

Received: 2004.12.20
Accepted: 2005.02.28
Published: 2005.04.06

Właściwości biologiczne kalcytriolu i jego nowych analogów – potencjalne zastosowania terapeutyczne

Biological activity of calcitriol and its new analogues – potential therapeutic applications

Marzena Pełczyńska¹, Iwona Jaroszewicz^{1,2}, Marta Świtalska¹, Adam Opolski^{1,3}

¹ Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Zakład Onkologii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

² Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

³ Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

Streszczenie

Kalcytriol odgrywa ważną rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej. To zapewniło mu stałe i niepodważalne miejsce w zwalczaniu krzywicy i innych chorób przebiegających z zaburzeniami homeostazy wapniowo-fosforanowej. Ostatnie dziesięciolecia przyniosły odkrycie roli kalcytriolu w procesach nadzorujących proliferację i różnicowanie komórek organizmu. Sugeruje to możliwość licznych zastosowań terapeutycznych, także w chorobach, w których upośledzona jest równowaga pomiędzy proliferacją, różnicowaniem i apoptozą komórek. Do takich chorób należy łuszczyca, choroby typu autoagresji immunologicznej czy też choroby nowotworowe. Od lat prowadzone są badania mające na celu wykorzystanie właściwości kalcytriolu w zwalczaniu tych chorób. Artykuł jest przeglądem wiedzy dotyczącej biologicznej aktywności witaminy D i jej możliwych terapeutycznych zastosowań.

Niestety, kliniczne stosowanie kalcytriolu jest znacznie ograniczone jego aktywnością kalcemiczną powodującą hiperkalcemię ustroju. Stało się to bodźcem do syntezy wielu nowych analogów. Szukano pochodnych o znacznie korzystniejszym profilu działania. W pracy przedstawiono potencjalny profil terapeutyczny nowych analogów kalcytriolu. Wskazano ich potencjałe wykorzystanie zarówno w leczeniu jednorodnym, jak i w połączeniu z innymi lekami. Obecnie pochodne kalcytriolu wykorzystuje się w leczeniu chorych na łuszczycę (maść z takalcytolem lub kalcypotriolem). Prowadzone są badania kliniczne mające na celu weryfikację możliwych zastosowań analogów witaminy D w leczeniu chorych na niektóre nowotwory.

Ponadto opisano rolę receptora VDR w biologicznej aktywności witaminy D i jej analogów. Wskazano główne poznane mechanizmy działania kalcytriolu.

Słowa kluczowe:

kalcytriol • nowe analogi witaminy D • VDR • leczenie przeciwnowotworowe

Summary

Calcitriol is effective not only in the regulation of calcium-phosphate homeostasis, but also in promoting the differentiation and inhibition of proliferation of various cells. Calcitriol seems to be a potent drug with various therapeutic applications, such as regulation of calcium-phosphate homeostasis and treatment of psoriasis, autoimmune diseases, and cancer. Since clinical use of calcitriol is largely limited, due to its undesirable side effect of hypercalcemia, numerous calcitriol analogues have been synthesized to obtain compounds with better therapeutic profiles. This paper summarizes the current state of knowledge concerning the cellular mechanisms of calcitriol's biological activity and their clinical implications. Such medical application includes tre-

atment (as a single-drug or in combination) of osteoporosis, renal osteodystrophy, psoriasis (calcipotriol or tacalcitol ointment), autoimmune diseases (including multiple sclerosis), and some cancers.

The efforts to obtain new vitamin D₃ analogues are also briefly reviewed.

The structures and roles of vitamin D receptors in the biological effects of calcitriol and its analogues are discussed.

Key words: calcitriol • new vitamin D analogues • VDR • antitumor treatment

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7275.pdf

Word count: 4650

Tables: 1

Figures: –

References: 104

Adres autora: doc. dr hab. Adam Opolski, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12; 53-114 Wrocław, e-mail: opolski@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **1 α ,25(OH)₂D₃–1,25-dihydroksycholekalcyferol** – kalcytriol; **VDR** – receptor witaminy D (vitamin D receptor); **mVDR** – błonowy receptor witaminy D (membrane vitamin D receptor); **nVDR** – jądrowy receptor witaminy D (nuclear vitamin D receptor); **VDBP** – białko wiążące witaminę D (vitamin D binding protein); **(ER+)** – estrogenozależne nowotwory; **(ER–)** – estrogeniezależne nowotwory; **TGF- β** – nowotworowy czynnik wzrostu β (tumor growth factor β); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α); **interleukiny** – IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12; **geny wpływające na proces apoptozy:** *p21^{WAF1/CIP1}*, *p53*; **SRC-1** – białko koaktywatorowe; **TFIIB** – czynnik ograniczający szybkość formowania się kompleksu przedinicyjacyjnego; **NcoR** – jądrowy receptor korepresora; **SMRT** – mediator receptora kwasu retinowego i receptora hormonu tyroidowego (silencing mediator for retinoid acid receptor and thyroid hormone receptor); **AF-2** – dystalny fragment domeny wiążącej ligand receptora nVDR (Trans)activation function-2); **IP₃** – 1,4,5-trifosforan inozytolu; **DAG** – diacylglicerol; **PUVA** – metoda leczenia łuszczyca polegająca na skojarzonym leczeniu psoralenami (pochodne witaminy A) z naświetlaniem promieniowaniem UVA; **kinazy wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego:** **PKC** – kinaza białkowa C; **Raf1** – kinaza kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK); **MAP – ERK-1 i ERK-2** – kinazy z rodziny MAPK.

1. WPROWADZENIE

Od początku lat osiemdziesiątych XX w. nastąpił wzrost zainteresowania grupą związków sekosteroidowych. Wśród nich znalazła się grupa witamin D, a w szczególności 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferol (kalcytriol), znany dotąd powszechnie jako czynnik przeciwkrzywiczy. Identyfikacji tej aktywnej hormonalnie postaci witaminy D₃ dokonał Holick już w 1971 roku. Pierwotnie wykazano, iż pełni ona podstawową rolę w metabolizmie kości i ich różnicowaniu oraz odgrywa istotną rolę w jelitowym wchłanianiu wapnia [48]. Stąd też podstawowym zastosowaniem kalcytriolu stało się leczenie i zapobieganie krzywicy u dzieci i osteomalacji u dorosłych. Natomiast powodem, dla którego ponownie zainteresowano się tym związkiem było m.in. wykrycie jego działania antyproliferacyjnego i indukującego różnicowanie komórek białaczkowych *in vitro* [48].

W toku późniejszych, licznych badań potwierdzono, iż 1 α ,25(OH)₂D₃ przejawia zdolność indukcji różnicowania komórek, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych, m.in. komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej, raka gruczołu piersiowego, raków głowy i szyi, raków gruczo-

łu krokowego czy raka jelita grubego [104]. Ponadto, jego działanie antyproliferacyjne przejawia się w skutecznym hamowaniu nadmiernego namnażania się komórek naskórka, w pewnych odmianach łuszczyca (*psoriasis vulgaris*) [48]. Działanie kalcytriolu na komórki zmienione chorobowo, w odróżnieniu od wielu innych związków cytostaticznych, ma charakter niedestrukcyjny – stymuluje ich przekształcanie się w kierunku komórek dojrzałych, w pełni zróżnicowanych [48].

Ze względu na potencjalne zastosowanie terapeutyczne, 1 α ,25(OH)₂D₃ stał się w ostatnich latach przedmiotem interdyscyplinarnych badań w dziedzinie biochemii, chemii medycznej oraz biologii molekularnej. Dzięki nowo poznanej własności biologicznej tego związku, wprowadzono go do terapii pacjentów cierpiących na schorzenia metaboliczne, takie jak osteoporoza, nerkopochodna osteodystrofia, czy łuszczyca [48,71,86,99].

Potencjalne zastosowanie aktywnej postaci witaminy D₃ w zwalczaniu takich chorób, jak nowotwory czy łuszczyca, gdzie korzystne działanie terapeutyczne można uzyskać przy zastosowaniu ponadfizjologicznego stężenia tego związku, wiąże się z występowaniem niekorzystnych stężeń

wapniowych (hiperkalcemii, hiperkalcurii, powstawaniem zwapnień w narządach mięszszowych) [48,79,99]. Z tego też powodu zaczęto syntetyzować analogi kalcytriolu, które przy zachowaniu właściwości antyproliferacyjnych, nie miałyby lub wykazywałyby znacznie obniżoną aktywność wapniową w stosunku do związku referencyjnego. Liczne badania prowadzone pod kątem przydatności nowych analogów witaminy D_3 w leczeniu chorych na niektóre typy nowotworów objęły m.in. kojarzenie tych związków ze znanymi cytostatykami, stosowanymi powszechnie w praktyce klinicznej [67,81,96].

2. KALCYTRIOL – AKTYWNA HORMONALNIE POSTAĆ WITAMINY D_3

2.1. Biosynteza i metabolizm witaminy D_3

Kalcytriol – $1\alpha,25(OH)_2D_3$ – jest biologicznie aktywną, hormonalną postacią witaminy D_3 , która biogenetycznie wywodzi się z cholesterolu. Metabolit cholesterolu, 7-dehydrocholesterol (prowitamina D_3) znajdujący się w skórze, pod działaniem promieni UV ulega skomplikowanym przemianom fotochemicznym i przekształca się w prewitaminę D_3 , która spontanicznie izomeryzuje do witaminy D_3 – kalcyolu (cholekalcyferolu). Kalcyol jest następnie przekształcany w kalcytriol – $1\alpha,25(OH)_2D_3$, aktywny hormon [48].

Proces aktywacji witaminy D_3 odbywa się dwustopniowo: w wątrobie, poprzez hydroksylację kalcyolu w pozycji C-25, co prowadzi do wytworzenia kalcydiolu (25-hydroksycholekalcyferolu; 25-OH- D_3) oraz w nerkach, gdzie kalcydiol ulega 1-hydroksylacji pod działaniem 1α -hydroksylazy kalcydiolowej [48], co ostatecznie prowadzi do otrzymania kalcytriolu – $1\alpha,25(OH)_2D_3$. Wędrówka witaminy D_3 odbywa się w organizmie dzięki wiążącemu ją białku transportowemu VDBP (vitamin D binding protein), należącemu do białek transportowych frakcji γ -globulin osocza [7].

Drugim źródłem dostarczającym witaminę D_3 do organizmu jest pożywienie, przy czym naturalne zasoby witaminy D_3 są dość ograniczone i w większości przypadków (z wyjątkiem tłuszczy wątrobowych ryb) raczej ubogie w tę witaminę.

2.2. „Klasyczne” działanie kalcytriolu

Główną funkcją biologiczną $1\alpha,25(OH)_2D_3$ w organizmie jest utrzymanie homeostazy wapniowo-fosforanowej. Odpowiednie stężenie jonów wapnia i jonów fosforanowych w płynie pozakomórkowym, a także w tkance kostnej jest niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji kości i zębów. Regulacja tych procesów polega głównie na intensyfikacji aktywnego wchłaniania wapnia w jelicie, uwalnianiu Ca^{2+} z kości oraz absorpcji Ca^{2+} w nerkach. Za podstawowe narządy docelowe działania kalcytriolu uważa się: jelito, kości i nerki [48].

Witamina D_3 powoduje specjalizację komórek tkanki kostnej, czyli zwiększone różnicowanie zwłaszcza tych komórek, które są odpowiedzialne za wzmożone odkładanie się wapnia w kościach. Ponadto, współdziałając z parathormonem wytwarzanym przez gruczoły przytarczyczne, zapewnia utrzymanie ściśle określonego i w miarę stałego stężenia jonów Ca^{2+} w osoczu krwi [7].

2.3 Inne funkcje witaminy D_3

W ciągu ostatnich kilku lat zaobserwowano, iż $1\alpha,25(OH)_2D_3$ wpływa nie tylko na „właściwe” dla niego narządy docelowe, ale także na tkanki niezwiązane z homeostazą wapniowo-fosforanową, tj. tkankę skórną, komórki krwi, gonad i gruczołu piersiowego oraz komórki Malpighiego skóry, poprzez m.in. regulację ich wzrostu czy różnicowania [7]. Działanie to przejawia $1\alpha,25(OH)_2D_3$ również w stosunku do komórek nieprawidłowych, takich jak np. nowotworowe, m.in. czerniaka, białaczki (ludzkiej i zwierzęcej), raka gruczołu piersiowego i krokowego [48].

Zakłada się, że antyproliferacyjne działanie kalcytriolu i jego analogów może być spowodowane przez różnorodne mechanizmy, spośród których można by wymienić zarówno wpływ na cykl komórkowy, doprowadzanie komórek do ostatecznego różnicowania, indukcja apoptozy, regulacja ekspresji rozmaitych czynników wzrostu i receptorów tych czynników [44,59,93].

2.3.1. Różnicowanie komórek pod wpływem kalcytriolu i jego analogów

Kalcytriol – aktywny hormon – wprowadza komórkę w stadium różnicowania końcowego, tzn. prowadzi do ustabilizowania dojrzałej, ostatecznie zróżnicowanej populacji komórek. Charakterystyczne dla tego stadium są m.in. wypełniona swoistymi białkami (np. keratyną w komórkach naskórka) cytoplazma, zwyrodnienie i zanik jąder komórkowych, czy zanik rybosomów. Zmiany te oznaczają obniżenie zdolności komórki do proliferacji, zatrzymanie cyklu komórkowego i obniżenie intensywności apoptozy [62]. Tak się dzieje z monocytami, które pod wpływem ekspozycji na witaminę D_3 podejmują funkcję czynną w obrębie systemu odpornościowego, jako komórki prezentujące antygeny, lub jako makrofagi. Monocyty osiadłe w obrębie układu kostnego przekształcają się w osteoklasty [7]. Proces przemian w ostatecznie zróżnicowaną populację komórek zaobserwowano dokładnie na przykładzie keratynocytów, których podatność na kalcytriol i jego pochodne jest dobrze znana. Pod wpływem różnicowania następuje zmniejszenie liczby nabłonkowych receptorów czynników wzrostowych, m.in. amfiregulinę na powierzchni komórek [59]. Jednocześnie z zahamowaniem proliferacji następuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_1/G_0 i zmniejszenie intensywności apoptozy. W komórkach eksponowanych na witaminę D_3 zaobserwowano również brak fosforylacji białek odpowiedzialnych za przeprowadzenie komórki z fazy G_1 do S cyklu komórkowego [45,59]. Jest to równoznaczne z zahamowaniem podziałów komórkowych.

Innym procesem prowadzącym do tego samego wyniku jest wzrost syntezy TGF- β_1 oraz obniżenie poziomu produktu genu *c-myc*, który odgrywa główną rolę w procesie proliferacji komórek. W komórkach poddanych działaniu analogów kalcytriolu zanotowano spadek aktywności dekarboksylazy ornitynowej. Jest to enzym niezbędny do syntezy DNA. Podobnie do zahamowania proliferacji prowadzi obniżenie wydzielania IL-6 i IL-8, które są znanymi mitogenami keratynocytów [7,20].

Dogodnym modelem do badań różnicowania komórek nowotworowych *in vitro*, pod wpływem analogów kal-

cytriolu, okazała się linia komórkowa ludzkiej białaczki promielocytarnej HL-60, w której proces ten przebiega tak, jak dojrzewanie monocytów w szpiku kostnym. Kilkudziesięciogodzinna ekspozycja tych komórek na analog witaminy D prowadziła do charakterystycznych dla dojrzających makrofagów zmian funkcjonalnych i fenotypowych w komórkach [72].

Wprawdzie poznano proces różnicowania komórek białaczkowych przez kalcytriol lub jego analogi, to ich działanie antyproliferacyjne, w stosunku do estrogenozależnych (ER+), jak i niezależnych (ER-) raków gruczołu piersiowego nie zostało dokładnie wyjaśnione [93].

Niektóre nowe analogi kalcytriolu wykazują większą aktywność biologiczną niż związek referencyjny. Potwierdzają to wyniki licznych badań prowadzonych m.in. na komórkach CaCo-2 (ludzki rak okrężnicy), gdzie wykazano większą aktywność nowo zsyntetyzowanego analogu ZK156718 w indukowaniu różnicowania, hamowaniu proliferacji oraz podwyższeniu ekspresji p21^{WAF1/CIP1} w porównaniu do działania kalcytriolu [33]. Podobne obserwacje poczyniono również stosując komórki HL-60, w których analog EB1089 wykazywał większą niż kalcytriol aktywność w indukowaniu różnicowania [36,89].

Aktywność przeciwnowotworową analogów kalcytriolu wykazano również w warunkach *in vivo*, m.in. w modelach doświadczalnych białaczek. Ekspozycja komórek białaczkowych na analog 1,25-dihydroxy-16-ene-23-ynevitamin D₃ prowadziła do wydłużenia czasu przeżycia myszy, a jednocześnie nie podwyższała niekorzystnie stężenia wapnia w surowicy [104].

Działanie analogów kalcytriolu spowalniające rozwój guza *in vivo* obserwowano również w innych modelach nowotworów, np. raka sutka – miejscowe lub doustne podanie leku 22-oxa-1,25-(OH)₂D₃ (OCT), nie powodowało wzrostu stężenia Ca²⁺ w surowicy, podczas gdy redukcja masy guza była statystycznie znacząca [1].

2.3.2 Wpływ kalcytriolu i jego analogów na apoptozę

Jak już wspomniano, rozwój nowotworu następuje m.in. wskutek przyspieszonej proliferacji w stosunku do intensywności apoptozy. Aby proces ten został spowolniony muszą zadziałać czynniki hamujące wzrost liczby komórek nowotworowych, np. poprzez indukcję apoptozy. Komórki uczestniczącą w apoptozie charakteryzują zmiany biochemiczne, obejmujące ekspresję charakterystycznych genów dla tego procesu (bax, bcl-2, TRPM-2/klastryna, katepsyna B), jak i morfologiczne (kondensacja cytoplazmy, fragmentacja DNA, czy pojawienie się ciałek apoptotycznych) [36].

Wyniki wielu prac sugerują, iż kalcytriol i jego analogi mogą odgrywać znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów i ich białkowych produktów związanych z procesem apoptozy [46, 90]. Mechanizm tego wpływu jest nadal sprawą kontrowersyjną. Wydaje się, że obniżenie proliferacji osiąga się przez wprowadzenia komórek w apoptozę. Część badaczy potwierdza tę tezę [26], jednak wydaje się, iż indukcja różnicowania komórek jednocześnie zmniejsza ich zdolność do apoptozy [17,59,72,73,84]. Możliwe

jest, że wpływ witaminy D₃ i jej pochodnych na intensywność apoptozy w komórkach jest zależny od jeszcze innych czynników. Takie zróżnicowanie działania uwidocznia się w komórkach raków piersi mających receptor estrogenowy (ER+) lub niemających (ER-). Kalcytriol powoduje zahamowanie proliferacji komórek obydwu typów nowotworów. Wiadomo o wpływie związku na receptory estrogenowe i obniżenie proliferacji poprzez mechanizm receptorowy. Sugerowało to, że analogi kalcytriolu będą hamowały proliferację raczej tylko komórek linii ER+. Zahamowanie proliferacji komórek linii ER- wskazuje, iż możliwy jest także inny mechanizm działania, być może poprzez indukcję apoptozy [26,36].

Mechanizm wprowadzania przez kalcytriol komórek w apoptozę nie został do końca wyjaśniony. Galbiati w swojej pracy wykazuje, iż wprowadzenie komórek w apoptozę wymaga sprawnie działającego genu p53 (negatywny regulator genów kontrolujących wzrost komórki) [31]. James i wsp. wykazali, że po kilkudziesięciogodzinnej ekspozycji komórek MCF-7 (linia ludzkiego raka piersi) na kalcytriol lub jego analog EB1089 następuje widoczne podwyższenie stężenia białka p53, przy jednoczesnym zredukowaniu poziomu białka Bcl-2 [44]. Ponadto, badania prowadzone *in vitro* wykazały w przypadku komórek LnCap (linia ludzkiego raka gruczołu krokowego), iż ten sam analog kalcytriolu indukuje apoptozę oraz nagromadzenie się komórek w fazie G₀-G₁ [6].

Badania poświęcone regulacji cyklu komórkowego wykazały, że EB1089 znacznie bardziej podwyższa poziom p21^{WAF1/CIP1} niż kalcytriol. To wskazuje, że EB1089 jest silniejszym od kalcytriolu inhibitorem przejścia z fazy G₁ do S w cyklu komórkowym. Także w regulacji ekspresji ważnych genów wzrostu komórkowego, np. protoonkogenów *c-fos* i *c-myc*, EB1089 wykazuje silniejsze działanie niż kalcytriol. Doświadczenia prowadzone na komórkach raka piersi wykazały większą aktywność analogu w indukowaniu ich apoptozy [36,89].

Wyjaśnienie mechanizmu biologicznej aktywności kalcytriolu jest dość trudne, ponieważ stopień zahamowania proliferacji, zmniejszenie apoptozy, zatrzymanie cyklu komórkowego zależą od różnorodnych czynników, m.in. od stopnia zróżnicowania komórek, obecności czynników wzrostowych, dawki hormonu, czy stężenia wapnia zewnątrzkomórkowego [59].

2.3.3. Kalcytriol i jego analogi jako inhibitory angiogenezy nowotworowej

Duże zainteresowanie wzbudzają doniesienia na temat potencjalnych właściwości antyangiogennych (hamujących proces unaczynienia guza nowotworowego) kalcytriolu i jego niektórych analogów [6]. Wykazano, m.in. że analog EB 1089 hamuje tworzenie się naczyń krwionośnych w guzie, co prowadzi do powstawania wysepek komórek, które niedostatecznie odżywiane tracą zdolność do wzrostu, bądź obumierają w procesie nekrozy. Spostrzeżono ponadto, iż pochodne kalcytriolu wpływają hamująco na proces inwazji komórek nowotworowych przez obniżanie aktywności enzymów proteolitycznych (proteaz serynowych i metaloproteaz) oraz poprzez indukowanie ich inhibitorów [1].

2.3.4 Wpływ pochodnych witaminy D na układ immunologiczny

W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano działanie witaminy D₃ na układ odpornościowy. W szczególności wskazano na jej udział w różnicowaniu i dojrzewaniu komórek dendrytycznych, monocytów i makrofagów. Wykazano, iż u zwierząt z niedoborem witaminy D₃ występuje większe ryzyko zachorowania na choroby infekcyjne, prawdopodobnie przez zmniejszenie aktywności fagocytarnej makrofagów [7].

Wykazano obecność receptora VDR w limfocytach T, szczególnie CD-8+ i jego zwiększoną ekspresję w limfocytach poddanych działaniu kalcytriolu. W badaniach limfocytów krwi obwodowej wykazano supresyjny wpływ kalcytriolu na wytwarzanie mediatorów stanu zapalnego, np. IL-2 [68], TNF- α , interferonu γ [48]. Obecność fizjologicznego stężenia kalcytriolu jest istotna dla prawidłowego przebiegu odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T. W badaniach *in vivo* wykazano, że zarówno jego niedobór [101], jak i nadmiar [21] upośledzają odpowiedź komórkową.

2.4. Receptory witaminy D₃ (VDR)

2.4.1. nVDR

Dokładny mechanizm aktywności biologicznej kalcytriolu nie jest do końca wyjaśniony. Wiadomo, że w jego funkcjach pośredniczy receptor jądrowy nVDR (nuclear vitamin D receptor), który należy do nadrodziny receptorów jądrowych zależnych od ligandów, tzn. działających jak aktywowane przez ligand białkowe czynniki transkrypcyjne [19]. Receptor nVDR ma budowę domenową. W postaci wolnej – niezwiązanej z ligandem, identyfikuje się go wyłącznie w jądrze komórkowym [19,48]. Za wiązanie z ligandem odpowiada zróżnicowana pod względem sekwencji aminokwasów domena E, zlokalizowana w końcu karboksylowym receptora. Pozwala to dystalnemu fragmentowi domeny wiążącej ligand (fragment AF-2) na interakcję z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, włączając białko koaktywatorowe, takie jak SRC-1. Białko to ma aktywność acetylazy histonowej. Acetylacja histonu powoduje przebudowę struktury DNA i uwolnienie histonu. To prowadzi do aktywacji promotora i rozpoczęcia procesu transkrypcji genów odpowiedzialnych za kodowanie określonych białek związanych z transportem wapnia i fosforu, tj. genów kodujących osteokalcynę (powoduje wbudowanie wapnia do kości), osteopontynę, 24-hydroksylazę (nadzoruje przemiany witaminy D) czy kalbindynę (CaBP; w ścianie jelita umożliwia wchłanianie wapnia) [48]. Ponadto regulacja wielu innych genów odbywa się przez wiązanie się nVDR do swoistej sekwencji DNA, określanej jako element odpowiedzi VDRE (vitamin D responsive element) w regionie promotorowym danego genu. Takimi genami są np. gen amfireduliny – nabłonkowego czynnika wzrostu stymulującego rozwój raków głowy, szyi i piersi [3], geny białka p21 (inhibitor cyklu komórkowego), białka bcl-2 (regulator apoptozy), białka p53 (supresor onkogenów kontrolujących wzrost komórki, takich jak np. *c-fos*) [36].

Połączenie z DNA odbywa się dzięki dwóm „palcom cynkowym” konserwatywnej domeny C, rozpoznającym od-

cinki regulatorowe genu. Domena E wraz z N-końcową domeną A-B uczestniczy w aktywacji transkrypcji, natomiast wspólnie z domeną C bierze udział w dimeryzacji. Receptory małe, takie jak nVDR asocjują z TFIIB, podstawowym czynnikiem ograniczającym szybkość formowania się kompleksu przedinicjacyjnego. Interakcja ta jest konieczna do zależnej od ligandu aktywacji transkrypcji i w warunkach *in vivo* jest dodatkowo modulowana przez komórkoswoiste czynniki towarzyszące. Ludzki nVDR oddziałuje fizycznie z TFIIB poprzez jego region C-końcowy. W interakcji nVDR-TFIIB, ze strony receptora uczestniczy część proksymalna domeny wiążącej ligand (E) i prawdopodobnie domena wiążąca DNA [19].

W przeciwieństwie do genów, których transkrypcja jest stymulowana przez kalcytriol, w innych genach proces ten podlega hamowaniu, np. w genach parathormonu i IL-2 [68]. Mechanizm tej regulacji nie jest do końca poznany, proponowane są dwie możliwości. Pierwsza z nich, dotycząca IL-2 zakłada, że nVDR wiąże się z VDRE i niszczy wiązanie czynników transkrypcyjnych, co prowadzi do obniżenia poziomu transkrypcji genów. Druga hipoteza zakłada, że wiązanie nVDR do inhibitora elementu odpowiedzi może prowadzić do interakcji z białkiem regulatorowym i obniżenia poziomu transkrypcji genów. Białko korepresorowe (np. jądrowy receptor korepresora NcoR i mediator receptora kwasu retinowego i receptora hormonu tyroidowego SMRT – silencing mediator for retinoid acid receptor and thyroid hormone receptor) wiąże się do deacetylazy histonowej, a ta wiąże się do promotora i wyłącza transkrypcję [48].

Interesującym jest to, iż receptory nVDR są obecne w ponad trzydziestu rozmaitych badanych tkankach, zarówno w tych, które ściśle wiążą się z metabolizmem wapnia w organizmie, tj. kościach, jelicie cienkim, nerkach czy gruczołach przytarczycznych, a także w tkankach niezależnych od przemian wapniowych: w komórkach nabłonkowych wątroby, nerek, tarczycy [36], w skórze, w trzustce, w okrężnicy, w macicy, jajniku i gruczole piersiowym [48], w gruczole krokowym [25], w niektórych komórkach systemu immunologicznego, co sugeruje zaangażowanie witaminy D₃ w funkcje komórkowe niezwiązane z metabolizmem wapnia w organizmie. Znaczącym odkryciem było wykazanie obecności receptorów VDR, identycznych z klasycznymi nVDR, w szerokiej grupie komórek zmienionych nowotworowo, m.in. aż w ponad 80% guzów gruczołu piersiowego [23,24,29], co oznaczało, iż komórki te mogą wykazywać wrażliwość na działanie witaminy D₃.

Liczni autorzy podkreślają osobnicze różnice w budowie receptora jądrowego, wynikające z jego polimorfizmu genowego [13,88]. Istnieją doniesienia o zależności pomiędzy budową nVDR a ryzykiem zachorowania na osteoporozę u kobiet w wieku postmenopauzalnym [49], raka prostaty [35,43], raka okrężnicy [78] lub sporadycznego raka piersi [39]. Mogłoby to mieć konsekwencje dla wczesnej prewencji tych zachorowań. W przypadku raka piersi, niektórzy autorzy nie znaleźli współzależności pomiędzy polimorfizmem VDR a ryzykiem zachorowania [9,42].

Mimo iż receptor ten jest aktywowany głównie przez niektóre analogi witaminy D₃, wykazuje również pewną wrażliwość na inne hormony steroidowe. Ponadto, pod

wpływem estrogenów wzrasta liczba receptorów VDR w osteoblastach [7].

2.4.2. mVDR

Pomimo że za większość działań związanych z aktywnością witaminy D₃ wydawały się odpowiedzialne receptory jądrowe (nVDR), co określa się jej działaniem „genomowym” (powolne narastanie odpowiedzi i długotrwały efekt), okazało się, iż kalcytriol może działać również w sposób „pozagenomowy”. Działania te zachodzą bądź na poziomie komórkowym (np. transport wapnia wewnątrz tkanek), bądź w przedziale międzykomórkowym (m.in. transport wapnia przez membrany, zmiany w II-rzędowych przekaźnikach wewnątrzkomórkowych). Działanie kalcytriolu pozagenomowego wykazano w badaniach *in vitro* w komórkach jelit (szybka mobilizacja wapnia z dwunastnicy), wątroby, mięśni, przytarczyc i osteoblastów. Zauważono istnienie receptora błonowego witaminy D mVDR (membrane vitamin D receptor) prawdopodobnie mającego zdolność wiązania ligandu odmienną niż receptor jądrowy nVDR. [65,69,70]. Różnica ta może się przejawiać m.in. w preferowaniu przez domeny wiążące obu receptorów odmiennych konformacji 1 α ,25(OH)₂D₃ (6-s-cis dla mVDR i 6-s-trans dla nVDR) [71]. Jednakże badania te prowadzone przez jeden zespół badaczy nie zostały dotychczas potwierdzone przez inne ośrodki, a dowody na jego istnienie są głównie pośrednie, związane z aktywnością szlaków sygnałowych [64].

Zauważono, że 1,25(OH)₂D₃ i analogi, zależnie od stężenia (10⁻¹⁰–10⁻⁸ M), powodują szybką aktywację enzymu (fosfolipazy) odpowiedzialnego za hydrolizę lipidów inozytowych. W wyniku aktywacji zostaje odszczepiony z błony 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu i dochodzi do powstania IP₃ (1,4,5-trifosforanu inozytolu) i DAG (diacyloglicerolu). IP₃ zostaje rozmięszony w cytosolu, gdzie wiąże się do wewnątrzkomórkowych błonowych białek kanałów Ca²⁺ i inicjuje ich otwieranie. Pozwala to jonom wapnia płynąć z miejsc sekwestracji do cytosolu. W wyniku wzrostu wewnętrznego stężenia jonów wapnia Ca²⁺ wzrasta wewnątrzkomórkowe pH, poprzez hamowanie wymiany Na⁺–H⁺, w wyniku procesu zależnego od wapnia i kalmodyliny (białko wiążące wapń) [82]. DAG – diacyloglicerol wiąże się z główną komórkową kinazą Ser-Thr – kinazą białkową C (PKC) i pomaga w jej aktywacji. Do pełnej aktywacji PKC wymaga też Ca²⁺ i powiązania z fosfolipidami na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W stanie nieaktywnym PKC jest białkiem cytosolowym. Kiedy rośnie stężenie Ca²⁺ PKC przemieszcza się do błony komórkowej. PKC jest ważną kinazą regulatorową – odgrywa istotną rolę w kontroli ekspresji genów. W jednym ze szlaków PKC aktywuje Raf1 – kinazę kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK). Następnie wzrasta aktywność i fosforylacja Tyr dwóch członków rodziny kinaz MAP–ERK-1 i ERK-2, które są związane z regulacją wzrostu wielu komórek [30,63].

3. DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE KALCYTRIOLU I METODY ICH OSŁABIANIA

Skuteczne zastosowanie kalcytriolu w leczeniu pacjentów z chorobami związanymi z nieprawidłowym wzrostem i różnicowaniem komórek – w tym również chorych na nowotwory – wiąże się z podwyższeniem jego stężenia w organizmie

powyżej poziomu fizjologicznego, co powoduje występowanie istotnych, niekorzystnych procesów wapniowych (hiperkalcemii, hiperkalcurii, powstawania zwapnień w narządach miększych). Obserwacja ta była bodźcem do syntezy nowych analogów kalcytriolu, które przy zachowaniu właściwości antyproliferacyjnych i różnicujących, nie będą wykazywały aktywności wapniowej (lub będą miały obniżoną) [16,36,95]. Inną z metod przeciwdziałania hiperkalcemii jest jednoczesne stosowanie leków z grupy bifosfonianów (klodronian, pamidronian, zoledronian), które zapobiegają demineralizacji kości oraz wiążą wapń w osoczu.

Okazało się, iż syntetyzowanie analogów kalcytriolu pozbawionych aktywności wapniowej, a mających właściwości antyproliferacyjne, różnicujące i indukujące apoptozę w warunkach *in vitro* i *in vivo*, stwarza możliwość potencjalnego zastosowania tych związków w leczeniu przeciwnowotworowym, z uniknięciem działań niepożądanych stwierdzonych dla kalcytriolu [6,71].

Analiza wszystkich modyfikacji chemicznych kalcytriolu, zmierzających do uzyskania analogów o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, przekracza znacznie ramy tego opracowania, a została omówiona szczegółowo w innych publikacjach [7,54,71]. Obecnie wprowadzone do leczenia lub w badaniach klinicznych i przedklinicznych znajduje się wiele analogów o zróżnicowanych właściwościach biologicznych [60,85,99]. Najważniejsze spośród nich, ze szczególnym uwzględnieniem działających przeciwnowotworowo zebrano w tab. 1.

Analogi wykazują różne właściwości farmakokinetyczne. Najważniejsze spośród nich to: powinowactwo do receptora VDR, do białka transportowego DBP (vitamin D binding protein) oraz szybkość metabolizowania przez enzymy cytochromu P₄₅₀ [8].

Różne analogi wykazują różne powinowactwo do swojego białka transportowego, a co za tym idzie, z różną prędkością dysocjują i wchodzą w reakcje wewnątrzustrojowe. Powinowactwo do białka wiążącego witaminę D₃ – DBP jest odwrotnie proporcjonalne do szybkości działania związku [48,61]. Od tego może również zależeć połowiczny czas rozkładu danego analogu i stopień powinowactwa do VDR [60,61]. Jednakże wydaje się, że decydującą rolę w powinowactwie ma budowa chemiczna analogu. Prowadzi to do zróżnicowania siły wiązania VDR do DNA.[8].

Prędkość metabolizowania analogów przez hydroksylazy: 25, 1 α , 24R decyduje również o toksyczności i sile działania analogów. [71].

4. ZASTOSOWANIE KLINICZNE KALCYTRIOLU I JEGO NOWYCH ANALOGÓW

Witamina D została zidentyfikowana w latach 20 ubiegłego wieku jako czynnik przeciwrzywczy [7,51]. Stwierdzono jej istotny wpływ na prawidłowe uwapnienie kości i ich właściwe ukształtowanie. Głównym źródłem witaminy D są pokarmy pochodzenia zwierzęcego, tj. ryby, jaja, wątroba zwierzęca, produkty mleczne. Nie mniej ważna jest ekspozycja na światło słoneczne, ponieważ metabolizm witaminy D przebiega z udziałem promieniowania UV. W dobie epidemicznego występowania krzywicy u dzie-

Tabela 1. Zastosowanie kalcytriolu i jego analogów

Nazwa chemiczna	Nazwa zwyczajowa	Zastosowanie	Stan zaawansowania badań	Literatura
$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	Kalcytriol	wtórna nadczynność przytarczyc, krzywica, osteoporoza	wprowadzony do leczenia	[71,99]
		rak prostaty androgenoniezależny	badania kliniczne	
$1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{-22-ene-24-cyklopropyl-D}_3$	Calcipotriol	łuszczyca	wprowadzony do leczenia	[71,99]
		nowotwory	badania przedkliniczne	
$1\alpha\text{(OH)D}_2$	Doxercalciferol	wtórna nadczynność przytarczyc, nerkopochodna osteodystrofia, osteoporoza	wprowadzony do leczenia	[71,99]
$19\text{-nor-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	Paricalcitol	wtórna nadczynność przytarczyc	wprowadzony do leczenia	[99]
		nowotwory	badania przedkliniczne	[54]
$22\text{-oxa-}1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	OCT – maxacalcitol	wtórna nadczynność przytarczyc	wprowadzony do leczenia	[99]
		nowotwory	badania przedkliniczne	[1]
$1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	PRI-2191 – tacalcitol	łuszczyca	wprowadzony do leczenia	[99]
		nowotwory	badania przedkliniczne	[95]
		neuroprotekcja	badania przedkliniczne	[87]
$(24\text{E})\text{-}24\text{a-Homo-(}1\text{S)-}1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$	PRI-1906	nowotwory	badania przedkliniczne	[16]
$1\alpha\text{(OH)-}24\text{-ethyl-cholecalciferol}$		rak piersi – leczenie i chemioprewencja	badania przedkliniczne	[41]
$1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-}16\text{-ene-}23\text{-yne-D}_3$		białaczka	badania przedkliniczne	[104]
$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-}22,24\text{-diene-}24,26,27\text{-trihomoD}_3$	EB1089 – seocalcitol	nowotwory, łuszczyca	badanie przedkliniczne	[36]

ci, tran, jako bogate źródło witaminy D_3 , stał się podstawowym lekiem stosowanym w tym schorzeniu. Obecnie witaminę D stosuje się w leczeniu krzywicy, osteoporozy [97]. Wprowadzono także nowe analogi witaminy D do terapii wtórnej nadczynności przytarczyc [8,71,91,99], nerkopochodnej osteodystrofii [8,63], łuszczycy [27,53,55,77,98]. Istnieją także doniesienia o potencjalnych zastosowaniach nowych analogów witaminy D w zwalczaniu chorób autoimmunologicznych [10,12], cukrzycy typu I [2,102], a także w transplantologii [11,40].

4.1. Choroby nowotworowe

Wyniki badań nad mechanizmem przeciwnowotworowej aktywności kalcytriolu i jego analogów wskazują na możliwość zastosowania tych związków w połączeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi, głównie z cytostatykami. Synergistyczne działanie pochodnych witaminy D i licznych cytostatyków, m.in. antybiotyków antracyklinowych, związków platynowych czy taksolu, obserwowano zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [66].

Zastosowanie kombinacji metabolitów witaminy D i cytostatyku pozwala na istotne obniżenie dawki cytostatyku, przy zachowaniu tej samej aktywności leku. Obniża

to w sposób znaczny ryzyko wystąpienia działań niepożądanych chemioterapii [92].

4.1.1. Białaczki

Chorobą, w zwalczaniu której wykazano skuteczność analogów kalcytriolu stosowanych pojedynczo, jest ostra białaczka promielocytarna. Działanie lecznicze witaminy polega na indukcji różnicowania komórek białaczkowych do komórek linii makrofagowo-monocytarnej [32].

4.1.2. Rak piersi

Obecnie trwają zaawansowane badania, mające na celu wprowadzenie analogów witaminy D do leczenia chorych na raka piersi [18,44,52,92,93]. Skuteczność terapeutyczną kalcytriolu potwierdzono zarówno w przypadkach raków hormonozależnych, jak i niemających receptora estrogenowego [90,93,100]. Aktywność w rakach ER+ tłumaczy się właściwościami antyestrogennymi pochodnych witaminy D [93], natomiast w nowotworach ER– prawdopodobnie główną rolę odgrywa indukcja apoptozy [26,90]. Co więcej, wydaje się, iż witamina D uwrażliwia komórki nowotworowe na leczenie antyestrogenami [58,98]. Wydaje się również, że w nowotworach piersi kalcytriol będzie mógł

osteoporoza, nadczynność przytarczyc, lecz także w chorobach, w których jest zachwiana równowaga pomiędzy proliferacją, różnicowaniem i apoptozą komórek (łuszczyca, choroby nowotworowe). Niestety, ograniczeniem zastosowania kalcytriolu w tych schorzeniach są działania niepożądane w postaci hiperkalcemii. To stało się bodźcem do syntezy analogów, które prezentowałyby korzystniejszy profil terapeutyczny. Badania nad programowaniem ich syntezy oraz zastosowaniem w leczeniu trwają i są znacznie zaawansowane. Dotyczą one głównie moż-

liwości wykorzystania witaminy D w leczeniu skojarzonym. Podstawowe nurty badań są związane z wrażliwością na leczenie nowotworów zależnych od hormonów steroidowych, tj. raki piersi i prostaty. Ponadto bada się efekty skojarzonego zastosowania pochodnych witaminy D i znanych cytostatyków, tj. cisplatyna, doksorubicyna, taksol. Pochodne witaminy D są również badane łącznie z fitoestrogenami i pochodnymi witaminy A. Inny kierunek badań dotyczy zastosowania analogów kalcytriolu w prewencji chorób nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abe J., Nakano T., Nishii Y., Matsumoto T., Ogata E., Ikeda K.: A novel vitamin D₃ analog, 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits the growth of human breast cancer *in vitro* and *in vivo* without causing hypercalcemia. *Endocrinology*, 1991; 129: 832–837
- [2] Adorini L.: Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2003; 987: 258–261
- [3] Akutsu N., Lin R., Bastien Y., Bestawros A., Enepekides D.J., Black M.J., White J.H.: Regulation of gene expression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma cells. *Mol. Endocrinol.*, 2001; 15: 1127–1139
- [4] Beer T.M., Eilers K.M., Garzotto M., Egorin M.J., Lowe B.A., Henner W.D.: Weekly high-dose calcitriol and docetaxel in metastatic androgen-independent prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 123–128
- [5] Beer T.M., Hough K.M., Garzotto M., Lowe B.A., Henner W.D.: Weekly high-dose calcitriol and docetaxel in advanced prostate cancer. *Semin. Oncol.*, 2001; 28: 49–55
- [6] Blutt S.E., Polek T.C., Steward L.V., Kattan M. W., Weigel N.L.: A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice. *Cancer Res.*, 2000; 60: 779–782
- [7] Bouillon R., Okamura W.H., Norman A.W.: Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocrine Rev.*, 1995; 16: 200–257
- [8] Brown A.J.: Therapeutic uses of vitamin D analogues. *Am. J. Kidney Dis.*, 2001; 38: S3–S19
- [9] Buyru N., Tezol A., Yosunkaya-Fenerci E., Dalay N.: Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast cancer. *Exp. Mol. Med.*, 2003; 35: 550–555
- [10] Cantorna M.T., Hayes C.E., DeLuca H.F.: 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J. Nutr.*, 1998; 128: 68–72
- [11] Cantorna M.T., Hullett D.A., Redaelli C., Brandt C.R., Humpal-Winter J., Sollinger H.W., DeLuca H.F.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prolongs graft survival without compromising host resistance to infection or bone mineral density. *Transplantation*, 1998; 66: 828–831
- [12] Cantorna M.T., Woodward W.D., Hayes C.E., DeLuca H.F.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a positive regulator for the two anti-encephalogenic cytokines TGF- β 1 and IL-4. *J. Immunol.*, 1998; 160: 5314–5319
- [13] Carling T., Rastad J., Akerstrom G., Westin G.: Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998; 83: 2255–2259
- [14] Chaudhry M., Sundaram S., Gennings C., Carter H., Gewirtz D.A.: The vitamin D₃ analog, ILX-23-7553, enhances the response to adriamycin and irradiation in MCF-7 breast tumor cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2001; 47: 429–436
- [15] Cho Y.L., Christensen C., Saunders D.E., Lawrence W.D., Deppe G., Malviya V.K., Malone J.M.: Combined effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and platinum drugs on the growth of MCF-7 cells. *Cancer Res.*, 1991; 51: 2848–2853
- [16] Chodynski M., Wietrzyk J., Marcinkowska E., Opolski A., Szelejowski W., Kutner A.: Synthesis and antiproliferative activity of side-chain unsaturated and homologated analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D(2). (24E)-(1S)-24-Dehydro-24a-homo-1,25-dihydroxyergocalciferol and congeners. *Steroids*, 2002; 67: 789–798
- [17] Chrobak A., Radzikowski C., Opolski A.: Side-chain-modified analogs of calcitriol cause resistance of human HL-60 promyelocytic leukemia cells to drug-induced apoptosis. *Steroids*, 2005; 70: 19–27
- [18] Colston K.W., Pirianov G., Bramm E., Hamberg K.J., Binderup L.: Effects of seocalcitol (EB1089) on nitrosomethyl urea-induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003; 80: 303–311
- [19] Czekaj P.: Interakcje receptorów hormonu tarczycy i pochodnych witamin A i D z DNA. *Post. Biol. Kom.*, 1996; 23: 261–278
- [20] Danilenko M., Studzinski G.P.: Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D(3) and its analogs. *Exp. Cell Res.*, 2004; 298: 339–358
- [21] DeLuca H.F., Cantorna M.T.: Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.*, 2001; 15: 2579–2585
- [22] Diaz G.D., Paraskeva C., Thomas M.G., Binderup L., Hague A.: Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D₃ and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.*, 2000; 60: 2304–2312
- [23] Eisman J.A., Suva L.J., Frampton R.J.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and breast cancer. *Aust. NZ J. Surg.*, 1984; 54: 17–20
- [24] Eisman J.A., Suva L.J., Sher E., Pearce P.J., Funder J.W., Martin T.J.: Frequency of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in human breast cancer. *Cancer Res.*, 1981; 41: 5121–5124
- [25] Feldman D., Zhao X.Y., Krishnan A.V.: Vitamin D and prostate cancer. *Endocrinology*, 2000; 141: 5–9
- [26] Fioravanti L., Miodini P., Cappelletti V., Di Fronzo G.: Synthetic analogs of vitamin D₃ have inhibitory effects on breast cancer cell lines. *Anticancer Res.*, 1998; 18: 1703–1708
- [27] Fogh K., Kragballe K.: New vitamin D analogs in psoriasis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2004; 3: 199–204
- [28] Freake H.C., Abeyasekera G., Iwasaki J., Marcocci C., MacIntyre I., McClelland R.A., Skilton R.A., Easton D.F., Coombes R.C.: Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in breast cancer and their relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Res.*, 1984; 44: 1677–1681
- [29] Fuller G.M., Shields D.: Podstawy molekularne biologii komórki. *Aspekty medyczne*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002: 220–222
- [30] Galbiati F., Polastri L., Thorens B., Dupraz P., Fiorina P., Cavallaro U., Christofori G., Davalli A.M.: Molecular pathways involved in the antineoplastic effects of calcitriol on insulinoma cells. *Endocrinology*, 2003; 144: 1832–1841
- [31] Garattini E., Terao M.: Cytodifferentiation: a novel approach to cancer treatment and prevention. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2001; 1: 358–363
- [32] Gaschott T., Steinmeyer A., Steinhilber D., Stein J.: ZK 156718, a low calcemic, antiproliferative, and prodifferentiating vitamin D analog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 290: 504–509
- [33] Gaschott T., Wachtershauser A., Steinhilber D., Stein J.: 1,25-Dihydroxycholecalciferol enhances butyrate-induced p21(Waf1/Cip1) expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 283: 80–85
- [34] Habuchi T., Suzuki T., Sasaki R., Wang L., Sato K., Satoh S., Akao T., Tsuchida N., Shimoda N., Wada Y., Koizumi A., Chihara J., Ogawa O., Kato T.: Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. *Cancer Res.*, 2000; 60: 305–308
- [35] Hansen C.M., Hamberg K.J., Binderup E., Binderup L.: Seocalcitol (EB 1089): A vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. *Curr. Pharm. Des.*, 2000; 6: 803–828

- [36] Hershberger P.A., Mcguire T.F., Yu W.D., Zuhowski E.G., Schellens J.H., Egorin M.J., Trump D.L., Johnson C.S.: Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase 1 (MEKK-1) expression. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 821–829
- [37] Hershberger P.A., Yu W.D., Modzelewski R.A., Rueger R.M., Johnson C.S., Trump D.L.: Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity *in vitro* and *in vivo* and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 1043–1051
- [38] Hou M.F., Tien Y.C., Lin G.T., Chen C.J., Liu C.S., Lin S.Y., Huang T.J.: Association of vitamin D receptor gene polymorphism with sporadic breast cancer in Taiwanese patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002; 74: 1–7
- [39] Hullett D.A., Cantorna M.T., Redaelli C., Humpal-Winter J., Hayes C.E., Sollinger H.W., DeLuca H.F.: Prolongation of allograft survival by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Transplantation*, 1998; 66: 824–828
- [40] Hussain E.A., Mehta R.R., Ray R., Das Gupta T.K., Mehta R.G.: Efficacy and mechanism of action of 1 α -hydroxy-24-ethyl-cholecalciferol (1 α [OH]D₅) in breast cancer prevention and therapy. In: *Vitamin D analogs in cancer prevention and therapy*. Eds.: Reichrath J., Friedrich M., Tilgen W. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2003: 393–411
- [41] Ingles S.A., Garcia D.G., Wang W., Nieters A., Hendersen B.E., Kolonel L.N., Haile R.W., Coetzee G.A.: Vitamin D receptor genotype and breast cancer in Latinas (United States). *Cancer Cause Control*, 2000; 11: 25–30
- [42] Ingles S.A., Ross R.W., Yu M.C., Irvine R.A., LaPera G., Haile R.W., Coetzee G.A.: Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997; 89: 166–170
- [43] James S.Y., Mercer E., Brady M., Binderup L., Colston K.W.: EB1089, a synthetic analogue of vitamin D, induces apoptosis in breast cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 1998; 125: 953–962
- [44] Jensen S.S., Madsen M.W., Lukas J., Binderup L., Bartek J.: Inhibitory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the G1-S phase-controlling machinery. *Mol. Endocrinol.*, 2001; 15: 1370–1380
- [45] Jiang F., Bao J., Li P., Nicosia S.V., Bai W.: Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through the down regulation of telomerase. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 53213–53221
- [46] Johnson C.S., Hershberger P.A., Trump D.L.: Vitamin D-related therapies in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 2002; 21: 147–158
- [47] Jones G., Strugnelli S.A., DeLuca H.F.: Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.*, 1998; 28: 1193–1231
- [48] Jorgensen H.L., Scholler J., Sand J.C., Bjuring M., Hassager C., Christiansen C.: Relation of common allelic variation at vitamin D receptor locus to bone mineral density and postmenopausal bone mass: Cross sectional and longitudinal population study. *Br. Med. J.*, 1996; 313: 586–590
- [49] Kallay E., Adlercreutz H., Farhan H., Lechner D., Bajna E., Gerdenitsch W., Campbell M., Cross H.S.: Phytoestrogens regulate vitamin D metabolism in the mouse colon: relevance for colon tumor prevention and therapy. *J. Nutr.*, 2002; 132: 3490S–3493S
- [50] Koren R., Hadari-Naor I., Zuck E., Rotem C., Liberman U.A., Ravid A.: Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1439–1444
- [51] Kragballe K., Barnes L., Hamberg K.J., Hutchinson P., Murphy F., Moller S., Ruzicka T., Van De Kerkhof P.C.: Calcipotriol cream with or without concurrent topical corticosteroid in psoriasis: tolerability and efficacy. *Br. J. Dermatol.*, 1998; 139: 649–654
- [52] Kroszczyński W., Morzycka B., Morzycki J.: A never ending story of Vitamin D. *Wiad. Chem.*, 2002; 56: 793–809
- [53] Kumagai T., O'Kelly J., Said J.W., Koeffler H.P.: Vitamin D₂ analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003; 95: 896–905
- [54] Kutner A.: Analogi witamin D o działaniu antyproliferacyjnym. *Post. Biochem.*, 1993; 39: 39–45
- [55] Lamprecht S.A., Lipkin M.: Cellular mechanism of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2001; 952: 73–87
- [56] Lamprecht S.A., Lipkin M.: Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 601–614
- [57] Larsen S.S., Heiberg I., Lykkesfeldt A.E.: Anti- oestrogen resistant human breast cancer cell lines are more sensitive towards treatment with the vitamin D analogue EB1089 than parent MCF-7 cells. *Br. J. Cancer*, 2001; 84: 686–690
- [58] Lee E., Jeon S.H., Yi J.Y., Jin Y.J., Son Y.S.: Calcipotriol inhibits autocrine phosphorylation of EGF receptor in a calcium-dependent manner, a possible mechanism for its inhibition of cell proliferation and stimulation of cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 284: 419–425
- [59] Levy Y., Knutson J.C., Bishop C., Shany S.: The novel analog 1,24 (S)- dihydroxyvitamin D₂ is as equipotent as 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in growth regulation of cancer cell lines. *Anticancer Res.*, 1998; 18: 1769–1776
- [60] Lin R., White J.H.: The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioassays*, 2004; 26: 21–28
- [61] Majewski S., Kutner A., Jabłońska S.: Vitamin D analogs in cutaneous malignancies. *Curr. Pharm. Des.*, 2000; 6: 829–838
- [62] Marcinkowska E.: Czy istnieje uniwersalny „szlak różnicowania”? Porównanie różnicowania *in vitro* różnych linii komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania komórek białaczki HL-60 pod wpływem 1,25-dihydroksywitamin D₃. *Post. Hig Med. Dośw.*, 1999; 53: 305–313
- [63] Marcinkowska E.: A run for a membrane vitamin D receptor. *Biol. Signals Recept.*, 2001; 10: 341–349
- [64] Mesbah M., Nemere I., Papagerakis P., Nefussi J.R., Orestes-Cardoso S., Nessmann C., Bernal A.: Expression of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ membrane-associated rapid-response steroid binding protein during human tooth and bone development and biomineralization. *J. Bone Miner. Res.*, 2002; 17: 1588–1596
- [65] Moffatt K.A., Johannes W.U., Miller G.J.: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 695–703
- [66] Muindi J.R., Peng Y., Potter D.M., Hershberger P.A., Tauch J.S., Capozzoli M.J., Egorin M.J., Johnson C.S., Trump D.L.: Pharmacokinetics of high-dose oral calcitriol: results from a phase I trial of calcitriol and paclitaxel. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2002; 72: 648–659
- [67] Muller K., Odum N., Bendtzen K.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ selectively reduces interleukin-2 levels and proliferation of human T cell lines *in vitro*. *Immunol. Lett.*, 1993; 35: 177–182
- [68] Nemere I., Farach-Carson M.C., Rohe B., Sterling T.M., Norman A.W., Boyan B.D., Safford S.E.: Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 7392–7397
- [69] Nemere I., Schwartz Z., Pedrozo H., Sylvia V.L., Dean D.D., Boyan B.D.: Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *J. Bone Miner. Res.*, 1998; 13: 1353–1359
- [70] Norman A.W., Mizwicki M.T., Okamura W.H.: Ligand structure–function relationships in the vitamin D endocrine system from the perspective of drug development (including cancer treatment). In: *Vitamin D analogs in cancer prevention and therapy*. Eds.: Reichrath J., Friedrich M., Tilgen W. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2003: 55–82
- [71] Opolski A., Wietrzyk J., Chrobak A., Marcinkowska E., Wojdat E., Kutner A., Radzikowski C.: Antiproliferative activity *in vitro* of side-chain analogues of calcitriol against various human normal and cancer cell lines. *Anticancer Res.*, 1999; 19: 5217–5222
- [72] Opolski A., Wietrzyk J., Siwinska A., Marcinkowska E., Chrobak A., Radzikowski C., Kutner A.: Biological activity *in vitro* of side-chain modified analogues of calcitriol. *Curr. Pharm. Des.*, 2000; 6: 755–765
- [73] Osborn J., Schwartz L., Smith D., Bahnsonr., Day R., Trump D.L.: Phase II trial of oral 1,25 dihydroxyvitamin D (calcitriol) in hormone refractory prostate cancer. *Urol. Oncol.*, 1995; 1: 195–198
- [74] Peehl D.M., Krishnan A.V., Feldman D.: Pathways mediating the growth-inhibitory actions of vitamin D in prostate cancer. *J. Nutr.*, 2003; 133: 2461S–2469S
- [75] Perez-Stable C.M., Schwartz G.G., Farinas A., Finegold M., Binderup L., Howard G.A., Roos B.A.: The G gamma/T-15 transgenic mouse model of androgen-independent prostate cancer: target cells of carcinogenesis and the effect of the vitamin D analogue EB 1089. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002; 11: 555–563
- [76] Peters D.C., Balfour J.A.: Tacalcitol. *Drugs*, 1997; 54: 265–271
- [77] Peters U., McGlynn K.A., Chatterjee N., Gunter E., Garcia-Closas M., Rothman N., Sinha R.: Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001; 10: 1267–1274
- [78] Plum L.A., Prah J.M., Ma X., Sicinski R., Gowlugari S., Clagett-Dame M., DeLuca H.F. Biologically active noncalcemic analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D with an abbreviated side chain containing no hydroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 6900–6904

- [79] Prudencio J., Akutsu N., Benlimame N., Wang T., Bastien Y., Lin R., Black M.J., Alaoui-Jamali M.A., White J.H.: Action of low calcemic 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analogue EB1089 in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 745–753
- [80] Ravid A., Rocker D., Machlenkin A., Rotem C., Hochman A., Kessler-Ickson G., Liberman U.A., Koren R.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.*, 1999; 59: 862–867
- [81] Sergeev I.N., Rhoten W.B., Spirichev V.B.: Vitamin D and intracellular calcium. *Subcell. Biochem.*, 1998; 30: 271–297
- [82] Shin M.H., Holmes M., Hankinson S., Wu K., Colditz G., Willett W.: Intake of dairy products, calcium, and vitamin D and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002; 94: 1301–1311
- [83] Siwinska A., Opolski A., Chrobak A., Wietrzyk J., Wojdat E., Kutner A., Szelejowski W., Radzikowski C.: Potentiation of the antiproliferative effect *in vitro* of doxorubicin, cisplatin and genistein by new analogues of vitamin D. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 1925–1929
- [84] Smith D.C., Johnson C.S., Freeman C.C., Muindi J., Wilson J.W., Trump D.L.: A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 6: 1339–1345
- [85] Smith E.L., Pincus S.H., Donovan L., Holick M.F.: A novel approach for the evaluation and treatment of psoriasis. Oral or topical use of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ can be a safe and effective therapy for psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1998; 19: 516–528
- [86] Tetich M., Kutner A., Leskiewicz M., Budziszewska B., Lasoń W.: Neuroprotective effects of (24R)-1,24-dihydroxycholecalciferol in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004; 89–90: 365–370
- [87] Uitterlinden A.G., Fang Y., Bergink A.P., van Meurs J.B., van Leeuwen H.P., Pols H.A.: The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2002; 197: 15–21
- [88] Van den Bemd G.J., Pols H., Van Leeuwen J.: Anti-tumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs. *Curr. Pharm. Des.*, 2000; 6: 717–732
- [89] Van Weelden K., Flanagan L., Binderup L., Tenniswood M., Welsh J.: Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D₃ analog, EB1089. *Endocrinology*, 1998; 139: 2102–2110
- [90] Verstuyf A., Segaert S., Verlinden L., Bouillon R., Mathieu C.: Recent developments in the use of vitamin D analogues. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 2000; 9: 443–455
- [91] Wang Q., Lee D., Sysounthone V., Chandraratna R.A.S., Christakos S., Korah R., Wieder R.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoid acid analogues induce differentiation in breast cancer cells with function- and cell-specific additive effects. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2001; 67: 157–168
- [92] Welsh J., Van Weelden K., Flanagan L., Byrne I., Nolan E., Narvaez C.J.: The role of vitamin D₃ and antiestrogens in modulating apoptosis of breast cancer cells and tumors. *Subcell. Biochem.*, 1998; 30: 245–270
- [93] Welsh J., Wietzke J.A., Zinser G.M., Byrne B., Smith K., Narvaez C.J.: Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J. Nutr.*, 2003; 133: 2425S–2433S
- [94] Wietrzyk J., Pelczynska M., Madej J., Dzimira S., Kusnierczyk H., Kutner A., Szelejowski W., Opolski A.: Toxicity and antineoplastic effect of (24R)-1,24-dihydroxyvitamin D₃ (PRI-2191). *Steroids*, 2004; 69: 629–635
- [95] Wietzke J.A., Welsh J.: Phytoestrogen regulation of a Vitamin D₃ receptor promoter and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ actions in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003; 84: 149–157
- [96] Woolf A.D., Akesson K.: Preventing fractures in elderly people. *Br. Med. J.*, 2003; 327: 89–95
- [97] Wu G., Fan R.S., Li W., Srinivas V., Brattain M.G.: Regulation of transforming growth factor-beta type II receptor expression in human breast cancer MCF-7 cells by vitamin D3 and its analogues. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 7749–7756
- [98] Wu Wong J.R., Tian J., Goltzman D.: Vitamin D analogs as therapeutic agents: a clinical study update. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2004; 5: 320–326
- [99] Xie S.P., Pirianov G., Colston K.W.: Vitamin D analogues suppress IGF-I signalling and promote apoptosis in breast cancer cells. *Eur. J. Cancer*, 1999; 35: 1717–1723
- [100] Yang S.L., Smith C., Prah J. M., Luo X.L., DeLuca H. F.: Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity *in vivo*. 1993; 303: 98–106
- [101] Zella J.B., DeLuca H.F.: Vitamin D and autoimmune diabetes. *J. Cell. Biochem.*, 2003; 88: 216–222
- [102] Zhao X.Y., Feldman D.: The role of vitamin D in prostate cancer. *Steroids*, 2001; 66: 293–300
- [103] Zhou J.Y., Norman A.W., Chen D.L., Sun G.W., Uskokovic M., Koeffler H.P.: 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃ prolongs survival time of leukemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 3929–3932
- [104] Zimmer A., Chedeville A., Abita J.P., Barbu V., Gespach C.: Functional interactions between bile acids, all-trans retinoic acid, and 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ on monocytic differentiation and myeloblastin gene down-regulation in HL60 and THP-1 human leukemia cells. *Cancer Res.*, 2000; 60: 672–678