

Received: 2007.03.13
Accepted: 2007.04.30
Published: 2007.05.10

Wpływ izoflawonoidów na aktywność przeciwnowotworową witaminy D₃

The influence of isoflavonoids on the antitumor activity of vitamin D₃

Joanna Wietrzyk

Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Izoflawonoidy wpływają na ekspresję enzymów cytochromu P450, a także działają bezpośrednio na receptor witaminy D (VDR), uwrażliwiając komórki na działanie hormonalnie aktywnej postaci witaminy D₃: 1,25-(OH)₂D₃. Izoflawonoidy hamują aktywność 24-hydroksylazy 25-hydroksywitaminy D₃ (CYP24), która degraduje hormon, a także jego prekursor – 25-OH-D₃ do nieaktywnych związków. W ten sposób mogą wpływać korzystnie na poziom aktywnej hormonalnie postaci witaminy D₃. Ponadto, działanie stymulujące fitoestrogenów na CYP27B1, enzym uczestniczący w syntezie 1,25-(OH)₂D₃ prowadzić może do podobnego efektu. Aktywność CYP27B1 i CYP24 wykazano w nerkach (główne źródło aktywnej postaci 1,25-(OH)₂D₃), a także w komórkach mózgu, osteoblastach, keratynocytach, makrofagach, komórkach nabłonka jelitowego i komórkach różnych typów nowotworów. Podobnie, ekspresję VDR wykryto, obok „klasycznych” tkanek docelowych dla witaminy D, również w wielu innych komórkach pochodzenia nabłonkowego i mezenchymalnego. W związku z tym skojarzone stosowanie fitoestrogenów i 1,25-(OH)₂D₃, może działać korzystnie, zarówno w prewencji, jak i w leczeniu chorób nowotworowych.

Słowa kluczowe:

witamina D₃ • VDR • leczenie chorób nowotworowych • izoflawonoidy • genisteina

Summary

Isoflavonoids exert a regulatory function on the expression of cytochrome P450 enzymes and also up-regulate the vitamin D₃ receptor (VDR) on cancer cells, which increase their sensitivity to 1,25-dihydroxyvitamin D₃, the hormonally active form of vitamin D₃. Isoflavonoids are also able to raise the serum level of the active form of vitamin D₃ due to their inhibitory activity on CYP24, the enzyme involved in the degradation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its precursor 25-OH-D₃ to inactive compounds. Another enzyme, CYP27B1, involved in the synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, is stimulated by isoflavonoids, and this may result in a similar effect of increasing in the serum level of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. CYP27B1 and CYP24 were found in kidneys (the main location of 1,25-(OH)₂D₃ synthesis) and also in brain cells, osteoclasts, keratinocytes, macrophages, intestine epithelial cells, and in some cancer cells. The expression of VDR was detected not only in the cells primarily targeted by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, but also in epithelial and mesenchymal cells. Therefore, combined treatment with isoflavonoids and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ might be effective in both cancer prevention and treatment.

Key words:

vitamin D₃ • VDR • antitumor treatment • isoflavonoids • genistein

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10442.pdf
Word count:	2547
Tables:	–
Figures:	1
References:	109

Adres autorki: dr Joanna Wietrzyk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław;
e-mail: wietrzyk@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

Witamina D₃, niezbędna w utrzymaniu homeostazy wapnia i fosforu, może pochodzić z dwóch źródeł – pierwszym z nich jest pokarm, drugim – synteza w skórze. Jest ona prekursorem hormonalnie aktywnego metabolitu: 1,25-dihydroksycholekalcyferolu (1,25-dihydroksywitaminsy D₃, 1,25-(OH)₂D₃, tzw. kalcytriolu) [14]. W trakcie aktywacji metabolicznej cholekalcyferol (witamina D₃) syntetyzowany jest w skórze z prekursora: 7-dehydroksycholesterolu (prowitaminsy D₃) lub pochodzi z pokarmu (absorpcja jelitowa). Następnie transportowany jest przez krew, jako kompleks z białkami DBP (vitamin D-binding protein) do wątroby. W wątrobie dochodzi do jego hydroksylacji (przy węglu C25) i przekształcenia w 25 hydroksywitaminę D₃ (25-OH-D₃), która jest główną postacią witaminy D₃ krążącą we krwi. Enzymem odpowiedzialnym za ten proces jest 25-hydroksylaza witaminy D₃, a funkcję taką prawdopodobnie pełnić może każdy z czterech wymienionych enzymów: CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1 oraz CYP2J3 (ryc. 1) [77].

W kolejnym etapie przemian obecny w nerkach enzym cytochromu P450, czyli 1 α -hydroksylaza 25-hydroksywitaminsy D₃ (CYP27B1), doprowadza do powstania 1,25-(OH)₂D₃. Związek ten jest metabolicznie aktywną postacią cholekalcyferolu – 1000 razy bardziej aktywną niż jej prekursor (ryc. 1) [77,90].

Innym, podstawowym w metabolizmie witaminy D₃ enzymem, jest 24-hydroksylaza 25-witaminsy D₃ (CYP24), odpowiedzialna za degradację zarówno hormonu, jak i jego prekursora do nieaktywnych metabolicznie związków (ryc. 1) [77].

Fizjologicznie CYP24 jest aktywowany przez 1,25-(OH)₂D₃. Dodatkowym elementem ujemnego sprzężenia zwrotnego, które reguluje stężenie 1,25-(OH)₂D₃, jest obniżanie aktywności CYP27B1 przez aktywną postać witaminy D₃. Oba mechanizmy chronią przed nadmiernym wzrostem stężenia 1,25-(OH)₂D₃ w organizmie, który może prowadzić do hiperkalcemii [77].

CYP27B1 i CYP24 wykazują aktywność w nerkach (główne źródło aktywnej postaci 1,25-(OH)₂D₃), a także w komórkach mózgu, osteoblastach, keratynocytach, makrofagach, komórkach nabłonka jelitowego i komórkach różnych typów nowotworów (hydroksylazy obwodowe) [4,6,9,40,105].

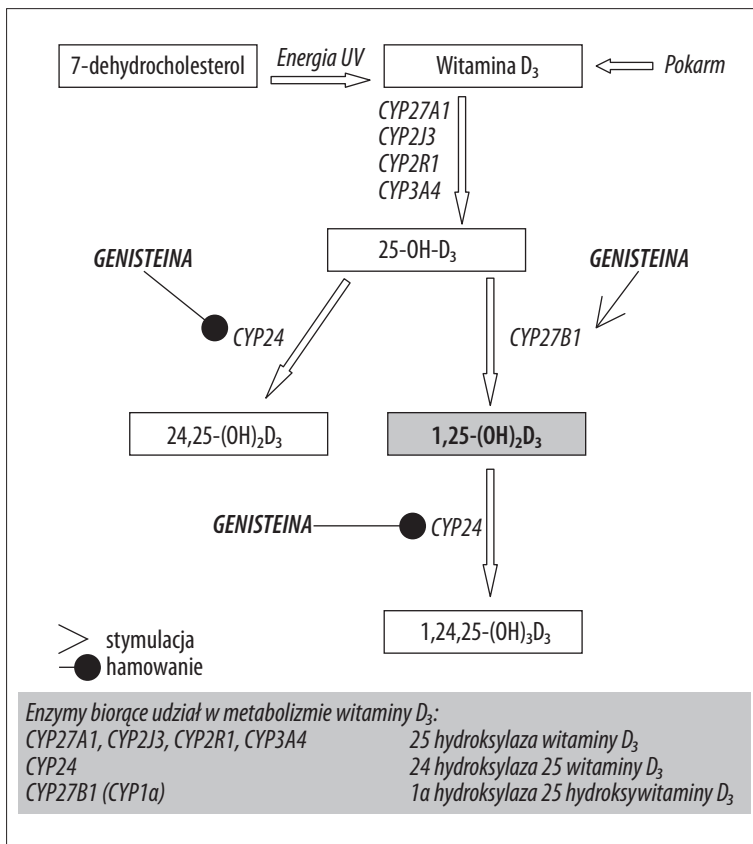
Aktywny hormon działa poprzez receptor witaminy D – VDR, doprowadza do zmian w poziomie ekspresji genów docelowych i wzbudza lub wycisza określone szlaki syg-

nałowe w komórce [4,39,56,68]. Podobnie jak w przypadku enzymów szlaku metabolicznego witaminy D, również ekspresję VDR wykryto, obok „klasycznych” tkanek docelowych dla witaminy D, w wielu innych komórkach pochodzenia nabłonkowego i mezenchymalnego [4,56].

Właściwe stężenie 1,25-(OH)₂D₃ w organizmie jest niezbędne nie tylko do utrzymania homeostazy wapniowej i prawidłowej mineralizacji kości, ale może pełnić także rolę protekcyjną w przypadku rozwoju nowotworów. Dlatego też sugeruje się, iż enzymy katabolizujące aktywną postać witaminy D₃ mogą funkcjonować jak onkogeny [2]. Wykazano, że małe stężenie 1,25-(OH)₂D₃ w surowicy koreluje z dużą zapadalnością na niektóre nowotwory, takie jak m.in. rak piersi, okrężnicy czy stercza [13,32,43,56]. Stwierdzono także zmniejszoną zapadalność na niektóre typy nowotworów, związaną ze zwiększoną ekspozycją na światło słoneczne. Nie dotyczy to jednak nowotworów skóry [7,12,33,38]. Ponadto, komórki wielu linii nowotworowych reagują na działanie witaminy D₃ obniżeniem proliferacji, zwiększonym różnicowaniem i apoptozą [1,5,15,16,25,67,82,88,101,106].

Ponieważ aktywność enzymów uczestniczących w syntezie aktywnej postaci witaminy D₃ wykazano w różnych komórkach organizmu (również w komórkach nowotworowych), zwrócono uwagę na możliwość zwiększenia syntezy 1,25-(OH)₂D₃ przez te komórki (np. poprzez wpływ na CYP27B1 lub CYP24).

Badania epidemiologiczne dowodzą, że występowanie wielu nowotworów, w tym nowotworów piersi [72,73], okrężnicy [59], żołądka [66], gruczołu krokowego [55], tarczycy [42] oraz raków głowy i szyi [3] jest zróżnicowane geograficznie i w dużej mierze wiąże się ze sposobem odżywiania – zwłaszcza ze spożyciem produktów sojowych. Nasiona soi, które stanowią główny składnik pożywienia w krajach azjatyckich, bogate są w izoflawonoidy. Jednym z ważniejszych izoflawonoidów jest genisteina, występująca w soi głównie jako postać glikozylowa znana pod nazwą genistyny, która ulega w przewodzie pokarmowym przemianie pod wpływem flory jelitowej do aglikonu – genisteiny, a następnie do dwuhydroksygenisteiny i *p*-etylofenolu. Daidzina, glikozylowa postać daidzeiny, innego głównego izoflawonoidu soi ulega hydroлизie m.in. do equolu [84,85,86]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazują, że izoflawonoidy mogą działać przeciwnowotworowo. Jednakże, w niektórych przypadkach, wiązki te nie tylko nie wykazują działania prewencyjnego, lecz nawet zwiększają częstość występowania niektórych nowotworów u zwierząt doświadczalnych [98]. Genisteina jest inhibitorem kinaz tyrozynowych, topoizomazy II, a także angiogenezy i proliferacji komórek nowotworowych



Ryc. 1. Wpływ genisteiny na enzymy szlaku metabolicznego witaminy D₃. Witamina D₃ (cholekalcyferol), pochodząca z syntezy w skórze lub dostarczana z pożywieniem ulega w wątrobie hydroksylacji w pozycji 25 i przekształca się w 25-OH-D₃ (25-hydroksycholekalcyferol), który jest główną postacią witaminy D₃ krążącą we krwi. Kolejna hydroksylacja w nerkach powoduje następnie powstanie 1,25-(OH)₂D₃ (1,25-dihydroksycholekalcyferolu) – hormonalnie aktywnej postaci witaminy D₃. Enzym CYP24, jest enzymem degradującym zarówno 25-OH-D₃, jak i 1,25-(OH)₂D₃ do nieaktywnych metabolitów. Genisteina może hamować aktywność CYP24 i stymulować aktywność CYP27B1

[79,97]. Dodatkowo, hamuje ona lub pobudza aktywność wielu enzymów cytochromowych, w tym enzymów cytochromu P450, odpowiedzialnych, jak opisano wyżej, za metabolizm witaminy D [19,23,29,30,31]. Z tymi właściwościami jest związany dodatkowy mechanizm, który prawdopodobnie ma udział w działaniu prewencyjnym i przeciwnowotworowym izoflawonoidów.

WPŁYW ISOFLAWONOIDÓW NA AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW SZLAKU METABOLICZNEGO WITAMINY D₃ W RÓŻNYCH TYPAH NOWOTWORÓW

Istnieją liczne doniesienia wskazujące na wrażliwość komórek różnych linii raka gruczołu krokowego zarówno na działanie genisteiny, jak i 1,25-(OH)₂D₃ [10,11,60,67,74,75,76,97]. Również badania epidemiologiczne wskazują na możliwość występowania zależności między częstością zapażenia na ten nowotwór, a spożyciem soi [55,59,97] czy stężeniem 1,25-(OH)₂D₃ w surowicy lub stopniem ekspozycji na promieniowanie UVB [12,13,38,44,45,46,76,104].

Badania prowadzone *in vitro* na komórkach linii nowotworów łagodnych i złośliwych gruczołu krokowego wykazały synergistyczne hamowanie proliferacji komórek przez genisteinę i 1,25-(OH)₂D₃ oraz 25-OH-D₃ [81]. Autorzy porównywali wpływ genisteiny i witaminy D₃ stosowanych w kombinacji, na komórki nabłonkowe pierwotnej linii raka gruczołu krokowego HPEC (human prostatic epithelial cells) z jej wpływem na komórki linii raka tego gruczołu: LNCaP i PC-3. Analiza izoblograficzna uzyskanych wyników wykazała synergistyczne zahamowanie proliferacji badanych komórek zarówno po traktowaniu genisteiną wraz z 1,25-(OH)₂D₃, jak i genisteiną w połączeniu z metaboli-

tem witaminy D₃ o obniżonym działaniu kalcemicznym: 25-OH-D₃. Synergizm ten był wyraźniejszy w przypadku komórek HPEC. Analizując fazy cyklu komórkowego stwierdzono, iż zarówno kalcytriol, jak i jego analog blokują komórki HPEC w fazie G0/G1, natomiast genisteina – w fazie G2/M. Po zastosowaniu kombinacji obu preparatów uzyskano zablokowanie obu faz cyklu komórkowego. Natomiast w przypadku komórek linii nowotworowej LNCaP blokowana była tylko faza G0/G1, niezależnie od zastosowanego schematu traktowania, co wyjaśniać może słabsze współdziałanie genisteiny i 1,25-(OH)₂D₃ w przypadku komórek linii nowotworowych [81].

Rao i wsp. [80] wskazali ponadto na możliwość udziału jeszcze innego mechanizmu współdziałania genisteiny i 1,25-(OH)₂D₃, wynikającego m.in. ze stwierdzonego zablokowania cyklu komórkowego, obserwowanego po traktowaniu komórek tymi związkami łącznie [81]. Mianowicie, cyklinozależne inhibitory kinaz p21 i p27 są zaangażowane w hamowanie cyklu komórkowego zarówno przez genisteinę, jak i przez 1,25-(OH)₂D₃ [80,87,109]. Co więcej, wykazano, iż w miejscu promotorowym genu p21 znajdują się funkcjonalne elementy regulatorowe receptora witaminy D (VDR responsive element – VDRE) sugerując bezpośrednią kontrolę transkrypcyjną VDR nad genem białka p21 [83]. Wykazano, iż obecność p21, jest istotna dla działania przeciwproliferacyjnego zarówno genisteiny, jak i 1,25-(OH)₂D₃, stosowanych zarówno osobno, jak i łącznie. Komórki raka gruczołu krokowego LNCaP, w których ekspresja p21 była obniżona za pomocą strategii siRNA były niewrażliwe na hamowanie proliferacji przez genisteinę i 1,25-(OH)₂D₃, stosowane oddzielnie, jak i łącznie [80].

Zarówno komórki z pierwotnych hodowli, jak i komórki utrwalonych linii raka gruczołu krokowego wykazują ekspresję CYP24 i CYP27B1 [30,31,60,61,62]. Wysoka ekspresja CYP24 np. w komórkach raka gruczołu krokowego Du145 powoduje niewrażliwość tych komórek na działanie $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Traktowanie komórek tej linii genisteiną prowadzi do zależnego od czasu i stężenia zahamowania aktywności CYP24, z jednoczesnym zahamowaniem aktywności CYP27B1 [29,30,31,92]. Metodą RT-PCR wykazano, że hamowana jest transkrypcja *CYP24*, natomiast w przypadku *CYP27B1* redukcja aktywności genu wynika z deacylacji histonu [30,31]. Następtwem jest uwrażliwienie komórek linii Du145 na działanie antyproliferacyjne $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ pod wpływem genisteiny [92]. Inne izoflawonoidy, takie jak daidzeina i pochodne genisteiny: dihydroksygenisteina, czterohydroksygenisteina lub też preparat antyestrogenny ICI 182,780 wykazują słabe hamowanie aktywności CYP24 [29,92].

Zaobserwowano, iż genisteina oprócz wpływania na aktywność enzymów szlaku metabolicznego witaminy D_3 , zastosowana łącznie z $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ powoduje zwiększenie ekspresji VDR, prawdopodobnie przez przedłużenie czasu półtrwania $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ [80,92].

Proponowany jest także inny możliwy mechanizm potęgowania działania genisteiny i witaminy D w przypadku komórek raków gruczołu krokowego – ich wpływ na szlak sygnałowy prostaglandyn (PG). Wykazano, iż $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ jest inhibitorem tego szlaku na trzech różnych poziomach: obniżenie ekspresji

- i) cyklooksygenazy-2 (COX-2),
- ii) receptorów PGE_2 i $\text{PGF}_{2\alpha}$ oraz
- iii) podwyższenie ekspresji dehydrogenazy 15-hydroksyprostaglandyny (15-PGHD).

Wszystkie te zdarzenia prowadzą do obniżenia poziomu biologicznie aktywnej postaci PGE_2 i do zahamowania proliferacji komórek raka gruczołu krokowego [50,63,64,65]. Genisteina natomiast, z jednej strony hamując aktywność CYP24 przyczynia się do przedłużenia obecności i aktywności $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, a z drugiej strony, sama ma zdolność do hamowania ekspresji i aktywności COX-2, prowadząc do spadku syntezy PGE_2 . Ponadto obniża ona ekspresję obu wymienionych receptorów PG [41,91,93].

Wydaje się, że terapia kombinowana z użyciem genisteiny i witaminy D w leczeniu przeciwnowotworowym raka gruczołu krokowego, może być bezpieczna ze względu na stosunkowo niewielką toksyczność obu preparatów.

W przypadku raka okrężnicy badania epidemiologiczne wskazują natomiast na protekcyjną rolę witaminy D [12,13,17,18,20,21,32,52,54,89,104]. Opisano również antymitotyczne i stymulujące różnicowanie działanie $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ i niektórych analogów witaminy D *in vitro* i *in vivo* wobec komórek różnych linii raka okrężnicy [25,28,34,69]. Wykazano, że komórki raka okrężnicy Caco-2 utrzymywane w hodowli *in vitro*, syntetyzują $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ z prekursora: 25-OH-D_3 [24]. Dowiedziono ponadto, że poziom CYP27B1 i VDR wzrasta we wczesnych etapach progresji raka okrężnicy, podczas gdy w późnych stadiach rozwoju nowotworu jest bardzo niski. U ludzi zdrowych, w kryptach jelitowych poziom enzymu jest nad-

zwyczaj niski. Sugeruje to obecność autokrynej „osłony” poprzez działanie $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, syntetyzowanej we wczesnym stadium rozwoju nowotworu, co może zwolnić jego progresję, a nawet zatrzymać rozwój procesu nowotworowego. W późniejszych stadiach choroby obrona ta nie jest skuteczna, a nawet nie występuje, prawdopodobnie z powodu postępujących mutacji somatycznych. Jednocześnie obserwowana jest wysoka ekspresja CYP24 w obrębie nowotworu, co może powodować szybkie metabolizowanie $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ do mniej aktywnych pochodnych, a tym samym przeciwdziałać przeciwnowotworowemu działaniu witaminy D_3 [6]. W tym kontekście, interesujące są sugestie mówiące o *CYP24* jako o onkogenie [2].

W badaniach eksperymentalnych, wykazano zwiększenie ekspresji CYP27B1 i obniżenie ekspresji CYP24 w mysiej okrężnicy po jednorazowym podaniu doustnym genisteiny. Tak więc, genisteina wpływa korzystnie na optymalizowanie wytwarzania aktywnej postaci witaminy D w jelicie. Co więcej, regulacji tej towarzyszy zwiększenie koncentracji genisteiny w tkance jelita [48].

Cross i wsp. wykazali, że u myszy karmionych paszą o małej zawartości wapnia (takiej, która odpowiada stężeniu wapnia związanemu ze zwiększoną zapadalnością ludzi na nowotwory) aktywowany jest szlak metaboliczny związany z degradacją witaminy D. Suplementacja diety dużymi dawkami witaminy D i wapniem obniża aktywność CYP24, ale tylko uzupełnienie diety o kwas foliowy normalizuje całkowicie szlak degradacji witaminy D. Do normalizacji takiej dochodzi także u myszy, karmionych paszą o obniżonej zawartości wapnia, którym jednocześnie podawano w diecie soję lub genisteinę [23]. Inne doniesienia dotyczą regulacji syntezy witaminy D w jelicie, zależnej od fitoestrogenów. Bises i wsp. wykazali, że genisteina zapobiega innym niekorzystnym skutkom niedoboru wapnia, a mianowicie obniża zwiększoną podczas tego stanu, ekspresję białka COX-2 [8].

Oprócz wpływu fitoestrogenów na szlak metaboliczny witaminy D w jelicie wykazano także, że genisteina i glyciteina (w stopniu zbliżonym do $17\text{-}\beta$ -estradiolu) oraz w mniejszym stopniu equol zwiększają transkrypcję i translację VDR, a także aktywność promotorową VDR w komórkach linii ludzkiego raka okrężnicy HT-29 [35].

Wszystkie te dane wskazują na słuszność koncepcji leczenia chorych z rakiem okrężnicy, jak i przeciwdziałania powstawaniu tego nowotworu przez zwiększenie dostępności $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ w surowicy, jak i endogennego wytwarzania tego hormonu przez komórki krypt jelitowych. W tym celu prawdopodobnie nie wystarczy tylko zwiększenie spożycia witaminy D_3 i zwiększenie ekspozycji na promieniowanie słoneczne. Ważne jest także zwrócenie uwagi na regulację ekspresji i aktywności enzymów CYP27B1 i CYP24, uczestniczących w jej cyklu metabolicznym.

Badania epidemiologiczne sugerują zmniejszenie ryzyka wystąpienia nowotworu gruczołu piersiowego zarówno w przypadku wyższego spożycia witaminy D, a także produktów sojowych [12,33,56,72,73,94,95,97]. Zarówno testy *in vitro*, jak i *in vivo* wskazują na możliwość synergistycznego działania obu tych czynników [53,103]. Wykazano obecność CYP24 w nowotworach gruczołu piersiowego

– przy czym transkrypcja CYP24 okazała się ściśle związana z poziomem i aktywnością receptora witaminy D (VDR) [2]. Natomiast w komórkach linii ludzkiego raka piersi MCF-7 poziom CYP27B1 wzrasta w zależności od zastosowanego stężenia genisteiny [22, 53].

Lechner i wsp. stwierdzili, że genisteina, podobnie jak 17-β-estradiol reguluje syntezę witaminy D w komórkach raka jelita linii Caco-2 i gruczołu piersiowego linii MCF-7, przez indukowanie CYP27B1 i redukcję aktywności CYP24. Equol nie wykazywał takiej aktywności [53]. Wietzke i Welsh wykazali, że fitoestrogeny (resveratrol i genisteina) zwiększają poziom receptora VDR i uwrażliwiają komórki ludzkiego raka piersi linii T47D i MCF-7 na działanie 1,25-(OH)₂D₃ i jego analogów [103]. Wykazano obecność nowego regionu promotorowego genu VDR, regulowanego przez naturalne estrogeny i fitoestrogeny, takie jak genisteina, czy resveratrol, przy czym regulacja ta była zależna od obu receptorów estrogenowych (α i β) [102,103]. Komórki raka gruczołu piersiowego wykazują ekspresję obydwu tych receptorów estrogenowych: α i β, podczas gdy komórki raka okrężnicy, głównie ERβ, co wyjaśniałoby większą wrażliwość tych pierwszych na regulujące działanie genisteiny i estrogenów. Ponadto sugeruje to większą podatność komórek gruczołu piersiowego, niż kolonocytów na prewencyjne działanie zaproponowanej strategii [53].

Jones i wsp. zbadali komórki pięciu różnych linii niedrobnokomórkowego raka płuc: Calu-1, SK-Luci-6, SK-MES-1, SW 900 i WT-E, pod kątem obecności enzymów cytochromu P450 (CYP27B1 i CYP24). Transportowe RNA (mRNA) dla CYP27B1 oraz aktywność enzymu 1α-hydroksylazy wykryto w komórkach dwóch linii (SW 900, SK-Luci-6) spośród pięciu badanych. W dwóch innych (WT-E, Calu-1) wykryto wysoką ekspresję CYP24. Pomimo iż komórki linii SW 900 w warunkach prawidłowych wykazują tylko ekspresję CYP27B1 oraz aktywność enzymu 1α-hydroksylazy, to traktowanie ich małymi stężeniami 1,25-(OH)₂D₃ lub dużymi stężeniami 25-OH-D₃, powodowało pojawianie się CYP24 i aktywności 24-hydroksylazy. Co więcej, komórki SW 900, do 24 h po traktowaniu witaminą D, ciągle wykazywały obecność mRNA dla CYP27B1, mimo że aktywność 1α-hydroksylazy była niewykrywalna. Dane te są zgodne z hipotezą, że aktywna postać witaminy D nie wpływa bezpośrednio na CYP27B1, natomiast silnie stymuluje CYP24 i przez to maskuje aktywność CYP27B1 [47].

Inni autorzy badali komórki 16 różnych drobnokomórkowych raków płuc pod kątem zdolności do syntezy 1,25-(OH)₂D₃ z 25-OH-D₃. Komórki tylko jednej (NCI H82) spośród testowanych linii wykazały taką aktywność [58]. Ponadto, wykazano zwiększoną ekspresję CYP27B1 w komórkach tkanki nowotworowej pochodzącej od pacjentów chorych na raka płuc, w porównaniu ze zdrową tkanką płucną [78].

Przytoczone dane sugerują, że również w przypadku komórek niektórych nowotworów płuc można się spodzie-

wać regulacyjnego wpływu izoflawonoidów na ekspresję enzymów cytochromu P450, a tym samym na potencjalną aktywność witaminy D w terapii przeciwnowotworowej. Sama genisteina znana jest z wpływu *in vivo* na wzrost przeszczepialnych raków płuc [96,99,100], a w badaniach epidemiologicznych, w przypadku wyższego spożycia flawonoidów, wykazano niższą zapadalność ludzi na tego typu nowotwory [49]. Ponadto wykazano korzystny wpływ stosowania witaminy D, zarówno na przeżycie pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc we wczesnym stadium rozwoju [107,108], jak i na zapadalność na nowotwory płuc [36,37].

W przypadku białaczki promielocytarnej HL-60 także stwierdzono możliwość zwiększenia efektu terapeutycznego poprzez zastosowanie 1,25-(OH)₂D₃ lub jego analogów łącznie z genisteiną [88]. Kumagai i wsp. potwierdzili możliwość zwiększenia wrażliwości białaczek na 1,25-(OH)₂D₃ poprzez stosowanie związków o działaniu hamującym ekspresję CYP24, takich jak np. As₂O₃ [51].

PODSUMOWANIE

Udowodniono, że wiele typów nowotworów wykazuje ekspresję VDR oraz enzymów uczestniczących w metabolizmie 1,25-(OH)₂D₃. Prostą zależność między ekspresją VDR (obniżoną), a CYP24 (podwyższoną), enzymu degradującego 1,25-(OH)₂D₃ wykazano w komórkach raka jelita grubego i płuc w porównaniu z komórkami prawidłowymi [4]. Także w przypadku nowotworów gruczołu krokowego, wykazano niewrażliwość na działanie 1,25-(OH)₂D₃ komórek linii o zwiększonej ekspresji CYP24. W przypadku komórek raków piersi, wyniki badań nie są tak jednoznaczne. Jedni autorzy donoszą, iż ekspresja CYP24 jest podniesiona w nowotworach gruczołu piersiowego w stosunku do tkanek gruczołu prawidłowego [2]. Inni dowodzą, iż jest ona obniżona, podobnie jak ekspresja VDR [4]. Interesujące są natomiast obserwacje dotyczące komórek raka jajnika, w przypadku którego, ekspresja zarówno CYP24, jak i VDR jest podwyższona w stosunku do tkanki prawidłowej [4]. Aktywność enzymów szlaku metabolicznego witaminy D₃ wykryto także w komórkach czerniaków, raka szyjki macicy, glejaków, oraz nowotworów łożyska i skóry [26,27,78].

Działanie izoflawonoidów, uwrażliwiających komórki na 1,25-(OH)₂D₃, dotyczące nie tylko ich wpływu na ekspresję enzymów cytochromu P450, ale także bezpośredniego wpływu na receptor witaminy D, może być korzystne zarówno w prewencji, jak i w leczeniu chorych na nowotwory. Izoflawonoidy (podobnie jak inne inhibitory enzymów cytochromu P450 np. ketokonazol [57,70,71]) oddziałując hamująco na aktywność enzymu cytochromu P450, CYP24-24-hydroksylazy 25-hydroksywitaminy D₃, który degraduje hormon, a także jego prekursor: 25-OH-D₃ do nieaktywnych związków, mogą zwiększyć poziom aktywnej hormonalnie postaci witaminy D₃. Ponadto, działanie stymulujące izoflawonoidów na CYP27B1, enzym uczestniczący w syntezie 1,25-(OH)₂D₃, prowadzi do podobnego efektu (ryc. 1).

- [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] Albertson D.G., Ylstra B., Segraves R., Collins C., Dairkee S.H., Kowbel D., Kuo W.L., Gray J.W., Pinkel D.: Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat. Genet.*, 2000; 25: 144–146
- [3] Alhasan S.A., Aranha O., Sarkar F.H.: Genistein elicits pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 4174–4181
- [4] Anderson M.G., Nakane M., Ruan X., Kroeger P.E., Wu-Wong J.R.: Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2006; 57: 234–240
- [5] Asou H., Koike M., Elstner E., Cambell M., Le J., Uskokovic M.R., Kamada N., Koefler H.P.: 19-nor vitamin-D analogs: a new class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Blood*, 1998; 92: 2441–2449
- [6] Bareis P., Kallay E., Bischof M.G., Bises G., Hofer H., Potzi C., Manhardt T., Bland R., Cross H.S.: Clonal differences in expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase, of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase, and of the vitamin D receptor in human colon carcinoma cells: effects of epidermal growth factor and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Exp. Cell Res.*, 2002; 276: 320–327
- [7] Bikle D.D.: Vitamin D and skin cancer. *J. Nutr.*, 2004; 134: 3472S–3478S
- [8] Bises G., Bajna E., Manhardt T., Gerdenitsch W., Kallay E., Cross H.S.: Gender-specific modulation of markers for premalignancy by nutritional soy and calcium in the mouse colon. *J. Nutr.*, 2007; 137: 211S–215S
- [9] Bises G., Kallay E., Weiland T., Wrba F., Wenzl E., Bonner E., Kriwanek S., Obrist P., Cross H.S.: 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase expression in normal and malignant human colon. *J. Histochem. Cytochem.*, 2004; 52: 985–989
- [10] Blutt S.E., McDonnell T.J., Polek T.C., Weigel N.L.: Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*, 2000; 141: 10–17
- [11] Blutt S.E., Polek T.C., Stewart 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
- [12] Boscoe F.P., Schymura M.J.: Solar ultraviolet-B exposure and cancer incidence and mortality in the United States, 1993–2002. *BMC. Cancer*, 2006; 6: 264
- [13] Bostick R.M., Potter J.D., Sellers T.A., McKenzie D.R., Kushi L.H., Folsom A.R.: Relation of calcium, vitamin D, and dairy food intake to incidence of colon cancer among older women. The Iowa Women's Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1993; 137: 1302–1317
- [14] Bouillon R., Okamura W.H., Norman A.W.: Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.*, 1995; 16: 200–257
- [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 D₃. (24E)-(1S)-24-Dehydro-24a-homo-1,25-dihydroxyergocalciferol and congeners. *Steroids*, 2002; 67: 789–798
- [17] Cross H.S., Bajna E., Bises G., Genser D., Kallay E., Potzi R., Wenzl E., Wrba F., Roka R., Peterlik M.: Vitamin D receptor and cytokeratin expression may be progression indicators in human colon cancer. *Anticancer Res.*, 1996; 16: 2333–2337
- [18] Cross H.S., Bises G., Lechner D., Manhardt T., Kallay E.: The vitamin D endocrine system of the gut – its possible role in colorectal cancer prevention. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005; 97: 121–128
- [19] Cross H.S., Kallay E.: Nutritional regulation of extrarenal vitamin D hydroxylase expression – potential application in tumor prevention and therapy. *Future. Oncol.*, 2005; 1: 415–424
- [20] Cross H.S., Kallay E., Farhan H., Weiland T., Manhardt T.: Regulation of extrarenal vitamin D metabolism as a tool for colon and prostate cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.*, 2003; 164: 413–425
- [21] Cross H.S., Kallay E., Khorchide M., Lechner D.: Regulation of extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ relevance for colonic cancer prevention and therapy. *Mol. Aspects Med.*, 2003; 24: 459–465
- [22] Cross H.S., Kallay E., Lechner D., Gerdenitsch W., Adlercreutz H., Armbricht H.J.: Phytoestrogens and vitamin D metabolism: a new concept for the prevention and therapy of colorectal, prostate, and mammary carcinomas. *J. Nutr.*, 2004; 134: 1207S–1212S
- [23] Cross H.S., Lipkin M., Kallay E.: Nutrients regulate the colonic vitamin D system in mice: relevance for human colon malignancy. *J. Nutr.*, 2006; 136: 561–564
- [24] Cross H.S., Peterlik M., Reddy G.S., Schuster I.: Vitamin D metabolism in human colon adenocarcinoma-derived Caco-2 cells: expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase activity and regulation of side-chain metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1997; 62: 21–28
- [25] 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
- [26] Diesel B., Radermacher J., Bureik M., Bernhardt R., Seifert M., Reichrath J., Fischer U., Meese E.: Vitamin D₃ metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcitriol, and effect of calcitriol. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 5370–5380
- [27] Diesel B., Seifert M., Radermacher J., Fischer U., Tilgen W., Reichrath J., Meese E.: Towards a complete picture of splice variants of the gene for 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase in brain and skin cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004; 89–90: 527–532
- [28] Evans S.R., Shchepotin E.I., Young H., Rochon J., Uskokovic M., Shchepotin I.B.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthetic analogs inhibit spontaneous metastases in a 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis model. *Int. J. Oncol.*, 2000; 16: 1249–1254
- [29] Farhan H., Cross H.S.: Transcriptional inhibition of CYP24 by genistein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 973: 459–462
- [30] Farhan H., Wahala K., Adlercreutz H., Cross H.S.: Isoflavonoids inhibit catabolism of vitamin D in prostate cancer cells. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002; 777: 261–268
- [31] Farhan H., Wahala K., Cross H.S.: Genistein inhibits vitamin D hydroxylases CYP24 and CYP27B1 expression in prostate cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003; 84: 423–429
- [32] Garland C., Shekelle R.B., Barrett-Connor E., Criqui M.H., Rossoff A.H., Paul O.: Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. *Lancet*, 1985; 1: 307–309
- [33] Garland F.C., Garland C.F., Gorham E.D., Young J.F.: Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev. Med.*, 1990; 19: 614–622
- [34] Gaschott T., Werz O., Steinmeyer A., Steinhilber D., Stein J.: Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 288: 690–696
- [35] Gilad L.A., Tirosh O., Schwartz B.: Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. *J. Endocrinol.*, 2006; 191: 387–398
- [36] Grant W.B.: A meta-analysis of second cancers after a diagnosis of non-melanoma skin cancer: Additional evidence that solar ultraviolet-B irradiance reduces the risk of internal cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2007; 103: 668–674
- [37] Grant W.B., Garland C.F.: The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2687–2699
- [38] Gross M.D.: Vitamin D and calcium in the prevention of prostate and colon cancer: new approaches for the identification of needs. *J. Nutr.*, 2005; 135: 326–331
- [39] Haussler M.R., Haussler C.A., Jurutka P.W., Thompson P.D., Hsieh J.C., Remus L.S., Selznick S.H., Whitfield G.K.: The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J. Endocrinol.*, 1997; 154 Suppl: S57–S73
- [40] Hewison M., Zehnder D., Bland R., Stewart P.M.: 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J. Mol. Endocrinol.*, 2000; 25: 141–148
- [41] Horia E., Watkins B.A.: Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 809–815

- [42] Horn-Ross P.L., Hoggatt K.J., Lee M.M.: Phytoestrogens and thyroid cancer risk: the San Francisco Bay Area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002; 11: 43–49
- [43] Hunter D.J., Colditz G.A., Stampfer M.J., Rosner B., Willett W.C., Speizer F.E.: Diet and risk of basal cell carcinoma of the skin in a prospective cohort of women. *Ann. Epidemiol.*, 1992; 2: 231–239
- [44] Ingles S.A., Coetzee G.A., Ross R.K., Henderson B.E., Kolonel L.N., Crocitto L., Wang W., Haile R.W.: Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res.*, 1998; 58: 1620–1623
- [45] Ingles S.A., Ross R.K., Yu M.C., Irvine R.A., La P.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
- [46] John E.M., Schwartz G.G., Koo J., Van Den Berg D., Ingles S.A.: Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. *Cancer Res.*, 2005; 65: 5470–5479
- [47] Jones G., Ramshaw H., Zhang A., Cook R., Byford V., White J., Petkovich M.: Expression and activity of vitamin D-metabolizing cytochrome P450s (CYP1 α and CYP24) in human nonsmall cell lung carcinomas. *Endocrinology*, 1999; 140: 3303–3310
- [48] 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
- [49] Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Hellowaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A.: Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.*, 1997; 146: 223–230
- [50] Krishnan A.V., Moreno J., Nonn L., Malloy P., Swami S., Peng L., Peehl D.M., Feldman D.: Novel pathways that contribute to the anti-proliferative and chemopreventive activities of calcitriol in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2007; 103: 694–702
- [51] Kumagai T., Shih L.Y., Hughes S.V., Desmond J.C., O'Kelly J., Hewison M., Koeffler H. P.: 19-Nor-1,25(OH)₂D₂ (a novel, noncalcemic vitamin D analogue), combined with arsenic trioxide, has potent antitumor activity against myeloid leukemia. *Cancer Res.*, 2005; 65: 2488–2497
- [52] Lamprecht S.A., Lipkin M.: Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 601–614
- [53] Lechner D., Bajna E., Adlercreutz H., Cross H.S.: Genistein and 17 β -estradiol, but not equol, regulate vitamin D synthesis in human colon and breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2597–2603
- [54] Lechner D., Kallay E., Cross H.S.: Phytoestrogens and colorectal cancer prevention. *Vitam. Horm.*, 2005; 70: 169–198
- [55] Lee M.M., Gomez S.L., Chang J.S., Wey M., Wang R.T., Hsing A.W.: Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 665–668
- [56] Lowe L.C., Guy M., Mansi J.L., Peckitt C., Bliss J., Wilson R.G., Colston K.W.: Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur. J. Cancer*, 2005; 41: 1164–1169
- [57] Ly L.H., Zhao X.Y., Holloway L., Feldman D.: Liarozole acts synergistically with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ to inhibit growth of DU 145 human prostate cancer cells by blocking 24-hydroxylase activity. *Endocrinology*, 1999; 140: 2071–2076
- [58] Mawer E.B., Hayes M.E., Heys S.E., Davies M., White A., Stewart M.F., Smith G.N.: Constitutive synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by a human small cell lung cancer cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994; 79: 554–560
- [59] Messina M., Bennink M.: Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998; 12: 707–728
- [60] Miller G.J.: Vitamin D and prostate cancer: biologic interactions and clinical potentials. *Cancer Metastasis Rev.*, 1998; 17: 353–360
- [61] Miller G.J., Brawer M.K., Sakr W.A., Thrasher J.B., Townsend R.: Prostate cancer: serum and tissue markers. *Rev. Urol.*, 2001; 3(Suppl 2): S11–S19
- [62] Miller G.J., Stapleton G.E., Hedlund T.E., Moffat K.A.: Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in seven human prostatic carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 1995; 1: 997–1003
- [63] Moreno J., Krishnan A.V., Feldman D.: Molecular mechanisms mediating the anti-proliferative effects of Vitamin D in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005; 97: 31–36
- [64] Moreno J., Krishnan A.V., Peehl D.M., Feldman D.: Mechanisms of vitamin D-mediated growth inhibition in prostate cancer cells: inhibition of the prostaglandin pathway. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2525–2530
- [65] Moreno J., Krishnan A.V., Swami S., Nonn L., Peehl D.M., Feldman D.: Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2005; 65: 7917–7925
- [66] Nagata C., Takatsuka N., Kawakami N., Shimizu H.: A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. *Br. J. Cancer*, 2002; 87: 31–36
- [67] 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
- [68] Ozono K., Sone T., Pike J.W.: The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Bone Miner. Res.*, 1991; 6: 1021–1027
- [69] Palmer H.G., Gonzalez-Sancho J.M., Espada J., Berciano M.T., Puig I., Baulida J., Quintanilla M., Cano A., de Herrerros A.G., Lafarga M., Munoz A.: Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol.*, 2001; 154: 369–387
- [70] Peehl D.M., Seto E., Feldman D.: Rationale for combination ketoconazole/vitamin D treatment of prostate cancer. *Urology*, 2001; 58: 123–126
- [71] Peehl D.M., Seto E., Hsu J.Y., Feldman D.: Preclinical activity of ketoconazole in combination with calcitriol or the vitamin D analogue EB 1089 in prostate cancer cells. *J. Urol.*, 2002; 168: 1583–1588
- [72] Peeters P.H., Keinan-Boker L., van der Schouw Y.T., Grobbee D.E.: Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003; 77: 171–183
- [73] Peeters P.H., Keinan-Boker L., van der Schouw Y.T., Grobbee D.E.: Phytoestrogens and breast cancer risk: review of the epidemiological evidence. *IARC Sci. Publ.*, 2002; 156: 331–336
- [74] Polek T.C., Murthy S., Blutt S.E., Boehm M.F., Zou A., Weigel N.L., Allegretto E.A.: Novel nonsteroidal vitamin D receptor modulator inhibits the growth of LNCaP xenograft tumors in athymic mice without increased serum calcium. *Prostate*, 2001; 49: 224–233
- [75] Polek T.C., Stewart L.V., Ryu E.J., Cohen M.B., Allegretto E.A., Weigel N.L.: p53 is required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced G0 arrest but is not required for G1 accumulation or apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Endocrinology*, 2003; 144: 50–60
- [76] Polek T.C., Weigel N.L.: Vitamin D and prostate cancer. *J. Androl.*, 2002; 23: 9–17
- [77] Prosser D.E., Jones G.: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.*, 2004; 29: 664–673
- [78] Radermacher J., Diesel B., Seifert M., Tilgen W., Reichrath J., Fischer U., Meese E.: Expression analysis of CYP27B1 in tumor biopsies and cell cultures. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2683–2686
- [79] Radzikowski C., Wietrzyk J., Gryniewicz G., Opolski A.: Genistein: a soy isoflavone revealing a pleiotropic mechanism of action – clinical implications in the treatment and prevention of cancer. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2004; 58: 128–139
- [80] Rao A., Coan A., Welsh J.E., Barclay W.W., Koumenis C., Cramer S.D.: Vitamin D receptor and p21/WAF1 are targets of genistein and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2143–2147
- [81] Rao A., Woodruff R.D., Wade W.N., Kute T.E., Cramer S.D.: Genistein and vitamin D synergistically inhibit human prostatic epithelial cell growth. *J. Nutr.*, 2002; 132: 3191–3194
- [82] 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
- [83] Saramaki A., Banwell C.M., Campbell M.J., Carlberg C.: Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D₃ receptor. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: 543–554
- [84] Setchell K.D., Brown N.M., Desai P., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashers W.T., Kirschner A.S., Cassidy A., Heubi J.E.: Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.*, 2001; 131: 1362S–1375S
- [85] Setchell K.D., Brown N.M., Lydeking-Olsen E.: The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.*, 2002; 132: 3577–3584

- [86] Setchell K.D., Faughnan M.S., Avades T., Zimmer-Nechemias L., Brown N.M., Wolfe B.E., Brashear W.T., Desai P., Oldfield M.F., Botting N.P., Cassidy A.: Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77: 411–419
- [87] Shen J.C., Klein R.D., Wei Q., Guan Y., Contois J.H., Wang T.T., Chang S., Hursting S.D.: Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) cell-cycle arrest in human prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 2000; 29: 92–102
- [88] 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
- [89] Spina C., Tangpricha V., Yao M., Zhou W., Wolfe M.M., Maehr H., Uskokovic M., Adorini L., Holick M.F.: Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005; 97: 111–120
- [90] Spina C.S., Tangpricha V., Uskokovic M., Adorini L., Maehr H., Holick M.F.: Vitamin D and cancer. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2515–2524
- [91] Swami S., Krishnan A.V., Moreno J., Bhattacharyya R.B., Peehl D.M., Feldman D.: Calcitriol and genistein actions to inhibit the prostaglandin pathway: potential combination therapy to treat prostate cancer. *J. Nutr.*, 2007; 137: 205S–210S
- [92] Swami S., Krishnan A.V., Peehl D.M., Feldman D.: Genistein potentiates the growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in DU145 human prostate cancer cells: role of the direct inhibition of CYP24 enzyme activity. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2005; 241: 49–61
- [93] Tong M., Tai H.H.: Induction of NAD(+)-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression by androgens in human prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 276: 77–81
- [94] Welsh J., Wietzke J.A., Zinser G.M., Byrne B., Smith K., Narvaez C.J.: Vitamin D₃ receptor as a target for breast cancer prevention. *J. Nutr.*, 2003; 133: 2425S–2433S
- [95] Welsh J., Wietzke J.A., Zinser G.M., Smyczek S., Romu S., Tribble E., Welsh J.C., Byrne B., Narvaez C.J.: Impact of the Vitamin D₃ receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2002; 83: 85–92
- [96] Wietrzyk J., Boratynski J., Gryniewicz G., Ryczynski A., Radzikowski C., Opolski A.: Antiangiogenic and antitumour effects *in vivo* of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 3893–3896
- [97] Wietrzyk J., Gryniewicz G., Opolski A.: Phytoestrogens in cancer prevention and therapy – mechanisms of their biological activity. *Anticancer Res.*, 2005; 25: 2357–2366
- [98] Wietrzyk J., Mazurkiewicz M., Madej J., Dzimira S., Gryniewicz G., Radzikowski C., Opolski A.: Genistein alone or combined with cyclophosphamide may stimulate 16/C transplantable mouse mammary cancer growth. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 10(11): BR414–BR419
- [99] Wietrzyk J., Opolski A., Madej J., Radzikowski C.: Antitumour and antimetastatic effect of genistein alone or combined with cyclophosphamide in mice transplanted with various tumours depends on the route of tumour transplantation. *In Vivo*, 2000; 14: 357–362
- [100] Wietrzyk J., Opolski A., Madej J., Radzikowski C.: The antitumor effect of postoperative treatment with genistein alone or combined with cyclophosphamide in mice bearing transplantable tumors. *Acta Pol. Pharm.*, 2000; 57(Suppl): 5–8
- [101] 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
- [102] Wietzke J.A., Ward E.C., Schneider J., Welsh J.: Regulation of the human vitamin D₃ receptor promoter in breast cancer cells is mediated through Sp1 sites. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2005; 230: 59–68
- [103] 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
- [104] Wong H.L., Seow A., Arakawa K., Lee H.P., Yu M.C., Ingles S.A.: Vitamin D receptor start codon polymorphism and colorectal cancer risk: effect modification by dietary calcium and fat in Singapore Chinese. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 1091–1095
- [105] Zehnder D., Bland R., Williams M.C., McNinch R.W., Howie A.J., Stewart P.M., Hewison M.: Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 888–894
- [106] Zhou J.Y., Norman A.W., Akashi M., Chen D.L., Uskokovic M.R., Aurrecochea J.M., Dauben W.G., Okamura W.H., Koeffler H.P.: Development of a novel 1,25(OH)₂-vitamin D₃ analog with potent ability to induce HL-60 cell differentiation without modulating calcium metabolism. *Blood*, 1991; 78: 75–82
- [107] Zhou W., Heist R.S., Liu G., Asomaning K., Neuberger D.S., Hollis B.W., Wain J.C., Lynch T.J., Giovannucci E., Su L., Christiani D.C.: Circulating 25-hydroxyvitamin D levels predict survival in early-stage non-small-cell lung cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 479–485
- [108] Zhou W., Heist R.S., Liu G., Neuberger D.S., Asomaning K., Su L., Wain J.C., Lynch T.J., Giovannucci E., Christiani D.C.: Polymorphisms of vitamin d receptor and survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006; 15: 2239–2245
- [109] Zhuang S.H., Burnstein K.L.: Antiproliferative effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in human prostate cancer cell line LNCaP involves reduction of cyclin-dependent kinase 2 activity and persistent G1 accumulation. *Endocrinology*, 1998; 139: 1197–1207