 34.9 | 124.3 ± 34.8 | -2.5 ± 17.9 | 121.3 ± 49.7 | 114.9 ± 46.6 | -6.3 ± 26.5 |
| Insulin (μIU/mL) | 13.1 ± 7.8 | 13.3 ± 7.9 | 0.2 ± 4.9 | 13.7 ± 7.3 | 10.9 ± 7.4 | -2.8 ± 3.8 |
| HOMA-IR | 4.0 ± 2.5 | 3.9 ± 2.5 | -0.1 ± 1.5 | 4.2 ± 3.7 | 3.2 ± 2.6 | -1.0 ± 1.6 |
| QUICKI | 0.32 ± 0.02 | 0.32 ± 0.02 | -0.001 ± 0.01 | 0.32 ± 0.03 | 0.35 ± 0.06 | 0.03 ± 0.04 |
| Triglycerides (mg/dL) | 153.5 ± 65.4 | 153.6 ± 61.6 | 0.1 ± 17.7 | 149.2 ± 92.3 | 137.4 ± 61.5 | -11.8 ± 69.7 |
| VLDL-cholesterol (mg/dL) | 30.7 ± 13.1 | 30.7 ± 12.3 | 0.01 ± 3.5 | 29.8 ± 18.5 | 27.5 ± 12.3 | -2.4 ± 13.9 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 146.7 ± 29.1 | 146.9 ± 33.9 | 0.3 ± 18.0 | 138.8 ± 41.7 | 144.2 ± 33.3 | 5.4 ± 30.5 |
| LDL-cholesterol (mg/dL) | 72.6 ± 18.7 | 73.3 ± 23.9 | 0.8 ± 16.4 | 68.1 ± 29.1 | 73.5 ± 28.2 | 5.4 ± 20.6 |
| HDL-cholesterol (mg/dL) | 43.4 ± 8.2 | 42.8 ± 7.4 | -0.5 ± 3.8 | 40.9 ± 8.2 | 43.2 ± 8.2 | 2.3 ± 3.5 |
| hs-CRP (ng/mL) | 3430.9 ± 2939.3 | 3691.4 ± 3024.7 | 260.5 ± 2298.2 | 3410.0 ± 2384.9 | 2460.0 ± 2135.8 | -950.0 ± 1811.2 |
| NO (μmol/L) | 37.7 ± 8.2 | 36.3 ± 8.7 | -1.4 ± 6.7 | 38.5 ± 3.9 | 40.2 ± 3.3 | 1.7 ± 4.0 |
| TAC (mmol/L) | 1032.8 ± 367.7 | 915.8 ± 284.5 | -116.9 ± 324.2 | 987.9 ± 91.7 | 1000.5 ± 91.4 | 12.6 ± 41.6 |
| GSH (μmol/L) | 510.6 ± 123.0 | 498.4 ± 158.5 | -12.2 ± 122.5 | 686.4 ± 80.5 | 704.4 ± 142.7 | 18.0 ± 112.7 |
| MDA (μmol/L) | 3.3 ± 1.3 | 3.4 ± 1.0 | 0.1 ± 0.7 | 2.8 ± 0.2 | 2.7 ± 0.3 | -0.1 ± 0.3 |
| SBP (mm Hg) | 129.2 ± 8.5 | 128.2 ± 9.9 | -1.0 ± 6.1 | 132.7 ± 7.9 | 132.0 ± 8.4 | -0.7 ± 6.4 |
| DBP (mm Hg) | 78.0 ± 8.3 | 76.7 ± 7.8 | -1.3 ± 6.1 | 76.8 ± 7.2 | 76.1 ± 7.0 | -0.7 ± 4.7 |

Questo studio appare incompleto in quanto non è stata misurata la carica batterica fecale né prima né dopo il trattamento, e non è stato valutato l'effetto della co-integrazione sull'espressione genica correlata all'infiammazione ed alla insulino-resistenza.

6.1.4. Studio che valuta gli effetti della co-supplementazione sullo stato metabolico e sugli esiti della gravidanza nelle donne affette da diabete gestazionale

Il diabete mellito gestazionale (GDM) cioè l'intolleranza al glucosio diagnosticata durante la gravidanza può generare effetti avversi come il ricorrere al taglio cesareo, portare a un parto prematuro o alla macrosomia, influenzando negativamente la salute sia della madre sia della prole nel lungo termine. [122]

Studi precedenti hanno dimostrato che la carenza di vitamina D è correlata a un aumento del rischio di sviluppare GDM [123], inoltre altre ricerche hanno suggerito che il trattamento con 1,25(OH)₂D₃ può migliorare l'insulino-resistenza e ridurre l'infiltrazione di lipidi nella placenta, diminuendo così la probabilità di sviluppare GDM o addirittura prevenendo l'insorgenza di questa patologia. [124]

La composizione del microbiota intestinale è una componente fondamentale dello stato metabolico, l'uso dei probiotici ne può alterare la composizione producendo sostanze antimicrobiche che favoriscono la crescita dei batteri benefici e l'inattivazione delle tossine dei batteri patogeni, in più possono sostenere la resistenza alla colonizzazione attraverso l'aumento della produzione di muco e la competizione per i recettori. [125]

Questi risultati hanno portato Jamilian nel 2019, a valutare gli effetti della co-somministrazione di vitamina D e probiotici sui profili metabolici, i biomarcatori dell'infiammazione, lo stress ossidativo e sugli esiti della gravidanza nelle donne con GDM. [121]

Lo studio, condotto era randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo, ha avuto una durata di 6 settimane, e ha coinvolto pazienti che avevano un'età compresa tra 18 e 40 anni, una diagnosi di GDM e fossero alla loro prima gravidanza.

I criteri di esclusione erano l'essere in terapia insulinica, avere ipo o ipertiroidismo, aver assunto vitamina D o integratori probiotici nei 3 mesi precedenti, soffrire di eclampsia ed essere fumatrici.

Lo studio ha coinvolto 87 donne, suddivise in 3 gruppi: il primo gruppo, composto da 30 pazienti, ha ricevuto 50.000 UI di vitamina D ogni 2 settimane più 8×10^9 CFU al giorno di un integratore probiotico (*contenente Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus fermentum e Bifidobacterium bifidum*); il

secondo gruppo, composto da 29 pazienti, ha ricevuto solo l'integratore probiotico; infine, il terzo gruppo, composto da 27 donne, ha ricevuto un placebo. [121]

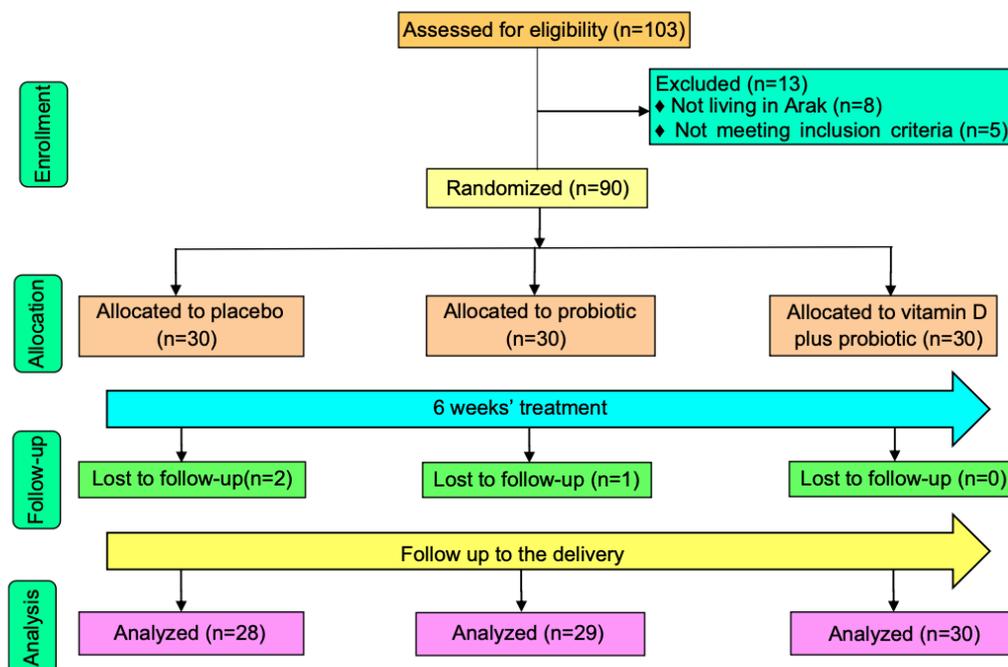


Figura 6.1.4. Strategia adottata per la divisione dei pazienti in questo studio [121]

I risultati ottenuti dopo le 6 settimane di trattamento hanno mostrato che la co-integrazione di vitamina D e probiotici, rispetto alla assunzione della vitamina e dei probiotici singolarmente, ha portato a:

- una riduzione importante del glucosio plasmatico a digiuno, dei livelli di insulina sierica e dei livelli di insulino-resistenza (HOMA-IR);
- un notevole aumento dell'indice di controllo quantitativo della sensibilità insulinica (QUICKI), dei livelli di glutazione e della capacità antiossidante totale (TAC);
- una diminuzione dei livelli di trigliceridi, dei livelli di VLDL, del rapporto tra HDL e colesterolo totale, dei livelli di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) e del livello di malondialdeide (MDA) [121]

Tabella 6.1.4. Cambiamenti dei parametri sullo stato metabolico nelle pazienti affette da diabete gestazionale e trattate o con l'assunzione di vitamina D insieme ai probiotici o con solo integratore probiotico oppure con un placebo [121]

| Variables | Placebo group (n = 28) | | Probiotic group (n = 29) | | Vitamin D plus probiotic group (n = 30) | |
|-----------------------------|------------------------|---------------|--------------------------|---------------|---|---------------|
| | Wk0 | Wk6 | Wk0 | Wk6 | Wk0 | Wk6 |
| 25-hydroxyvitamin D (ng/mL) | 14.3 ± 4.1 | 17.7 ± 3.7 | 12.9 ± 3.2 | 18.5 ± 3.1 | 13.4 ± 4.1 | 35.1 ± 3.9 |
| FPG (mg/dL) | 94.1 ± 6.1 | 93.0 ± 7.9 | 96.6 ± 3.4 | 86.5 ± 7.6 | 95.4 ± 2.2 | 83.1 ± 5.7 |
| Insulin (μIU/mL) | 13.6 ± 2.5 | 13.4 ± 2.9 | 13.1 ± 7.7 | 11.7 ± 6.6 | 12.8 ± 4.6 | 10.8 ± 5.1 |
| HOMA-IR | 3.1 ± 0.6 | 3.1 ± 0.8 | 3.1 ± 1.9 | 2.5 ± 1.5 | 3.0 ± 1.1 | 2.2 ± 1.1 |
| QUICKI | 0.32 ± 0.009 | 0.32 ± 0.01 | 0.33 ± 0.03 | 0.34 ± 0.05 | 0.32 ± 0.01 | 0.34 ± 0.03 |
| Triglycerides (mg/dL) | 157.2 ± 39.7 | 171.9 ± 42.6 | 160.6 ± 60.5 | 153.1 ± 60.5 | 170.5 ± 58.2 | 145.6 ± 53.4 |
| VLDL-cholesterol (mg/dL) | 31.4 ± 7.9 | 34.4 ± 8.5 | 32.1 ± 12.1 | 30.6 ± 12.1 | 34.1 ± 11.7 | 29.1 ± 10.7 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 222.6 ± 40.8 | 225.8 ± 33.0 | 219.1 ± 36.4 | 219.6 ± 37.4 | 221.7 ± 39.1 | 215.4 ± 46.7 |
| LDL-cholesterol (mg/dL) | 135.4 ± 36.6 | 136.9 ± 33.4 | 133.1 ± 34.2 | 134.9 ± 34.1 | 132.8 ± 35.7 | 128.4 ± 39.1 |
| HDL-cholesterol (mg/dL) | 55.8 ± 14.8 | 54.5 ± 12.8 | 53.8 ± 12.0 | 54.1 ± 10.9 | 54.9 ± 10.7 | 57.9 ± 11.3 |
| Total-/HDL-cholesterol | 4.2 ± 1.2 | 4.3 ± 1.2 | 4.2 ± 0.9 | 4.1 ± 0.8 | 4.1 ± 1.0 | 3.8 ± 0.8 |
| hs-CRP (mg/L) | 5.2 ± 2.2 | 5.7 ± 2.2 | 5.4 ± 1.9 | 4.4 ± 1.3 | 6.2 ± 1.3 | 4.4 ± 1.3 |
| NO (μmol/L) | 30.0 ± 4.1 | 29.8 ± 3.7 | 32.3 ± 4.5 | 33.0 ± 5.5 | 28.5 ± 5.1 | 29.4 ± 6.7 |
| TAC (mmol/L) | 722.4 ± 140.9 | 704.2 ± 95.5 | 723.7 ± 226.7 | 739.7 ± 224.2 | 797.6 ± 80.2 | 860.2 ± 92.1 |
| GSH (μmol/L) | 577.8 ± 260.3 | 577.4 ± 246.9 | 501.3 ± 59.9 | 511.9 ± 55.6 | 479.7 ± 100.6 | 548.8 ± 123.9 |
| MDA (μmol/L) | 3.2 ± 0.9 | 3.4 ± 1.0 | 2.8 ± 0.6 | 2.7 ± 0.5 | 3.3 ± 0.6 | 3.1 ± 0.7 |

Anche questo studio non ha tenuto conto della caratterizzazione del microbiota, che impedisce di determinare se la somministrazione abbia alterato la sua composizione, e dalla mancata analisi degli effetti della vitamina D e dei probiotici sull'espressione genica relativa ai profili metabolici.

6.1.5. Studio che valuta gli effetti della co-integrazione sulla salute mentale, sui parametri di stress ormonale, infiammatorio ed ossidativo nelle donne con la sindrome dell'ovaio policistico

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è una delle endocrinopatie ginecologiche più comuni nelle donne in età pre-menopausale; la qualità della vita delle donne affette da questa patologia può essere compromessa dalla presenza di irsutismo, irregolarità mestruali, disturbi della salute mentale e acne.

Infatti il danno ossidativo, l'iperandrogenismo e l'infiammazione cronica possono giocare un ruolo centrale nella PCOS.

La presenza di specie radicaliche libere prodotte dalla risposta infiammatoria delle cellule policistiche può generare alti livelli di androgeni e l'aumento dei marcatori infiammatori sistemici (come la proteina C-reattiva) a cui è associato un rischio maggiore di sviluppare diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari. [\[127\]](#)

È stato scoperto che i livelli fisiologici di vitamina D hanno un effetto benefico sulla ricettività endometriale, mentre livelli eccessivi possono essere dannosi per lo sviluppo degli ovociti e sulla qualità dell'embrione. [\[128\]](#)

Studi precedenti avevano rivelato che le donne affette da PCOS spesso presentano una carenza di vitamina D e questo deficit è legato ad un'elevata insulino-resistenza e ad un aumento dei livelli di testosterone.

In uno altro studio, l'uso di integratori probiotici per 12 settimane nelle donne con PCOS ha portato a un miglioramento dei profili androgenici, dei parametri di stress ossidativo e delle concentrazioni di proteina C-reattiva. [\[129\]](#)

La somministrazione di vitamina D alle donne con PCOS ha dimostrato che può avere un impatto positivo sui marcatori infiammatori sistemici e sul danno ossidativo, mentre l'assunzione di probiotici ha mostrato effetti promettenti nel trattamento delle anomalie metaboliche, quali l'aumento dei fattori infiammatori, lo stress ossidativo, l'insulino-resistenza e la dislipidemia aterogena.

Ostadmohammadi, nel 2019 sulla base di questi presupposti ha ricercato l'effetto della co-integrazione di vitamina D e probiotici sull'irsutismo, sulla salute mentale, sui parametri di stress ormonale e sui biomarcatori dell'infiammazione e del danno ossidativo nelle pazienti affette dalla sindrome dell'ovaio policistico. [\[126\]](#)

Lo studio è stato randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo, ha avuto una durata di 12 settimane ed ha coinvolto 60 donne con PCOS diagnosticata, d'età compresa tra i 18 e 40 anni e con un indice di massa corporea tra 17 e 34 kg/m².

Dalla ricerca sono state escluse le donne in gravidanza, in allattamento, con tumori secernenti androgeni, con disfunzioni della tiroide, affette da diabete, da ansia o depressione e con iperplasia surrenale.

Le partecipanti sono state divise in due gruppi: il primo gruppo ha ricevuto 50.000 UI di vitamina D ogni due settimane insieme a 8×10^9 CFU al giorno di un integratore probiotico (contenente: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* e *Bifidobacterium bifidum*), mentre il secondo gruppo ha ricevuto un placebo. [126]

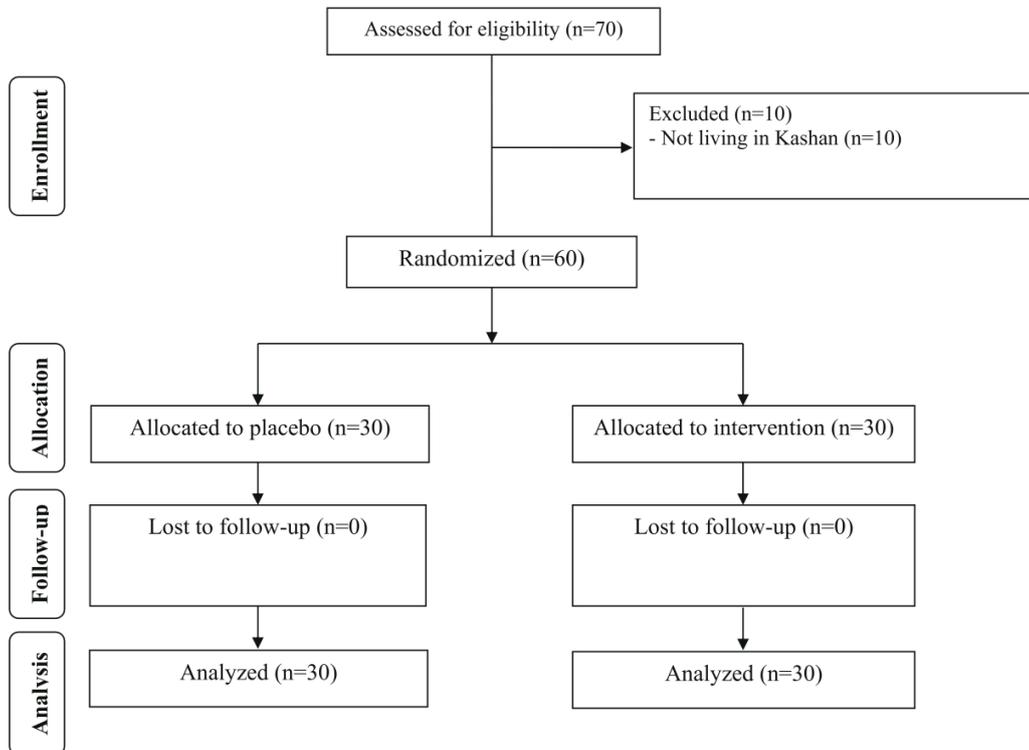


Figura 6.1.5. Strategia adottata per la divisione dei pazienti in questo studio [126]

I risultati ottenuti dopo le 12 settimane di somministrazione congiunta di vitamina D e probiotici mostrano:

- un significativo miglioramento nel punteggio dei questionari sulla salute generale (GHQ);
- una diminuzione notevole dei livelli di testosterone totale, dell'irsutismo, dei livelli di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) e dei livelli di malondialdeide (MDA);
- un aumento della capacità antiossidante totale (TAC).

Tuttavia, non è stato osservato nessun miglioramento sull'acne e sulla alopecia probabilmente in quanto i livelli plasmatici delle globuline leganti gli ormoni sessuali (SHBG) e dell'ossido nitrico (NO) non si sono modificati. [126]

Tabella 6.1.5. Cambiamenti dei parametri sulla salute mentale, sui profili ormonali e sui biomarcatori dell'infiammazione e del danno ossidativo nelle donne affette da PCOS e trattate l'assunzione di vitamina D insieme ai probiotici oppure con un placebo [126]

| Variables | Placebo group (n = 30) | | Vitamin D plus probiotic group (n = 30) | |
|-----------------------------|------------------------|--------------|---|--------------|
| | Baseline | Week 12 | Baseline | Week 12 |
| 25-hydroxyvitamin D (ng/mL) | 12.9 ± 3.2 | 13.3 ± 2.7 | 11.1 ± 4.1 | 24.4 ± 5.6 |
| BDI total scores | 13.8 ± 3.6 | 13.2 ± 3.7 | 12.9 ± 4.1 | 11.9 ± 3.4 |
| GHQ scores | 42.7 ± 9.1 | 41.9 ± 8.9 | 40.4 ± 6.7 | 38.7 ± 6.8 |
| DASS scores | 82.5 ± 11.8 | 80.8 ± 12.4 | 81.5 ± 12.2 | 78.9 ± 12.3 |
| PSQI | 7.5 ± 2.8 | 6.5 ± 3.0 | 7.8 ± 2.7 | 5.8 ± 2.1 |
| Total testosterone (ng/mL) | 1.1 ± 0.4 | 1.1 ± 0.3 | 1.0 ± 0.3 | 0.9 ± 0.2 |
| SHBG (nmol/L) | 40.2 ± 5.0 | 40.3 ± 5.3 | 38.4 ± 5.9 | 39.6 ± 5.7 |
| mF-G scores | 13.9 ± 3.0 | 13.6 ± 3.0 | 14.98 ± 3.2 | 13.5 ± 3.3 |
| hs-CRP (mg/L) | 3.7 ± 1.0 | 3.8 ± 1.3 | 3.8 ± 1.1 | 3.2 ± 0.8 |
| NO (µmol/L) | 33.3 ± 4.9 | 32.3 ± 5.5 | 34.2 ± 1.0 | 33.6 ± 0.8 |
| TAC (mmol/L) | 835.1 ± 101.7 | 830.9 ± 93.8 | 850.5 ± 82.7 | 919.2 ± 85.4 |
| GSH (µmol/L) | 475.8 ± 71.7 | 491.7 ± 81.0 | 510.4 ± 99.3 | 556.5 ± 97.2 |
| MDA (µmol/L) | 2.7 ± 0.5 | 2.6 ± 0.5 | 2.9 ± 0.3 | 2.5 ± 0.2 |

Anche questa ricerca presenta delle limitazioni, dovute alla mancata caratterizzazione del microbiota intestinale prima, durante e dopo la co-somministrazione.

6.1.6. Studio che valuta gli effetti della co-somministrazione sulle coliche infantili

Le coliche infantili sono una condizione comune nei neonati che, sebbene sia considerata autolimitante e benigna, rappresenta una fonte significativa di stress per i genitori. In quanto il senso psicologico di impotenza nel migliorare le condizioni del proprio figlio e la mancanza di sonno causata dal pianto eccessivo notturno del bambino generano nell'adulto uno stato di malessere. [\[131\]](#) [\[132\]](#)

Nei neonati sani di età inferiore ai tre mesi le coliche si manifestano con episodi di pianto inconsolabile che possono durare anche fino a 3 ore e si verificano almeno 3 giorni alla settimana per un periodo di circa un mese.

Ricerche come quelle di De Weerth (2013) e di Savino (2009), condotte sulle coliche neonatali hanno dimostrato che il microbiota intestinale dei neonati affetti da questa sindrome è caratterizzato da una riduzione dei lattobacilli e un aumento dei batteri coliformi; questo squilibrio può essere una possibile causa dell'aumento della motilità intestinale, della produzione di flatulenza nei neonati e la conseguente crisi di pianto. [\[133\]](#)

Studi recenti hanno suggerito l'uso di integratori di vitamina D nei neonati, poiché un deficit di questa vitamina può portare a una maggiore suscettibilità alle lesioni intestinali.

Parallelamente alcuni trial clinici hanno riportato che i probiotici, in particolare a base di *Lactobacillus reuteri*, possono essere utili nel ridurre il pianto nei neonati allattati al seno con coliche. Tuttavia, lo studio di Sung ha rilevato che non ci sono ancora prove sufficienti per supportarne l'uso nella prevenzione in tutti i neonati ma solo che i probiotici mostrano effetti positivi nella gestione delle coliche infantili.

Sulla base di queste ricerche, è stato predisposto un trial da Savino e collaboratori nel 2015, il cui obiettivo era valutare l'efficacia della somministrazione orale di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 insieme a vitamina D3 nel ridurre le coliche infantili nei neonati di 10 giorni di età. [\[130\]](#)

Questo lavoro prospettico e randomizzato è stato svolto in Italia, ed in questa ricerca sia i genitori che i medici erano a conoscenza del tipo di trattamento, mentre il Valutatore degli esiti del trial (TOA) era all'oscuro.

L'obiettivo dello studio era dimostrare che la co-somministrazione di vitamina D e probiotici potesse ridurre:

- l'uso di farmaci analgesici per il trattamento delle coliche infantili, come il cimetropro bromuro (un composto antimuscarinico e anticolinergico) e il simeticone (un agente antischiama che favorisce l'espulsione dei gas addominali);
- il passaggio all'alimentazione con latte artificiale e proseguire per più tempo con l'allattamento al seno;
- l'intervento richiesto dai genitori al pediatra e le visite agli ambulatori pediatrici a causa delle coliche infantili. [130]

I criteri di inclusione prevedevano che i neonati avessero meno di 10 giorni di vita, un'età gestazionale tra le 37 e le 42 settimane e un peso alla nascita compreso tra 2,5 e 4,3 kg; mentre sono stati esclusi i neonati prematuri e quelli affetti da ipossia perinatale o da enterocolite necrotizzante.

In questo studio sono stati inizialmente ammessi 138 neonati, ma solo 113 sono stati campionati e divisi in due gruppi randomizzati; 25 di questi sono stati esclusi poiché non soddisfacevano i criteri di inclusione o perché i genitori non hanno fornito il consenso.

Al primo gruppo, composto da 58 neonati, sono stati somministrati solo 400 UI di vitamina D3 ogni giorno. Tuttavia, 4 neonati sono stati successivamente esclusi a causa dello sviluppo di infezioni urinarie o di reflusso gastroesofageo. Al secondo gruppo, composto da 55 neonati, sono stati somministrati 400 UI di vitamina D3 insieme a 5 gocce contenenti *Lactobacillus reuteri* al giorno. Anche in questo gruppo, 4 neonati sono stati esclusi per infezioni urinarie o delle vie respiratorie, o per reflusso gastroesofageo.[130]

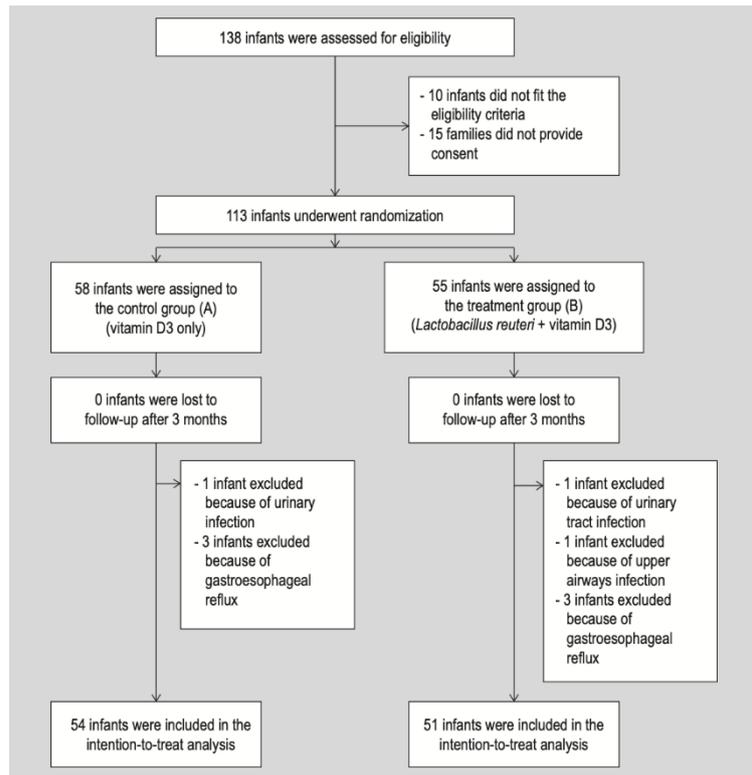


Figura 6.1.6. Strategia adottata per la divisione dei pazienti in questo studio [130]

I risultati ottenuti dopo 12 settimane di somministrazione congiunta di vitamina D e probiotici, rispetto al gruppo che ha assunto solo la vitamina, hanno mostrato che i genitori dei neonati hanno consultato con meno frequenza i pediatri e si sono ridotte le visite ambulatoriali per episodi di coliche infantili rispetto ai genitori dei neonati che hanno ricevuto solo vitamina D.

Inoltre, è diminuito significativamente l'uso di farmaci analgesici nel gruppo trattato con la co-somministrazione; nel gruppo trattato, solo 1 neonato ha ricevuto cimetropio bromuro (rispetto ai 24 neonati del gruppo di controllo) e solo 11 neonati hanno ricevuto simeticone (rispetto ai 48 del gruppo di controllo).

La co-integrazione ha anche ridotto il passaggio all'utilizzo di latte artificiale: solo 7 neonati nel gruppo di trattamento sono passati al latte artificiale, rispetto ai 20 neonati del gruppo che ha ricevuto solo vitamina D. [130]

Tabella 6.1.6. Risultati della co-assunzione di vitamina D e probiotici rispetto al solo utilizzo di vitamina D nei bambini che soffrono di coliche infantili [130]

| Endpoint | <i>Lactobacillus reuteri</i> + vitamin D3 (n=51) | Vitamin D3 (n=54) |
|--|---|----------------------------------|
| Primary endpoints | | |
| Use of cimetropium bromide | 1 | 24 |
| Use of simethicone | 11 | 48 |
| Secondary endpoint | | |
| Use of infant formula in the first three months | 7 | 20 |
| | <i>Lactobacillus reuteri</i> + vitamin D3 (average \pm SD) | Vitamin D3 (average \pm SD) |
| Phone calls for each infant ² | 5.04 \pm 2.64 | 8.40 \pm 3.58 |
| Visits for each infant ² | 2.66 \pm 1.77 | 4.98 \pm 1.89 |

Le problematiche riscontrate in questo studio sono numerose. Innanzitutto, i dati raccolti non sono stati ottenuti in doppio cieco, il numero di partecipanti al trial era molto ristretto, e sia l'intensità che la frequenza delle coliche infantili sono state rilevate tramite dati indiretti e soggettivi.

Sarebbe utile anche valutare gli effetti del *Lactobacillus reuteri* da solo con quelli del *Lactobacillus reuteri* associato alla vitamina D3, al fine di determinare se la co-somministrazione sia effettivamente più efficace del singolo probiotico.

6.1.7. Studio che valuta gli effetti della co-assunzione nei pazienti affetti dalla sindrome dell'intestino irritabile

La sindrome dell'intestino irritabile (IBS) è una malattia cronica recidivante che influisce significativamente sulla qualità della vita e in base alla sintomatologia che ne consegue si divide in: IBS con stitichezza (IBS-C), IBS con diarrea (IBS-D) e IBS con effetti misti (IBS-M)

La terapia per l'IBS è principalmente focalizzata sul trattamento dei sintomi attraverso l'uso di loperamide per la diarrea, metilcellulosa per la stitichezza e rilassanti del muscolo liscio per il dolore addominale. Tuttavia queste terapie hanno un successo limitato e non sono sempre essere efficaci nella gestione a lungo termine dell'IBS. [135]

Una recente revisione sistematica di 35 studi sull'uso dei probiotici nell'IBS ha mostrato che in 25 di questi si sono osservati effetti benefici sui sintomi generali della malattia. [136]

Un altro studio ha sperimentato la somministrazione di alte dosi di vitamina D (3.000 UI al giorno) su di un paziente affetto da sindrome dell'intestino irritabile, quello che ha mostrato è una remissione completa dei sintomi dopo l'integrazione della vitamina ma poi ha avuto una recidiva al terminato del trattamento. [137]

Un ulteriore dato che supporta l'importanza della vitamina D nella gestione dell'IBS è che il 70% dei pazienti affetti da questa patologia presenta anche un deficit di questa vitamina.

I dati sopra presentati hanno generato l'interrogativo se l'assunzione di vitamina D, la somministrazione di probiotici, o la combinazione di entrambi potesse avere effetti favorevoli sull'IBS; questo quesito ha portato alla ricerca del 2015 di Tazzyman. [134]

Lo studio, condotto nel Regno Unito, è stato progettato come uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, della durata di 12 settimane. Sono stati inclusi pazienti con una diagnosi precedente di IBS, escludendo però chi aveva usato antibiotici nel mese precedente al reclutamento, quelli che stavano prendendo antidepressivi o anti psicotici o che già facevano uso di vitamine o probiotici, pazienti diabetici, quelli che avevano avuto operazioni gastrointestinali e le donne in gravidanza. [134]

Sono stati reclutati 51 partecipanti, suddivisi in due categorie in base ai livelli di vitamina D posseduti: "Vitamin D deficient" (valori inferiori a 20 ng/ml) e "Vitamin D replete" (valori superiori a 20 ng/ml); in seguito sono stati assegnati a tre diversi gruppi di trattamento.

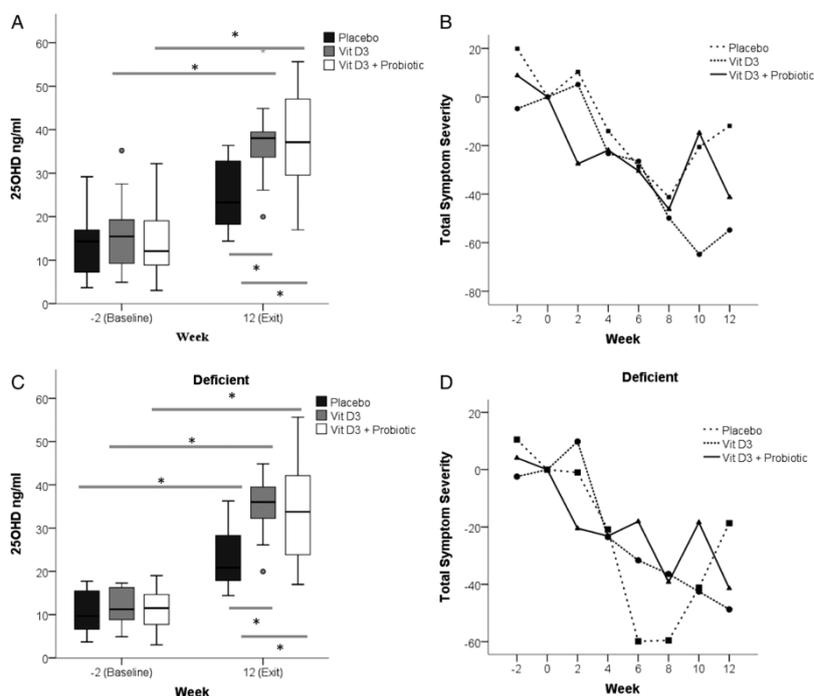
Il primo raggruppamento (composto da 17 pazienti) ha ricevuto un doppio placebo, il secondo gruppo (composto da 16 pazienti) ha ricevuto una dose quotidiana di 3.000 UI di vitamina D più un placebo probiotico, mentre il terzo gruppo (composto da 18 pazienti) ha ricevuto la stessa dose di vitamina D e $2,5 \times 10^{10}$ CFU di integratore probiotico al giorno.

Dopo 12 settimane di trattamento, i risultati hanno mostrato un miglioramento significativo nei livelli di vitamina D. Nel gruppo che ha ricevuto solo vitamina D, la percentuale di pazienti "Vitamin D replete" è aumentata dal 25% all'87,5%. Nel gruppo che ha ricevuto sia vitamina D che probiotici, la percentuale è aumentata dal 22,2% al 92,3%. Anche nel gruppo trattato con placebo, si è osservato un aumento nella percentuale di pazienti "Vitamin D replete", passando dal 18,5% al 60%. [134]

| Gruppo | % "Vitamin D replete" iniziale | % "Vitamin D replete" post-trattamento |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Doppio placebo | 18,50 | 60,00 |
| Vitamina D3 + Placebo probiotico | 22,20 | 92,30 |
| Vitamina D3 + Probiotico | 25,00 | 87,50 |

Tabella 6.1.7. Stato della vitamina D prima e dopo il trattamento

Figura 6.1.7 Risultati ottenuti nei 3 diversi gruppi dopo 12 settimane di trattamento [134]



Al termine non si è osservata un'interazione significativa né con l'intervento della sola vitamina D né con la combinazione di vitamina D e integratore probiotico.

Questo risultato può essere spiegato dall'influenza di diversi fattori, tra cui:

- la durata troppo breve della terapia, infatti sarebbe stato opportuno estendere il trattamento fino a 6 mesi per ottenere risultati più significativi;
- la dimensione del campione presa in considerazione era troppo piccola, dato che sarebbe stato necessario avere 74 partecipanti per ogni gruppo di trattamento;
- la variazione stagionale è significativa; infatti i pazienti sono stati reclutati tra gennaio e aprile, ma la maggior parte delle visite di follow-up si è svolta tra maggio e agosto, cioè i periodi in cui l'esposizione ai raggi solari aumenta e di conseguenza aumenta anche la sintesi di vitamina D rendendo così i risultati non attendibili.

Nonostante questi esiti deludenti, si è comunque verificato un aumento significativo dei livelli sierici di 25(OH)D nei pazienti trattati con vitamina D rispetto a quelli trattati con placebo. [134]

La principale limitazione dello studio riguarda la sua durata infatti la durata dell'intervento attivo nell'IBS dovrebbe essere più lunga per valutare l'effettiva efficacia, il trial è sottodimensionato e le variazioni stagionali hanno influenzato i livelli di vitamina D in tutti i pazienti a causa della maggiore esposizione alla luce solare. Per ottenere risultati più affidabili, sarebbe stato utile arrivare ad una durata superiore a 8 settimane (fino a 6 mesi), una dimensione campionaria più ampia (74 individui per ogni gruppo di somministrazione) e tenere conto dell'effetto delle variazioni stagionali sulla produzione di vitamina D.

6.1.8. Studio che valuta gli effetti dello yogurt co-fortificato con vitamina D e probiotici negli adulti obesi

Attualmente l'obesità rappresenta uno dei principali fattori di rischio per la mortalità, questo è dovuto non solo allo stress psicologico e alla depressione causati dalla denigrazione e dalla percezione negativa della propria immagine corporea, ma soprattutto alla predisposizione allo sviluppo di disturbi cronici potenzialmente letali come apnea notturna, diabete di tipo 2, ipertensione e malattie cardiovascolari. [139]

È stato osservato che i soggetti obesi presentano frequentemente un deficit di vitamina D, che risulta inversamente proporzionale al peso corporeo, all'indice di massa corporea e alla massa grassa; tuttavia non è ancora chiarito se tale carenza sia una conseguenza dell'obesità o uno dei suoi fattori di rischio. [140]

L'ipotesi più accreditata per spiegare il deficit di vitamina D nei pazienti obesi è che questa vitamina venga distribuita in un volume di tessuto adiposo più ampio rispetto alle persone con un peso nella norma.

Tale carenza risulta particolarmente presente in un individuo obeso perché questo conduce una vita sedentaria, si espone poco alla luce del sole per paura del giudizio delle altre persone e spesso soffre di disbiosi del microbiota intestinale, di conseguenza una strategia per gestire l'obesità contempla anche la manipolazione del microbiota intestinale attraverso l'uso di integratori probiotici. [141]

Lo studio condotto da Hajjior e collaboratori nel 2021 aveva come scopo quello di dimostrare che la fortificazione dello yogurt con batteri probiotici (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*), da soli o in combinazione con la vitamina D, potesse essere efficace per ridurre la carenza di questa vitamina e la disbiosi associata all'obesità. [138]

Lo studio, randomizzato e in doppio cieco, era controllato con placebo (yogurt a basso contenuto di grassi) e ha coinvolto 140 uomini e donne obesi per una durata di 10 settimane durante il periodo invernale (da dicembre a febbraio).

Sono state escluse le donne in menopausa, gravidanza ed in allattamento; mentre i criteri di inclusione prevedevano un BMI (indice di massa corporea) > 30, l'assenza di terapie antibiotiche e l'assunzione di probiotici o vitamina D nel mese precedente alla terapia, assenza di malattie metaboliche (come diabete, cancro o patologie renali) e di anemia.

Tutti i 140 partecipanti hanno seguito una dieta a basso contenuto calorico (con un deficit di circa 500-1.000 kcal rispetto al metabolismo basale) e hanno svolto 45-60 minuti di attività fisica moderata tre volte alla settimana; per quanto riguarda la terapia invece i partecipanti sono stati suddivisi in quattro gruppi: [138]

- il primo gruppo ha assunto quotidianamente 100 g di yogurt regolare a basso contenuto di grassi;
- il secondo gruppo consumo giornaliero di 100 g di yogurt probiotico (contenente *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*);
- il terzo gruppo ha assunto tutti i giorni 100 g di yogurt fortificato con 1.000 UI di vitamina D;
- il quarto gruppo ha preso quotidianamente 100 g di yogurt probiotico fortificato con vitamina D.

Dei 140 soggetti, solo 118 hanno completato l'intervento; le ragioni delle defezioni sono da ricercare nel fatto che 2 partecipanti hanno interrotto per gravidanza o intervento chirurgico, 2 non hanno seguito la dieta, 7 non hanno consumato regolarmente lo yogurt, 10 hanno iniziato una terapia antibiotica e 1 ha deciso di non proseguire lo studio. [138]

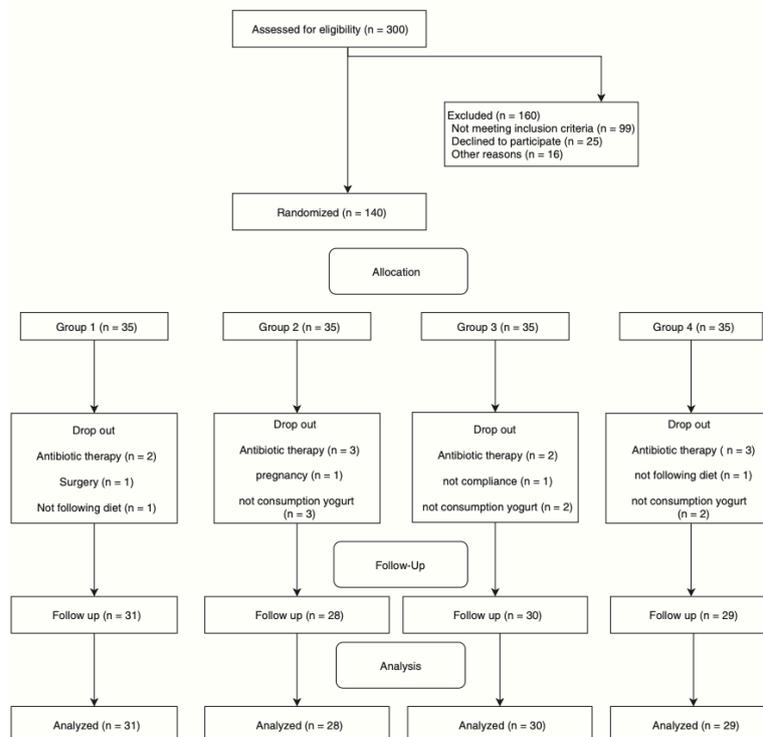


Figura 6.1.8. Diagramma del follow-up usato per questo studio [138]

I risultati al termine dello studio sono stati i seguenti:

- in tutti i gruppi tutti i fattori antropometrici, ad eccezione dell'acqua corporea totale (TBW), sono diminuiti in modo significativo questo quindi suggerisce che il calo si da attribuire all'effetto della dieta ipocalorica;
- i livelli di trigliceridi sono diminuiti notevolmente nei gruppi di intervento (gruppi 2, 3 e 4), anche se non sono state rilevate differenze significative tra di essi;
- solo il gruppo 2, che ha assunto solo il probiotico, ha mostrato una riduzione interessante dei livelli di LDL, HDL e colesterolo totale;
- la concentrazione di vitamina D è aumentata nei gruppi 1, 3 e 4, mentre nel gruppo 2 non ci sono state variazioni. [138]

Tabella 6.1.8. Fattori antropometrici, profilo lipidico e livello della vitamina D dei partecipanti allo studio prima e dopo il trattamento [138]

| Variable/Yogurt | Group 1 (n = 31) | | Group 2 (n = 28) | | Group 3 (n = 30) | | Group 4 (n = 30) | | P-V* | P-V** |
|-----------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|-------|-------|
| | Before | After | Before | After | Before | After | Before | After | | |
| BF | 36.57 ± 6.04 | 35.19 ± 7.73 ^a | 38.52 ± 6.04 | 37.23 ± 6.91 ^a | 35.05 ± 6.09 | 34.39 ± 6.90 ^a | 34.08 ± 5.53 | 32.85 ± 5.39 ^a | 0.052 | 0.116 |
| PBF | 41 (38.50-42.80) | 40 (37.47-42.22) ^b | 40.25 (36.37-42.70) | 40.15 (36.07-42.42) ^b | 40.60 (37.40-42.80) | 39.40 (36.97-41.52) ^b | 38.65 (33.70-42.72) | 37.90 (32.15-41.72) ^b | 0.329 | 0.472 |
| TBW | 39.24 ± 5.01 | 39.13 ± 4.93 | 42.03 ± 8.28 | 41.64 ± 8.19 | 38.55 ± 7.40 | 38.98 ± 6.87 | 40.12 ± 6.92 | 39.77 ± 7.02 | 0.390 | 0.451 |
| WHR | 0.93 (0.91-0.97) | 0.92 (0.90-0.96) | 0.95 (0.90-0.98) | 0.94 (0.89-0.97) | 0.94 (0.90-1) | 0.93 (0.89-1) | 0.94 (0.90-0.98) | 0.92 (0.90-0.98) | 0.832 | 0.744 |
| BMI | 34.60 (31.90-38) | 33.65 (30.72-37.37) ^a | 36.30 (33.50-39.50) | 35.70 (32.20-38.22) ^a | 34.90(31.95-35.95) | 33.80 (31.32-35.75) ^a | 33.80 (31.35-35.05) | 33.25 (30.80-34.50) ^a | 0.027 | 0.059 |
| LBM | 54.10 (49.20-60) | 54.25 (49.37-58.52) | 54.55 (50.80-65) | 55 (49.70-63.85) ^b | 49.50 (47.25-60.55) | 50.20 (47.15-60.40) | 55 (49.50-61.75) | 54.70 (48-61.62) | 0.620 | 0.440 |
| Weight | 90.20 (83.7-97.50) | 90.20 (80.90-97.50) ^a | 93.60 (87.72-106.80) | 91.15 (83.-107.85) ^a | 87.30 (79.57-97.75) | 86.10 (78.57-94.17) ^a | 89.70 (84.05-95.52) | 88.05 (81.15-95.15) ^a | 0.123 | 0.377 |
| WC | 106.75 (102.62-112.25) | 99.50 (95-106.5) ^a | 109.50 (104.62-115.37) | 101 (97-110.5) ^a | 103.25 (98.25-111.25) | 97.50 (88.37-110) ^a | 103.75 (100.37-107.75) | 98.50 (93-103) ^a | 0.010 | 0.081 |
| HC | 112.50 (107.87-122.75) | 110.50 (105.5-119) ^a | 117.25 (111.37-125.87) | 113 (107-120) ^a | 115(106.5-118.62) | 109.75 (105.87-115) ^a | 111.75 (108.25-116.37) | 109 (106.-115.50) ^a | 0.221 | 0.671 |

| Variable/Yogurt | Group 1 (n = 31) | | Group 2 (n = 28) | | Group 3 (n = 30) | | Group 4 (n = 30) | | P-V* | P-V** |
|------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|-------|-------|
| | Before | After | Before | After | Before | After | Before | After | | |
| TG (mmol/l) | 193.41 ± 70.82 | 174.75 ± 61.62 | 226.53 ± 94.07 | 153.47 ± 46.81 | 173.20 ± 76.26 | 143.31 ± 49.81 | 223.71 ± 65.37 | 181.62 ± 54.81 | 0.126 | 0.210 |
| HDL(mmol/l) | 233 ± 45.03 | 227.08 ± 44.62 | 254.47 ± 59.20 | 211.87 45.21 | 240.40 ± 57.17 | 22.54 ± 45.18 | 232.07 ± 61.69 | 212.62 ± 48.96 | 0.656 | 0.438 |
| LDL(mmol/l) | 133.76 ± 33.63 | 128.04 ± 31.45 | 141.93 ± 47.07 | 123.20 ± 42.44 | 137.93 ± 48.05 | 129.46 ± 40.91 | 126.62 ± 51.47 | 108.08 ± 34.60 | 0.827 | 0.400 |
| TC (mmol/l) | 63.18 ± 11.05 | 63.71 ± 11.94 | 63.27 ± 10.87 | 57.53 ± 6.72 | 67.53 ± 12.99 | 65.08 ± 11.62 | 62.86 ± 14.94 | 61.92 ± 13.65 | 0.687 | 0.289 |
| Vitamin D (ug/l) | 32.96 ± 11.92 | 37.26 ± 14.12 | 34.78 ± 15.64 | 36.67 ± 15.79 | 28.46 ± 14.99 | 38.56 ± 15.44 | 30.44 ± 13.01 | 36.01 ± 11.05 | 0.415 | 0.865 |

Da questo studio si nota che lo yogurt co-fortificato con probiotici e vitamina D non mostra effetti significativamente superiori sulle concentrazioni sieriche di 25(OH)D rispetto allo yogurt fortificato esclusivamente con vitamina D; quindi non si sono generati effetti positivi dal consumo di probiotici sull'assorbimento della vitamina D.

CONCLUSIONI

L'integrazione combinata di vitamina D e probiotici sembra possa rappresentare una promettente area di ricerca con potenziali benefici per varie condizioni di salute, poiché diversi lavori suggeriscono che le singole componenti giocano ruolo sulla salute fisiologica e psicologica del corpo umano. Inoltre diversi studi dimostrano come la vitamina D attraverso i suoi recettori influenza la composizione del microbiota e la sua funzionalità e viceversa.

Questo ha fatto presupporre che la co-somministrazione potrebbe rappresentare una nuova intuizione nella gestione di alcune patologie croniche; andando a migliorare la salute mentale, i parametri metabolici, la sensibilità insulinica ed i livelli sierici di vitamina D, la riduzione delle dislipidemie, dell'infiammazione e l'aumento della capacità antiossidante.

I risultati delle ricerche esaminati in questa tesi suggeriscono che la co-assunzione svolga un effetto superiore rispetto alla somministrazione del placebo ed anche della sola assunzione di vitamina D o dei soli probiotici in modo disgiunto.

La problematica principale è che gli studi riguardanti la co-integrazione di vitamina D e probiotici sono ancora troppo esigui per trarre conclusioni, infatti tali risultati non possono essere ancora considerati solidi/certi in quanto mancano ancora studi che prendano in considerazione altri fattori combinati come la stagionalità e le variazioni nella sintesi endogena di vitamina D dovute all'esposizione al sole e dalla dieta.

Quindi c'è la necessità di svolgere ulteriori ricerche che abbiano una qualità più alta, una maggiore varietà a livello della popolazione, un maggior numero di aree sanitarie esaminate e un numero molto più grande di soggetti sottoposti agli studi; inoltre un aspetto fondamentale da considerare è la standardizzazione delle dosi di vitamina D e probiotici utilizzate nella co-integrazione, questo perché diverse formulazioni e dosaggi possono avere effetti anche totalmente differenti.

È fondamentale anche comprendere più accuratamente i meccanismi attraverso cui i probiotici e la vitamina D interagiscono nel corpo umano, questo attraverso studi preclinici e clinici che si focalizzino su come questi interventi influenzino il microbiota intestinale, l'infiammazione e la funzione immunitaria.

Un altro aspetto che potrebbe giocare un ruolo chiave è la personalizzazione del trattamento, questo perché l'uso di approcci personalizzati, basati su analisi

dettagliate del microbioma e dei livelli sierici della vitamina D, potrebbero rendere ottimali i risultati terapeutici per ogni individuo.

Ci si auspica che la ricerca nei prossimi anni possa colmare le attuali lacune fornendo evidenze solide e ricche per l'integrazione di questa combinazione terapeutica nella pratica clinica dato l'alto interesse delle patologie coinvolte e delle ripercussioni sintomatiche verso cui è mirata questa terapia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Chu MP, Alagiakrishnan K, Sadowski C. The cure of ageing: vitamin D--magic or myth? *Postgrad Med J*. 2010;86(1020):608-16. doi: 10.1136/pgmj.2010.101121. PMID: 20971712.
- [2] Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):296-307. doi: 10.1002/jcb.10338. PMID: 12520530.
- [3] Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr*. 2005;135(2):317-22. doi: 10.1093/jn/135.2.317. PMID: 15671234.
- [4] Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81. doi: 10.1056/NEJMra070553. PMID: 17634462.
- [5] Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):26-34. doi: 10.1210/jc.2008-1454. Epub 2008 Oct 14. PMID: 18854395; PMCID: PMC2630868.
- [6] Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014;21(3):319-29. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.12.016. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24529992; PMCID: PMC3968073.
- [7] Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol*. 2003;17(5):777-91. doi: 10.1210/me.2002-0363. Epub 2003 Mar 13. PMID: 12637589.
- [8] Timpini A, Pini L, Tantucci C, Cossi S, Grassi V. Vitamin D and health status in elderly. *Intern Emerg Med*. 2011;6(1):11-21. doi: 10.1007/s11739-010-0407-4. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20517656.
- [9] Vieth R. Vitamin D toxicity, policy, and science. *J Bone Miner Res*. 2007;22 Suppl 2:V64-8. doi: 10.1359/jbmr.07s221. PMID: 18290725.
- [10] Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(2):373-8. doi: 10.1210/jcem-67-2-373. PMID: 2839537.
- [11] Oudshoorn C, van der Cammen TJ, McMurdo ME, van Leeuwen JP, Colin EM. Ageing and vitamin D deficiency: effects on calcium homeostasis and considerations for vitamin D supplementation. *Br J Nutr*. 2009;101(11):1597-606. doi: 10.1017/S0007114509338842. Epub 2009 Apr 27. PMID: 19393111.
- [12] Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(3):690-3. doi: 10.1093/ajcn/72.3.690. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2003 May;77(5):1342. PMID: 10966885.

- [13] Cashman KD, Wallace JM, Horigan G, Hill TR, Barnes MS, Lucey AJ, Bonham MP, Taylor N, Duffy EM, Seamans K, Muldowney S, Fitzgerald AP, Flynn A, Strain JJ, Kiely M. Estimation of the dietary requirement for vitamin D in free-living adults ≥ 64 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(5):1366-74. doi: 10.3945/ajcn.2008.27334. Epub 2009 Mar 18. PMID: 19297462.
- [14] Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(3):353-73. doi: 10.4065/81.3.353. PMID: 16529140.
- [15] Passeri G, Pini G, Troiano L, Vescovini R, Sansoni P, Passeri M, Guerresi P, Delsignore R, Pedrazzoni M, Franceschi C. Low vitamin D status, high bone turnover, and bone fractures in centenarians. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5109-15. doi: 10.1210/jc.2003-030515. PMID: 14602735.
- [16] Lauretani F, Maggio M, Valenti G, Dall'Aglio E, Ceda GP. Vitamin D in older population: new roles for this 'classic actor'? *Aging Male*. 2010;13(4):215-32. doi: 10.3109/13685538.2010.487551. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20515259.
- [17] Nuti R, Giordano N, Martini G, Amendola A, Geraci S, Goutzamani J, Cipolli F, Natili N, Mugnaini F. Is polymyalgia rheumatica caused by infectious agents? *J Rheumatol*. 2005;32(1):200-1. PMID: 15630760.
- [18] Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, Lips P, Munns CF, Lazaretti-Castro M, Giustina A, Bilezikian J. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev*. 2019;40(4):1109-1151. doi: 10.1210/er.2018-00126. PMID: 30321335; PMCID: PMC6626501.
- [19] Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, Atkinson S, Ward L, Moher D, Hanley D, Fang M, Yazdi F, Garritty C, Sampson M, Barrowman N, Tsertsvadze A, Mamaladze V. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2007;(158):1-235. PMID: 18088161; PMCID: PMC4781354.
- [20] Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB, Bazemore MG, Zee RY, Wong JB. Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA*. 2004;291(16):1999-2006. doi: 10.1001/jama.291.16.1999. PMID: 15113819.
- [21] Bischoff-Ferrari HA, Borchers M, Gudat F, Dürmüller U, Stähelin HB, Dick W. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J Bone Miner Res*. 2004;19(2):265-9. doi: 10.1359/jbmr.2004.19.2.265. PMID: 14969396.
- [22] Wacker M, Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation. *Nutrients*. 2013;5(1):111-48. doi: 10.3390/nu5010111. PMID: 23306192; PMCID: PMC3571641.

- [23] Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, Wong JB, Egli A, Kiel DP, Henschkowski J. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2009;339:b3692. doi: 10.1136/bmj.b3692. PMID: 19797342; PMCID: PMC2755728.
- [24] Sanders KM, Stuart AL, Williamson EJ, Simpson JA, Kotowicz MA, Young D, Nicholson GC. Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;303(18):1815-22. doi: 10.1001/jama.2010.594. Erratum in: *JAMA*. 2010;303(23):2357. PMID: 20460620.
- [25] Dhese JK, Bearne LM, Moniz C, Hurley MV, Jackson SH, Swift CG, Allain TJ. Neuromuscular and psychomotor function in elderly subjects who fall and the relationship with vitamin D status. *J Bone Miner Res*. 2002;17(5):891-7. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.5.891. PMID: 12009020.
- [26] O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol*. 1997;272(4 Pt 2):H1751-8. doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.4.H1751. PMID: 9139959.
- [27] Wipfler P, Pilz G, Golaszewski S, Luthringshausen G, Berr F, Kemmerling R, Neureiter D, Ladurner G, Kraus J. Invasive aspergillosis presenting with a painless complete ophthalmoplegia. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112(1):85-7. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.10.012. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19910107.
- [28] de la Guía-Galipienso F, Martínez-Ferran M, Vallecillo N, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H. Vitamin D and cardiovascular health. *Clin Nutr*. 2021;40(5):2946-2957. doi: 10.1016/j.clnu.2020.12.025. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33397599; PMCID: PMC7770490.
- [29] Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2008;168(11):1174-80. doi: 10.1001/archinte.168.11.1174. PMID: 18541825; PMCID: PMC3719391.
- [30] Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Dekker JM, März W. Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1103-13. doi: 10.1002/mnfr.200900474. PMID: 20352623.
- [31] Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med*. 2008;25(3):320-5. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02360.x. Epub 2008 Feb 13. PMID: 18279409.
- [32] Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110(2):229-38. doi: 10.1172/JCI15219. PMID: 12122115; PMCID: PMC151055.

- [33] Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S, Matsumoto T. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35798-802. doi: 10.1074/jbc.M404865200. Epub 2004 Jun 17. PMID: 15205460.
- [34] Pilz S, Dobnig H, Fischer JE, Wellnitz B, Seelhorst U, Boehm BO, März W. Low vitamin d levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke*. 2008;39(9):2611-3. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.513655. Epub 2008 Jul 17. PMID: 18635847.
- [35] Matías-Guío J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia (Engl Ed)*. 2018;33(3):177-186. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2016.05.001. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27321170.
- [36] Athanassiou L, Kostoglou-Athanassiou I, Koutsilieris M, Shoenfeld Y. Vitamin D and Autoimmune Rheumatic Diseases. *Biomolecules*. 2023;13(4):709. doi: 10.3390/biom13040709. PMID: 37189455; PMCID: PMC10135889.
- [37] Battistini C, Ballan R, Herkenhoff ME, Saad SMI, Sun J. Vitamin D Modulates Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):362. doi: 10.3390/ijms22010362. PMID: 33396382; PMCID: PMC7795229.
- [38] Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science*. 1980;209(4458):823-5. doi: 10.1126/science.6250216. PMID: 6250216.
- [39] Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care*. 2001;24(8):1496. doi: 10.2337/diacare.24.8.1496. PMID: 11473093.
- [40] Pietschmann P, Schernthaner G, Woloszczuk W. Serum osteocalcin levels in diabetes mellitus: analysis of the type of diabetes and microvascular complications. *Diabetologia*. 1988;31(12):892-5. doi: 10.1007/BF00265373. PMID: 3266486.
- [41] Boucher BJ. Is vitamin D status relevant to metabolic syndrome? *Dermatoendocrinol*. 2012;4(2):212-24. doi: 10.4161/derm.20012. PMID: 22928079; PMCID: PMC3427202.
- [42] Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2169-80. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.059. PMID: 17498510.
- [43] Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(12):22529-42. PMID: 26885239; PMCID: PMC4730025.

- [44] Devaraj S, Yun JM, Duncan-Staley CR, Jialal I. Low vitamin D levels correlate with the proinflammatory state in type 1 diabetic subjects with and without microvascular complications. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(3):429-33. doi: 10.1309/AJCPJGZQX42BIAXL. PMID: 21350098.
- [45] Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(7):451-9. doi: 10.1093/jnci/djj101. PMID: 16595781.
- [46] Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet*. 1989;2(8673):1176-8. doi: 10.1016/s0140-6736(89)91789-3. PMID: 2572900.
- [47] Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, Newmark HL, Giovannucci E, Wei M, Holick MF. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am J Prev Med*. 2007;32(3):210-6. doi: 10.1016/j.amepre.2006.11.004. PMID: 17296473.
- [48] Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(6):1586-91. doi: 10.1093/ajcn/85.6.1586. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2008;87(3):794. PMID: 17556697.
- [49] Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, Wactawski-Wende J, Rohan T, Rossouw J, Lane D, O'Sullivan MJ, Yasmeeen S, Hiatt RA, Shikany JM, Vitolins M, Khandekar J, Hubbell FA; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(22):1581-91. doi: 10.1093/jnci/djn360. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19001601; PMCID: PMC2673920.
- [50] Jorde R, Waterloo K, Storhaug H, Nyrnes A, Sundsfjord J, Jenssen TG. Neuropsychological function and symptoms in subjects with subclinical hypothyroidism and the effect of thyroxine treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):145-53. doi: 10.1210/jc.2005-1775. Epub 2005 Nov 1. PMID: 16263815.
- [51] Jorde R, Sneve M, Figenschau Y, Svartberg J, Waterloo K. Effects of vitamin D supplementation on symptoms of depression in overweight and obese subjects: randomized double blind trial. *J Intern Med*. 2008;264(6):599-609. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02008.x. Epub 2008 Sep 10. PMID: 18793245.
- [52] Sumaya IC, Rienzi BM, Deegan JF 2nd, Moss DE. Bright light treatment decreases depression in institutionalized older adults: a placebo-controlled crossover study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(6):M356-60. doi: 10.1093/gerona/56.6.m356. PMID: 11382795.
- [53] Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):482-96. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20427238.

- [54] Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(5):441-50. doi: 10.1007/s00109-010-0590-9. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20119827; PMCID: PMC2861286.
- [55] Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2004;16(2):127-34. doi: 10.1016/j.smim.2003.12.008. PMID: 15036236.
- [56] Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;321(2):103-11. doi: 10.1016/j.mce.2010.02.013. Epub 2010 Feb 13. PMID: 20156523; PMCID: PMC2854233.
- [57] Balogh G, de Boland AR, Boland R, Barja P. Effect of 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) on the activation of natural killer cells: role of protein kinase C and extracellular calcium. *Exp Mol Pathol*. 1999;67(2):63-74. doi: 10.1006/exmp.1999.2264. PMID: 10527758.
- [58] Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):685-98. doi: 10.1038/nri2378. PMID: 19172691; PMCID: PMC2906676.
- [59] Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*. 2009;183(9):5458-67. doi: 10.4049/jimmunol.0803217. PMID: 19843932; PMCID: PMC2810518.
- [60] Penna G, Amuchastegui S, Laverny G, Adorini L. Vitamin D receptor agonists in the treatment of autoimmune diseases: selective targeting of myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Bone Miner Res*. 2007;22 Suppl 2:V69-73. doi: 10.1359/jbmr.07s217. PMID: 18290726.
- [61] Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30. doi: 10.1038/nature11550. PMID: 22972295; PMCID: PMC3577372.
- [62] Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1):14. doi: 10.3390/microorganisms7010014. PMID: 30634578; PMCID: PMC6351938.
- [63] Capurso L. Il microbiota intestinale [First part: the intestinal microbiota]. *Recenti Prog Med*. 2016;107(6):257-66. Italian. doi: 10.1701/2296.24680. PMID: 27362717.
- [64] Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(7):e177. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177. Epub 2007 Jun 26. PMID: 17594176; PMCID: PMC1896187.

- [65] Yasmin F, Tun HM, Konya TB, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Subbarao P, Sears MR; CHILD Study Investigators; Scott JA, Dinu I, Kozyrskyj AL. Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. *Front Pediatr*. 2017;5:200. doi: 10.3389/fped.2017.00200. PMID: 29018787; PMCID: PMC5622971.
- [66] Pérez Martínez G, Bäuerl C, Collado MC. Understanding gut microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics. *Benef Microbes*. 2014;5(3):235-46. doi: 10.3920/BM2013.0079. PMID: 24889891.
- [67] Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cussotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*. 2019;99(4):1877-2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018. PMID: 31460832.
- [68] Pignatti M., *DERMOBIOTICA, alimentazione-microbiotica-pelle*, Minerva Medica, Torino 2018.
- [69] D'Amelio P, Sassi F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif Tissue Int*. 2018;102(4):415-425. doi: 10.1007/s00223-017-0331-y. Epub 2017 Sep 30. PMID: 28965190.
- [70] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):341-52. doi: 10.1038/nri.2016.42. PMID: 27231050; PMCID: PMC5541232.
- [71] Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res*. 2017;4:14. doi: 10.1186/s40779-017-0122-9. PMID: 28465831; PMCID: PMC5408367.
- [72] Bures J, Cyrany J, Kohoutova D, Förstl M, Rejchrt S, Kvetina J, Vorisek V, Kopacova M. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol*. 2010;16(24):2978-90. doi: 10.3748/wjg.v16.i24.2978. PMID: 20572300; PMCID: PMC2890937.
- [73] Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2645. doi: 10.3390/ijms18122645. PMID: 29215589; PMCID: PMC5751248.
- [74] Dubinkina VB, Tyakht AV, Odintsova VY, Yarygin KS, Kovarsky BA, Pavlenko AV, Ischenko DS, Popenko AS, Alexeev DG, Taraskina AY, Nasyrova RF, Krupitsky EM, Shalikiani NV, Bakulin IG, Shcherbakov PL, Skorodumova LO, Larin AK, Kostyukova ES, Abdulkhakov RA, Abdulkhakov SR, Malanin SY, Ismagilova RK, Grigoryeva TV, Ilina EN, Govorun VM. Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease. *Microbiome*. 2017;5(1):141. doi: 10.1186/s40168-017-0359-2. PMID: 29041989; PMCID: PMC5645934.

- [75] Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(1):55-63. doi: 10.1038/nrmicro.2016.142. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27694885.
- [76] Schmidt B, Mulder IE, Musk CC, Aminov RI, Lewis M, Stokes CR, Bailey M, Prosser JI, Gill BP, Pluske JR, Kelly D. Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS One.* 2011;6(12):e28284. doi: 10.1371/journal.pone.0028284. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22164261; PMCID: PMC3229561.
- [77] Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, Fu J, Mujagic Z, Vork L, Tigchelaar EF, Jankipersadsing SA, Cenit MC, Harmsen HJ, Dijkstra G, Franke L, Xavier RJ, Jonkers D, Wijmenga C, Weersma RK, Zhernakova A. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut.* 2016;65(5):740-8. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310376. Epub 2015 Dec 9. PMID: 26657899; PMCID: PMC4853569.
- [78] Shamriz O, Mizrahi H, Werbner M, Shoenfeld Y, Avni O, Koren O. Microbiota at the crossroads of autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2016;15(9):859-69. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.012. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27392501.
- [79] Miyoshi J, Chang EB. The gut microbiota and inflammatory bowel diseases. *Transl Res.* 2017;179:38-48. doi: 10.1016/j.trsl.2016.06.002. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27371886; PMCID: PMC5156589.
- [80] Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(3-4):185-93. doi: 10.1078/1438-4221-00201. PMID: 12398209.
- [81] Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102. Epub 2005 Jul 20. PMID: 16033867; PMCID: PMC1176910.
- [82] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414. PMID: 17183312.
- [83] Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One.* 2012;7(10):e47713. doi: 10.1371/journal.pone.0047713. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23091640; PMCID: PMC3473013.
- [84] Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490(7418):55-60. doi: 10.1038/nature11450. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23023125.

- [85] Scher JU, Bretz WA, Abramson SB. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: modifiable risk factors? *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(4):424-9. doi: 10.1097/BOR.000000000000076. PMID: 24807405; PMCID: PMC4128331.
- [86] Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, Lipuma L, Attur M, Pillinger MH, Weissmann G, Littman DR, Pamer EG, Bretz WA, Abramson SB. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3083-94. doi: 10.1002/art.34539. PMID: 22576262; PMCID: PMC3428472.
- [87] Fry L, Baker BS, Powles AV, Fahlen A, Engstrand L. Is chronic plaque psoriasis triggered by microbiota in the skin? *Br J Dermatol*. 2013;169(1):47-52. doi: 10.1111/bjd.12322. PMID: 23521130.
- [88] Lewis DJ, Chan WH, Hinojosa T, Hsu S, Feldman SR. Mechanisms of microbial pathogenesis and the role of the skin microbiome in psoriasis: A review. *Clin Dermatol*. 2019;37(2):160-166. doi: 10.1016/j.clindermatol.2019.01.011. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30981296.
- [89] Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1620-33. doi: 10.1053/j.gastro.2004.03.024. PMID: 15168372.
- [90] Gagliardi A, Totino V, Cacciotti F, Iebba V, Neroni B, Bonfiglio G, Trancassini M, Passariello C, Pantanella F, Schippa S. Rebuilding the Gut Microbiota Ecosystem. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(8):1679. doi: 10.3390/ijerph15081679. PMID: 30087270; PMCID: PMC6121872.
- [91] Capurso L. I probiotici [Probiotics]. *Recenti Prog Med*. 2016;107(6):267-77. Italian. doi: 10.1701/2296.24682. PMID: 27362718.
- [92] Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):333-344. doi: 10.1016/j.cgh.2018.09.028. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30267869.
- [93] Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):605-616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3. Epub 2019 Jul 11. Erratum in: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug 9;: PMID: 31296969.
- [94] Wasilewski A, Zielińska M, Storr M, Fichna J. Beneficial Effects of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Psychobiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(7):1674-82. doi: 10.1097/MIB.0000000000000364. PMID: 25822014.
- [95] Shadnoush M, Shaker Hosseini R, Mehrabi Y, Delpisheh A, Alipoor E, Faghfoori Z, Mohammadpour N, Zaringhalam Moghadam J. Probiotic yogurt Affects Pro- and Anti-inflammatory Factors in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Iran J Pharm Res*. 2013;12(4):929-36. PMID: 24523774; PMCID: PMC3920683.

- [96] Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, Matteuzzi D, Campieri M. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;38(2):165-72. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00144-5. PMID: 13129651.
- [97] Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*. 2010;1(3):148-63. doi: 10.4161/gmic.1.3.11712. PMID: 20672012; PMCID: PMC2909492.
- [98] Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(2):437-43. doi: 10.1038/ajg.2008.118. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19174792.
- [99] Shen J, Zuo ZX, Mao AP. Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(1):21-35. doi: 10.1097/01.MIB.0000437495.30052.be. Erratum in: *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(12):2526-8. PMID: 24280877.
- [100] Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, Okano M, Kagoshima M, Tsuchida T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(6):636-43. doi: 10.1038/ejcn.2010.19. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20216555.
- [101] Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, Smirnova N, Bergé M, Sulpice T, Lahtinen S, Ouwehand A, Langella P, Rautonen N, Sansonetti PJ, Burcelin R. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med*. 2011;3(9):559-72. doi: 10.1002/emmm.201100159. Epub 2011 Aug 3. PMID: 21735552; PMCID: PMC3265717.
- [102] Sun J. Dietary vitamin D, vitamin D receptor, and microbiome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018;21(6):471-474. doi: 10.1097/MCO.0000000000000516. PMID: 30169457; PMCID: PMC6168421.
- [103] Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res*. 2018;1693(Pt B):128-133. doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.015. PMID: 29903615; PMCID: PMC6005194.
- [104] Ogbu D, Xia E, Sun J. Gut instincts: vitamin D/vitamin D receptor and microbiome in neurodevelopment disorders. *Open Biol*. 2020;10(7):200063. doi: 10.1098/rsob.200063. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32634371; PMCID: PMC7574554.
- [105] Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(4):1080S-6S. doi: 10.1093/ajcn/87.4.1080S. PMID: 18400738.

- [106] Zmijewski MA. Vitamin D and Human Health. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):145. doi: 10.3390/ijms20010145. PMID: 30609781; PMCID: PMC6337085.
- [107] Varankovich, Natallia V et al. "Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases." *Frontiers in microbiology vol. 6* 685.2015; doi:10.3389/fmicb.2015.00685
- [108] Shang M, Sun J. Vitamin D/VDR, Probiotics, and Gastrointestinal Diseases. *Curr Med Chem.* 2017;24(9):876-887. doi: 10.2174/0929867323666161202150008. PMID: 27915988; PMCID: PMC5457364.
- [109] Pagnini, Cristiano et al. "Probiotics and Vitamin D/Vitamin D Receptor Pathway Interaction: Potential Therapeutic Implications in Inflammatory Bowel Disease." *Frontiers in pharmacology vol. 12* 747856.2021; doi:10.3389/fphar.2021.747856.
- [110] Ghaderi A, Banafshe HR, Mirhosseini N, Moradi M, Karimi MA, Mehrzad F, Bahmani F, Asemi Z. Clinical and metabolic response to vitamin D plus probiotic in schizophrenia patients. *BMC Psychiatry.* 2019;19(1):77. doi: 10.1186/s12888-019-2059-x. PMID: 30791895; PMCID: PMC6383260.
- [111] McGrath J, Saari K, Hakko H, Jokelainen J, Jones P, Järvelin MR, Chant D, Isohanni M. Vitamin D supplementation during the first year of life and risk of schizophrenia: a Finnish birth cohort study. *Schizophr Res.* 2004;67(2-3):237-45. doi: 10.1016/j.schres.2003.08.005. PMID: 14984883.
- [112] Humble MB, Gustafsson S, Bejerot S. Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) among psychiatric out-patients in Sweden: relations with season, age, ethnic origin and psychiatric diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):467-70. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.013. Epub 2010 Mar 7. PMID: 20214992.
- [113] Dickerson FB, Stallings C, Origoni A, Katsafanas E, Savage CL, Schweinfurth LA, Goga J, Khushalani S, Yolken RH. Effect of probiotic supplementation on schizophrenia symptoms and association with gastrointestinal functioning: a randomized, placebo-controlled trial. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2014;16(1):PCC.13m01579. doi: 10.4088/PCC.13m01579. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24940526; PMCID: PMC4048142.
- [114] Mohammadi A, Sadighi G, Nazeri Astaneh A, Tajabadi-Ebrahimi M, Dejam T. Co-administration of probiotic and vitamin D significantly improves cognitive function in schizophrenic patients: A double-blinded randomized controlled trial. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2024;44(2):389-398. doi: 10.1002/npr2.12431. Epub 2024 Apr 10. PMID: 38598329; PMCID: PMC11144626.
- [115] Jafarnejad S, Djafarian K, Fazeli MR, Yekaninejad MS, Rostamian A, Keshavarz SA. Effects of a Multispecies Probiotic Supplement on Bone Health in Osteopenic Postmenopausal Women: A Randomized, Double-blind, Controlled Trial. *J Am Coll Nutr.* 2017;36(7):497-506. doi: 10.1080/07315724.2017.1318724. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28628374.

- [116] Raygan F, Ostadmohammadi V, Bahmani F, Asemi Z. The effects of vitamin D and probiotic co-supplementation on mental health parameters and metabolic status in type 2 diabetic patients with coronary heart disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;84(Pt A):50-55. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.02.007. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29432877.
- [117] Chehaibi K, Trabelsi I, Mahdouani K, Slimane MN. Correlation of Oxidative Stress Parameters and Inflammatory Markers in Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25(11):2585-2593. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.06.042. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27474112.
- [118] Farrokhian A, Raygan F, Bahmani F, Talari HR, Esfandiari R, Esmailzadeh A, Asemi Z. Long-Term Vitamin D Supplementation Affects Metabolic Status in Vitamin D-Deficient Type 2 Diabetic Patients with Coronary Artery Disease. *J Nutr*. 2017;147(3):384-389. doi: 10.3945/jn.116.242008. Epub 2017 Jan 25. Retraction in: *J Nutr*. 2021 May 11;151(5):1361. PMID: 28122931.
- [119] Foroughi M, Maghsoudi Z, Askari G. The effect of vitamin D supplementation on blood sugar and different indices of insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2016;21(1):100-4. doi: 10.4103/1735-9066.174759. PMID: 26985230; PMCID: PMC4776554.
- [120] Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Oral supplementation with probiotic *L. reuteri* NCIMB 30242 increases mean circulating 25-hydroxyvitamin D: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):2944-51. doi: 10.1210/jc.2012-4262. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23609838.
- [121] Jamilian M, Amirani E, Asemi Z. The effects of vitamin D and probiotic co-supplementation on glucose homeostasis, inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*. 2019;38(5):2098-2105. doi: 10.1016/j.clnu.2018.10.028. Epub 2018 Nov 10. PMID: 30459099.
- [122] Farrar D, Simmonds M, Bryant M, Sheldon TA, Tuffnell D, Golder S, Dunne F, Lawlor DA. Hyperglycaemia and risk of adverse perinatal outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016;354:i4694. doi: 10.1136/bmj.i4694. PMID: 27624087; PMCID: PMC5021824.
- [123] Lu M, Xu Y, Lv L, Zhang M. Association between vitamin D status and the risk of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(5):959-66. doi: 10.1007/s00404-016-4010-4. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26825733.
- [124] Li G, Lin L, Wang YL, Yang H. 1,25(OH)₂D₃ Protects Trophoblasts Against Insulin Resistance and Inflammation Via Suppressing mTOR Signaling. *Reprod Sci*. 2019;26(2):223-232. doi: 10.1177/1933719118766253. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29575997.

- [125] Schoster A, Guardabassi L, Staempfli HR, Abrahams M, Jalali M, Weese JS. The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. *Equine Vet J*. 2016;48(6):689-696. doi: 10.1111/evj.12524. Epub 2015 Nov 29. PMID: 26509834.
- [126] Ostadmohammadi V, Jamilian M, Bahmani F, Asemi Z. Vitamin D and probiotic co-supplementation affects mental health, hormonal, inflammatory and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res*. 2019;12(1):5. doi: 10.1186/s13048-019-0480-x. PMID: 30665436; PMCID: PMC6340184.
- [127] Walters KA, Gilchrist RB, Ledger WL, Teede HJ, Handelsman DJ, Campbell RE. New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(12):841-852. doi: 10.1016/j.tem.2018.08.005. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30195991.
- [128] Laganà AS, Vitale SG, Ban Frangež H, Vrtačnik-Bokal E, D'Anna R. Vitamin D in human reproduction: the more, the better? An evidence-based critical appraisal. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(18):4243-4251. PMID: 29028072.
- [129] Karamali M, Eghbalpour S, Rajabi S, Jamilian M, Bahmani F, Tajabadi-Ebrahimi M, Keneshlou F, Mirhashemi SM, Chamani M, Hashem Gelougerdi S, Asemi Z. Effects of Probiotic Supplementation on Hormonal Profiles, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arch Iran Med*. 2018;21(1):1-7. PMID: 29664663.
- [130] Savino F, Ceratto S, Poggi E, Cartosio ME, Cordero di Montezemolo L, Giannattasio A. Preventive effects of oral probiotic on infantile colic: a prospective, randomised, blinded, controlled trial using *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Benef Microbes*. 2015;6(3):245-51. doi: 10.3920/BM2014.0090. PMID: 25488262.
- [131] Savino F, Tarasco V. New treatments for infant colic. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(6):791-7. doi: 10.1097/MOP.0b013e32833fac24. PMID: 20859207.
- [132] Brand S, Furlano R, Sidler M, Schulz J, Holsboer-Trachsler E. Associations between infants' crying, sleep and cortisol secretion and mother's sleep and well-being. *Neuropsychobiology*. 2014;69(1):39-51. doi: 10.1159/000356968. Epub 2014 Jan 22. PMID: 24457194.
- [133] de Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos WM. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics*. 2013;131(2):e550-8. doi: 10.1542/peds.2012-1449. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23319531.
- [134] Tazzyman, Simon et al. "Vitamin D associates with improved quality of life in participants with irritable bowel syndrome: outcomes from a pilot trial." *BMJ open gastroenterology vol. 2,1* e000052.2015; doi:10.1136/bmjgast-2015-000052
- [135] Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 2006;130(5):1480-91. doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.061. Erratum in: *Gastroenterology*. 2006;131(2):688. PMID: 16678561.

- [136] Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut*. 2010;59(3):325-32. doi: 10.1136/gut.2008.167270. Epub 2008 Dec 17. PMID: 19091823.
- [137] Sprake EF, Grant VA, Corfe BM. Vitamin D3 as a novel treatment for irritable bowel syndrome: single case leads to critical analysis of patient-centred data. *BMJ Case Rep*. 2012;2012:bcr-2012-007223. doi: 10.1136/bcr-2012-007223. PMID: 23239770; PMCID: PMC4544096.
- [138] Hajipour, Shima et al. "The effect of yogurt co-fortified with probiotic and vitamin D on lipid profile, anthropometric indices and serum 25-hydroxi vitamin D in obese adult: A Double-Blind Randomized- Controlled Trial." *Food science & nutrition vol. 9,1* 303-312.2020;doi:10.1002/fsn3.1996
- [139] Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, Okano M, Kagoshima M, Tsuchida T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(6):636-43. doi: 10.1038/ejcn.2010.19. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20216555.
- [140] Walsh JS, Bowles S, Evans AL. Vitamin D in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017;24(6):389-394. doi: 10.1097/MED.0000000000000371. PMID: 28915134.
- [141] Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Tsigalou C, Dalamaga M. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Postbiotics, and Obesity: Current Evidence, Controversies, and Perspectives. *Curr Obes Rep*. 2020;9(3):179-192. doi: 10.1007/s13679-020-00379-w. PMID: 32472285.

SITOGRAFIA

[A] <https://farmaciagaudiana.it/vitaminad-colecalciferolo>

[B] <https://quimamme.corriere.it/neonati/salute-neonato/rachitismo-importanza-vitamina-d>

[C] <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.amazon.it%2FOSTEOMALACIA-Understanding-Diagnosis-Osteomalacia-Alternative-ebook%2Fdp%2FB0B1NB8VF7&psig=AOvVaw3Nb72jz8Airp-a2nDppE3K&ust=1713361203145000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjhxqFwoTCNC54YDuxoUDFQAAAAAdAAAAABAE>

[D] <https://medicoepaziente.it/2020/osteoporosi-tre-progetti-di-ricerca-sulla-fragilita-ossea/>

[E] <https://www.rheumalab.it/site/imaging-delle-sindromi-dolorose-della-mano-e-del-polso/>

[F] <https://www.creha.it/news-prodotti-ortopedici-e-ausili-per-bambini-disabili/malattia-sclerosi-multipla-patologia-dal-decorso-cronico>

[G] <https://www.sciencephoto.com/media/910371/view/subacute-lupus-erythematosus>

RINGRAZIAMENTI

Desidero dedicare questi ringraziamenti alle persone che mi hanno sostenuto e guidato lungo il percorso che mi ha portato a questo importante traguardo.

Innanzitutto, un sentito grazie ai miei genitori, il cui amore, sostegno e sacrificio hanno reso possibile tutto questo. Mi avete sempre incoraggiato a dare il meglio di me stesso ed a non arrendermi mai, anche nei momenti più difficili. Senza il vostro costante supporto e la vostra fiducia in me, oggi non sarei qui.

A te nonna Lella, il cui affetto e saggezza mi hanno sempre dato forza. Sei stata un faro d'ispirazione nella mia vita, le tue parole di incoraggiamento mi hanno spinto a superare ogni ostacolo. Grazie per aver creduto in me e per avermi trasmesso valori fondamentali.

Voglio inoltre ricordare con affetto i miei nonni Geo, Santi, Ilva che non sono più con noi; anche se non sono qui fisicamente, sento ancora la loro presenza e il loro amore. Il loro esempio di passione ed integrità continua a ispirarmi ogni giorno. Grazie per avermi trasmesso il valore del duro lavoro e per avermi sempre sostenuto, anche a distanza.

Un ringraziamento speciale va alla mia professoressa, Fallarini Silvia, per la sua guida preziosa e la sua dedizione. Grazie per avermi accompagnato con pazienza e competenza lungo il percorso di ricerca e per avermi fornito gli strumenti necessari per affrontare questo lavoro con serietà e passione. Le sue indicazioni sono state fondamentali per la realizzazione di questa tesi e per la mia crescita accademica e personale.

A tutti voi, il mio più profondo e sincero ringraziamento. Questa tesi è dedicata a voi.

Con gratitudine.

Brizzi Giorgio