

**ВИТАМИН Д И ВЪЗПАЛИТЕЛНИЯ ПРОЦЕС**

**Ж. Цокева<sup>1</sup>, Т. Ганчева<sup>2,3</sup>, Дж. Енсев<sup>4</sup>, Е. Христатијева<sup>3</sup>, М. Ганева<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Тракийски университет, Медицински факултет, Секция по Фармакология и клинична фармакология, 6000 Стара Загора, България,*

<sup>2</sup>*Секция дерматовенерология, Тракийски университет, Медицински факултет, 6000 Стара Загора, България,*

<sup>3</sup>*Клиника по Кожни и венерически болести, УМБАЛ „Проф-д-р Стоян Киркович“, АД, 6000 Стара Загора, България,*

<sup>4</sup>*Студент по медицина, Тракийски университет, Медицински факултет, 6000 Стара Загора, България*

*Автор за кореспонденция*

*д-р Живка Иванова Цокева, дм*

*Медицински факултет, Тракийски университет,*

*Ул. „Армейска“ 11*

*6000 Стара Загора, България*

*e-mail: [zhivka\\_tsokeva@trakia-uni.bg](mailto:zhivka_tsokeva@trakia-uni.bg)*

**Абстракт**

Налични са множество данни за влиянието на витамин Д върху имунния отговор и клетъчната пролиферация и диференциация. Възпалителният процес е реакция на организма срещу редица фактори, много често от микробен произход с остър или хроничен ход. Нискостепенно възпаление стои в основата на развитието на редица кардиоваскуларни, метаболитни, автоимунни и други заболявания. Ниските серумни нива на 25-хидроксид витамин Д (25(OH)D) – класически маркер за витамин Д статус, често са придружени от повишени нива на маркери на възпалението като CRP, СУЕ и инфламаторни цитокини. Противоречиви са данните за връзката между витамин Д и възпалението. Дискутира се дали възпалението играе първична роля и предизвиква понижаване на 25(OH)D, или подобреното на витамин Д статуса води до редуция на възпалителния процес. Витамин Д има модулиращо влияние върху врождения и придобит имунитет. Вероятни механизми, по които витамин Д въздейства върху възпалението са потискане на продукцията на провъзпалителните цитокини като IL-6, TNF-α и IL-17, модулиране на NF-κB сигнален път, ключов регулатор на възпалението, стимулиране на синтеза на кателицидин и други белтъци с антимикробно действие. Хипотезата за противовъзпалителния ефект на витамин Д и за потенциалната му роля в патогенезата на множество заболявания, свързани както с високостепенно, така и нискостепенно възпаление предизвиква значителен интерес. Въпреки големия брой проучвания, причинно-следствената връзка между витамин Д статуса и възпалението, както и препоръките за мониторинг на витамин Д статуса и нуждата от витамин Д суплементация остават неясни и продължават да бъдат обект на активно изследване.

**Ключови думи:** витамин Д, възпаление, инфламаторни маркери

**Въведение**

Витамин Д е мастноразтворим витамин, действащ като прохормон. От значение за човешкия организъм са 2 от основните форми на витамин Д: Д<sub>2</sub> (ергокалциферол), получаван от растителни източници и Д<sub>3</sub> (холекалциферол), набавян от животински източници и синтезиран в кожата под действието на UV-B. Много малко храни (главно мазна риба) са естествен източник на витамин Д и основна част от човешкия витамин Д се синтезира в кожата.

В човешкия организъм приетият с храната и синтезираният в кожата витамин Д се превръщат до 1,25-дихидроксивитамин Д (1,25(OH)<sub>2</sub>D) - активната форма на витамина, който взаимодейства със специфични витамин Д рецептори (VDR). Основните ефекти на витамин Д са геномни и се обуславят от взаимодействието му с нуклеарни VDR, изпълняващи ролята на транскрипционни фактори. По-малка част от ефектите на витамин Д са бързи и се дължат на взаимодействието му с мембранно-свързани VDR или други специфични рецептори и активиране на вторични сигнални пътища.

Ефектите на витамин Д върху калциево-фосфатната обмяна и костната минерализация са добре познати. Нарастват доказателствата за ролята на витамин Д в имунния отговор и клетъчната пролиферация и диференциация. Все по-голям интерес буди хипотезата за противовъзпалителния ефект на витамин Д и за потенциалната роля на витамина в патогенезата на някои хронични възпалителни заболявания (сърдечно-съдови, метаболитни, автоимунни заболявания) и дори рак.

Възпалението се определя като защитен механизъм срещу инфекция и увреждане на тъканите с участието на вродения имунен отговор за локализиране и елиминиране на вредните фактори и премахване на увредените тъканни компоненти. По продължителност възпалението може да бъде остро или хронично, а по интензитет – високо- или нискостепенно. При голям брой хронични заболявания се установяват възпалителни изменения при липса на инфекция или тъканно увреждане. През последните десетилетия стана ясно, че това нискостепенното възпаление може да бъде предизвикано от тъканен стрес и дисфункция („метавъзпаление“), от промени в оптималната вътрешна среда без установена инфекция или тъканно увреждане. Нискостепенното възпаление се свързва с множество заболявания като затлъстяване, диабет, предсърдно мъждене, обструктивна сънна апнея, хипертония, синдром на поликистозни яйчници, но също така с промените, свързани със стареенето, безсънието и ниска физическа активност. Докато класическото възпаление е свързано със защита и възстановяване на тъканите, нискостепенното възпаление е насочено към възстановяването на нормалната хомеостаза. Нискостепенното възпаление протича субклинично (не е придружено от 5-те класически признака на възпаление *rubor, tumor, calor, dolor* и *functio laesa*) и се характеризира с умерено повишение на някои лабораторни маркери на възпалението, основно от които е умереното повишаване на С реактивния протеин (CRP), дефинирано като концентрации между 3 и 10 mg/L (1). CRP е най-често използваният общ инфламаторен маркер, показващ значително повишение при остро, и умерено повишение при нискостепенно възпаление. Други широко използвани неспецифични инфламаторни маркери са скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) - показател за хроничен възпалителен процес, и повишени нива на левкоцити и фибриноген – маркери за остро възпаление. За оценка на възпалителните процеси се използват специфични маркери на възпалението, от които основно значение имат интерлевкин-6 (IL-6), показател за остро и хронично нискостепенно възпаление и високочувствителният С-реактивен протеин (hsCRP) - специфичен маркер за нискостепенно възпаление, използван и за оценка на сърдечно-съдов риск.

#### **МЕХАНИЗЪМ НА ПРЕДПОЛАГАЕМИЯ АНТИНФЛАМАТОРЕН ЕФЕКТ**

Експресията на VDR е установена в повечето клетки на имунната система: Т-лимфоцити, В-лимфоцити и антиген-представящи клетки (АПК) - моноцити, дендритритни клетки (ДК) и макрофаги (2). Някои имунни клетки, включително ДК, макрофаги, както и В- и Т-клетки експресират 1 $\alpha$ -хидроксилаза и могат да синтезират калцитриол (3,4). Чрез сложни трансдукционни механизми витамин Д може да модулира както вродения, така и придобития имунитет, въздействайки върху пролиферацията и диференциацията на имунните клетки и производство на цитокини.

Витамин Д играе важна имуномодулираща роля върху функцията на моноцитите и макрофагите - ключови компоненти на вродената имунна система, действащи като защитници от първа линия, извършвайки фагоцитоза, производство на цитокини и изпълняващи роля на АПК. Витамин Д стимулира диференциацията на моноцити в макрофаги и модулира цитокиновия профил, активирайки производството на антиинфламаторния IL-10 и потискайки експресията на гени, отговорни за образуването на проинфламаторните тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ) и на IL-6 - ключов медиатор при високостепенно възпаление (5). Имуномодулаторният ефект на витамин Д е свързан с влиянието му върху нуклеарен фактор капа-В (Nf- $\kappa$ B) и митоген-активираната протеинкиназа (6,7). Nf- $\kappa$ B е ключов транскрипционен фактор, участващ в синтеза на провъзпалителните цитокини IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . 1,25(OH) $_2$ D намалява активността на NF- $\kappa$ B като повишава експресията на неговия инхибитор I $\kappa$ B $\alpha$  (8,9). Т-лимфоцитите, главно Т-хелперите (Th), са основен таргет за действието на 1,25(OH) $_2$ D. Витамин Д потиска диференциацията и активността на Th $_1$  и Th $_{17}$  клетките, които са провъзпалителни подгрупи на Th. Това води до намалено производство на интерферон-гама (IFN- $\gamma$ ), IL-2 и IL-17 и на др. цитокини, участващи в автоимунни и възпалителни реакции. Доказано е, че 1,25(OH) $_2$ D потиска продукцията на проинфламаторния IL-17 чрез директна транскрипционна супресия на експресията на IL-17 гена (10,11). Витамин Д стимулира развитието на Th $_2$  (противовъзпалителни) и Treg (регулаторни Т клетки). Treg помагат за поддържане на имунната толерантност и предотвратяват автоимуните реакции чрез секретирание на IL-10 и трансформиращ растежен фактор бета (TGF- $\beta$ ). С балансирането на Th $_1$  и Th $_2$  имунния отговор се свързва благоприятния ефект на витамин Д при т. нар. Th $_1$ -зависими автоимунни заболявания като множествена склероза, ревматоиден артрит и други (12,13). Калцитриолът има директен ефект върху В-клетъчната хомеостаза като инхибира В-клетъчната пролиферация, потиска секрецията на имуноглобулини и улеснява апоптозата на имуноглобулин-продуциращите В-лимфоцити (14,15).

Витамин Д индуцира гени, кодиращи антимикробните пептиди кателицидин (LL-37) и  $\beta$ -дефензин, участващи в защитата срещу бактериални, вирусни и гъбични инфекции (16).

## **ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕНА ВРЪЗКА МЕЖДУ НИВОТО НА ВИТАМИН Д И ВЪЗПАЛЕНИЕТО**

Въпросът за каузалната връзка между плазмените нива на витамин Д и възпалението е дискутабилен. Оформят се две основни хипотези. Според първата хипотеза ниското серумно ниво на витамин Д предразполага към развитие на възпалителен отговор, а според втората хипотеза възпалението води до ниско серумно ниво на витамин Д чрез различни механизми.

### **Хипотеза 1**

Според тази хипотеза дефицитът на витамин Д улеснява развитието на възпалителния процес, така че корекцията му би довела до редукция на възпалението. Тази идея се корени в доказаните в експериментални *in vitro* и *in vivo* проучвания противовъзпалителни свойства на витамин Д (17). Тези свойства се отдават на въздействието на 1,25(OH) $_2$ D върху вродения и придобития имунитет с пренасочване от инфламаторния Th $_1$ /Th $_{17}$  отговор и намаляване на продукцията на проинфламаторните TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 към Th $_2$ /Treg профил с увеличена продукция на антиинфламаторни цитокини като IL-10 (15).

### **Хипотеза 2**

Бактериалната патогенеза постулира, че дефицитът на витамин Д е резултат от хроничен възпалителен процес в условията на персистираща инфекция. Някои микроби (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, Epstein-Barr virus, Human Immunodeficiency Virus) могат да потиснат имунната защита чрез регулиране надолу на VDR рецептора, което предотвратява експресията на ензими, нужни за поддържане на нормални нива на 1,25(OH) $_2$ D. Високите нива на 1,25(OH) $_2$ D са насочени към

възстановяване на регулацията на VDR рецептора за продукцията на антимикробни пептиди – процес при който 25(OH)D бързо се метаболизира и серумните му намаляват поради бързата му конверсия в 1,25(OH)2D. В същото време повишеният 1,25(OH)2D води до хронично системно възпаление чрез потискане на функцията на макрофагите и блокиране на пътя на Nf-κB. Предполага се, че основно значение има екстрареналната продукция на 1,25(OH)2D, която се влияе от цитокини, азотен оксид и други (18).

Възпалението би могло да доведе до ниски серумни нива на витамин Д по различни механизми. Системни инфекции и синтез на възпалителни цитокини като IL-6 и TNF-α могат да променят витамин Д хидроксилирането в черния дроб и бъбреците, ограничавайки синтеза на активния витамин Д. Предполага се, че възпалението води до повишена експресия на CYP24A1, който разгражда активния метаболит на витамин Д (18). Според някои автори свързаният с възпалението оксидативен стрес потиска ензимната активност и намалява чернодробния синтез на 25(OH)D (17).

Независимо кое е първичното – дефицитът на витамин Д или възпалителният процес, множество проучвания откриват асоциация между нивото на витамин Д и някои маркери на възпалението като CRP, IL-6, TNF-α и други (19,20). Анализът на данните от подобни проучвания се затруднява не само от факта, че те включват различни заболявания с клинично изявено възпаление (активна туберкулоза, сепсис), със субклинично възпаление (метаболичен синдром, хипертония), с остро или с хронично възпаление, но и от различията във възрастта на проследяваните контингенти и в първоначалните нива на витамин Д и изследваните маркери на възпалението.

### 1. Популационни проучвания

При изследване на връзката между серумния 25(OH)D и нивата на CRP при над 15 000 асимптомни възрастни е установена статистически значима обратна корелация между витамин Д и CRP – с повишаването на нивата на 25(OH)D, стойностите на CRP намаляват, особено при участници с първоначално ниски нива на витамин Д < 21 ng/ml (21). Анализирайки 39 рандомизирани клинични проучвания Cannell и съавт. също стигат до заключението, че витамин Д понижава умерено инфламаторните маркери, но само при състояния с високостепенно възпаление и първоначално завишени маркери на възпалението (17).

Налице са убедителни доказателства, че 25(OH)D е отрицателен реагент на острата фаза на възпалението, чийто серумни нива намаляват при наличие на възпалителни състояния (22-24). Други автори установяват, че суплементацията с витамин Д намалява плазмената концентрация на CRP, но няма ефект върху други инфламаторни маркери като IL-6 и TNF-α (25,26).

### 2. Популационни проучвания за изследване на каузалността

Менделовата рандомизация е научен метод, който използва генетични варианти, за да изследва причинно-следствените връзки между рискови фактори и заболявания. В сравнение с конвенционалните обсервационни проучвания този метод се влияе по-слабо от замъгляващи фактори и евентуална обратна причинно-следствена връзка. Този тип проучвания напоследък се прилагат и за анализ на факторите, повлияващи витамин Д статуса. При тях се използват единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), за които е установена връзка с нивата на 25(OH)D чрез изследвания за асоцииране в генома. Изследванията за асоцииране в генома (Genome Wide Association Studies – GWAS) идентифицират генетични варианти (генотипове), свързани със специфични фенотипове. Чрез проверка на генетичните маркери в целия геном при голям брой индивиди, при тези проучвания се идентифицират асоциации генотип-фенотип чрез статистически анализи на популационно ниво. Серумните нива на 25(OH)D имат полигенно унаследяване. Редица изследвания за асоцииране в генома, установяват връзка между нивото на 25(OH)D и определени генетични варианти в гените, кодиращи синтеза на холестерол (*DHCR7*),

витамин Д-свързващия протеин (GC), хидроксилирането - 25-хидроксилазата (CYP2R1), 24-хидроксилазата (CYP24A1) и други (27,28).

За периода 2017-2020 г. над 60 проучвания, използващи Менделовата рандомизация са изследвали каузалната връзка между генетично детерминираното ниско ниво на витамин Д и различни здравни отклонения, но само четири от тях са демонстрирали данни за повишен риск от развитие на мултиплена склероза при ниска концентрация на 25(OH)D (5).

Двупосочната връзка между дефицита на витамин Д и нивата на CRP като маркер за системно възпаление е обект на проучване, използващо линейна и нелинейна Менделова рандомизация върху популационна кохорта от над 290 000 участници (29). Според резултатите на това съвременно мащабно проучване генетично предсказаните нива на 25(OH)D показват L-образна асоциация с нивата на CRP - при участници с дефицит на витамин Д (<25 nmol/L), се установява високо CRP. Тази зависимост изчезва при нормални плазмени нива на витамин Д. Анализите не подкрепят причинно-следствена връзка в обратната посока - т.е. повишените нива на CRP не водят до по-ниски нива на витамин Д. Според авторите дефицитът на витамин Д може да бъде фактор за повишени нива на CRP, а корекцията му може да намали системното възпаление (29).

### **ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА**

Много въпроси съществуват относно мониторинга и интерпретацията на човешкия витамин Д статус. Въпреки експертните насоки много лекари назначават икономически неоправдано изследване на серумния 25(OH)D. Във връзка с растящите разходи за изследване на витамин Д глобалната инициатива „Choosing Wisely“, имаща за цел да насърчи отговорното използване на медицински ресурси предоставя ясни насоки относно мониторинга на витамин Д, с акцент върху персонализиран подход при оценка на нуждата от изследване на витамин Д. „Choosing Wisely“ не препоръчва рутинно изследване на нивата на 25(OH)D при здрави хора без рискови фактори. Оценката на витамин Д статуса е оправдана при определени рискови категории като пациенти с остеопороза, хронични бъбречни или чернодробни заболявания, малабсорбционни състояния (цъолиакция, възпалителни чревни заболявания и др.), продължително лечение с кортикостероиди или антиконвулсанти, затлъстяване или ограничено излагане на слънце. Според насоките повечето здрави възрастни не се нуждаят от рутинна суплементация при достатъчна слънчева експозиция и пълноценна диета (30).

### **Заклучение**

Значими експериментални и популационни проучвания установяват наличието на връзка между ниската серумна концентрация на витамин Д и повишени нива на редица инфламаторни маркери. Въпреки биологично правдоподобния механизъм, чрез който витамин Д модулира имунния отговор и потиска възпалителните процеси, наличните данни все още не дават еднозначен отговор на въпроса за причинно-следствената връзка между възпалението и витамин Д статуса. Изясняването на каузалната връзка между витамин Д и възпалението би било полезно за вземане на рационални решения, касаещи нуждата от витамин Д мониторинг и суплементация.

**Благодарности:** Публикацията е реализирана с помощта на НИП 13/24, МФ, ТрУ.

### **Литература**

1. Ustundag, Y., Huysal, K., Karadag Gecgel, S., Unal, D., „Relationship between C-reactive protein, systemic immune-inflammation index, and routine hemogram-related inflammatory markers in low-grade inflammation“. International Journal of Medical Biochemistry, 1(1): 24-28, 2018.

2. Cantorna, M., „Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system“. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3): 286-289, 2010.
3. Sîrbe, C., Rednic, S., Grama, A., Pop, T.L. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases“, *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(17) 9784 (2022), doi:10.3390/ijms23179784.
4. Fenercioglu A, K., „The Anti-Inflammatory Roles of Vitamin D for Improving Human Health“. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(12):13514-13525, 2024. doi: 10.3390/cimb46120807.
5. Bouillon, R., Manousaki, D., Rosen, C. et al., “The health effects of vitamin D supplementation: evidence from human studies“. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(2): 96–110, 2022.
6. Zhang, Y., Leung, D.Y.M., Richers, B., Liu, Y., “Vitamin D Inhibits Monocyte/macrophage Pro-inflammatory Cytokine Production by Targeting Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1“. *Journal of Immunology*, 188: 2127–2135, 2012.
7. Ding, C., Wilding, J.P., Bing, C. 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against macrophage-induced activation of NF-κB and MAPK signalling and chemokine release in human adipocytes. *PLoS ONE*. 2013;8:e61707. doi: 10.1371/journal.pone.0061707.
8. Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, S., et al., “Vitamin D decreases NFκB activity by increasing IκBα levels“. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(4):889-897, 2006.
9. Mazanova, A., Shymanskyi, I., Lisakovska, O., Labudzynski, D., et al., “The link between vitamin D status and NF-κB-associated renal dysfunction in experimental diabetes mellitus“. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*. 2022;1866(7):130136. doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130136.
10. Joshi, S., Pantalena, L., Liu, X., Sarah, L. et al., ”1,25-Dihydroxyvitamin D3 ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A“. *Molecular and Cellular Biology*, 31: 3653-3669, 2011.
11. Hewison, M., “An update on vitamin D and human immunity“. *Clinical Endocrinology*, 76: 315-325, 2012.
12. Boonstra, A., Barrat, F., Crain, C., Heath, V., et al.,”1α,25-dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4+T cells to enhance the development of Th2 cells“. *The Journal of Immunology*, 167:4974-4980, 2001.
13. Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T., Amrein, K., “Vitamin D and immune function“. *Nutrients*, 5(7):2502-2521, 2013. doi:10.3390/nu5072502.
14. Chen, S., Sims, G., Chen, X., Gu, Y., et al., “Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation“. *The Journal of Immunology*, 179(3):1634-1647, 2007. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1634.
15. Aranow, C., “Vitamin D and the immune system“. *Journal of Investigative Medicine*, 59(6): 881-886, 2011. doi:10.2310/JIM.0b013e31821b8755.
16. Shin, D.M., Jo E.K., “Antimicrobial peptides in innate immunity against mycobacteria“. *Immune Network*,11:245–252, 2011. doi: 10.4110/in.2011.11.5.245.)
17. Cannell, J., Grant, W.B., Holick, M.F., “Vitamin D and inflammation“. *Dermatoendocrinology*. 2015; 6(1): e983401. doi: 10.4161/19381980.2014.983401.
18. Mangin, M., Sinha, R., Fincher, K. “Inflammation and vitamin D: the infection connection“. *Inflammatory Research*, 63(10):803-819, 2014. doi: 10.1007/s00011-014-0755-z
19. Antonelli. M.J., Kushner, I., Epstein, M., “The constellation of vitamin D, the acute-phase response, and inflammation“. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 90(2):85-89, 2023. doi: 10.3949/ccjm.90a.22048

20. Funk, L., Trampisch, U.S., Pourhassan, M., Wirth, R., “Is There an Association Between Inflammation and Serum-Vitamin D? - Results of a Retrospective Analysis of Hospitalized Geriatric Patients”. *Clinical Interventions in Aging*,19:763-768, 2024. doi: 10.2147/CIA.S447678
21. Amer, M., Qayyum, R., “Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006)”. *American Journal of Cardiology*, 109(2): 226–230, 2012. doi:10.1016/j.amjcard.2011.08.032
22. Waldron, J.L., Ashby, H.L., Cornes, M.P., Bechervaise, J., et al., “Vitamin D: a negative acute phase reactant”. *Journal of Clinical Pathology*, 66(7):620–622, 2013. doi:10.1136/jclinpath-2012-201301
23. Ghashut, R. A., Talwar, D., Kinsella, J., Duncan, A., et al. The effect of the systemic inflammatory response on plasma vitamin 25(OH)D concentrations adjusted for albumin”. *PLoS One*. 2014;9(3):e92614. doi:10.1371/journal.pone.0092614.
24. Silva, M.C., Furlanetto, T.W., “Does serum 25-hydroxyvitamin D decrease during acute-phase response? A systematic review”. *Nutrition Research*, 35(2):91–96, 2015. doi:10.1016/j.nutres.2014.12.008.
25. Yu, Y., Tian, L., Xiao, Y., Huang, G., et al., “Effect of Vitamin D Supplementation on Some Inflammatory Biomarkers in Type 2 Diabetes Mellitus Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials”. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 73(1):62-73, 2018. doi: 10.1159/000490358.
26. Asbaghi, O., Sadeghian, M., Mozaffari-Khosravi, H., Maleki, V. The effect of vitamin d-calcium co-supplementation on inflammatory biomarkers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials”. *Cytokine*. 2020;129:155050. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155050.
27. Manousaki, D., Mitchell, R., Dudding, T., Haworth, S., et al., “Genome-wide Association Study for Vitamin D Levels Reveals 69 Independent Loci”. *The American Journal of Human Genetics*, 106(3):327-337, 2022. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.01.017
28. Revez, J., Lin, T., Qiao, Z., Xue, A., et al., “Genome-wide association study identifies 143 loci associated with 25 hydroxyvitamin D concentration”. *Nature Communications*. 2020;11:1647. doi.org/10.1038/s41467-020-15421-7.
29. Zhou, A., Hyppönen, E., “Vitamin D deficiency and C-reactive protein: a bidirectional Mendelian randomization study”. *International Journal of Epidemiology*,52(1): 260-271, 2023. doi: 10.1093/ije/dyac087.
30. ABIM Foundation. (n.d.). *Choosing Wisely: An initiative of the ABIM Foundation*. Retrieved July 4, 2025, from <https://www.choosingwisely.org>