

# HORMONÁLNÍ SYSTÉM VITAMINU D3 A ONKOLOGIE

## ONCOLOGY AND THE VITAMIN D<sub>3</sub> HORMONAL SYSTEM

LANG B. A.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**Souhrn:** V poslední době se zvýšil zájem o některé deriváty vitamínu D<sub>3</sub> v souvislosti s možným léčebným využitím také v onkologii. Smyslem tohoto velmi stručného přehledu je přiblížit klinickým onkologům současné poznatky a pracovní představy o funkci tohoto zajímavého systému v cílové buňce normální i transformované. Přeměna vitamínu D<sub>3</sub> v základní hormonální derivát - 1,25dihydroxycholecalciferol -, jeho transport v krevním řečišti a jeho vstup do cílové buňky i popis specifického nitrobuňčného receptoru, který jako Golem jej přijme a sám se tím stane molekulárně biologicky aktivní - to vše je předmětem části první, úvodní.

Část druhá shrnuje některé základní publikované informace o funkcích a způsobu působení dihydroxycholecalciferolu a jeho receptoru v buňkách cílových tkání a o poměrech v nádorových tkáních těch orgánů, kterým zatím výzkum věnuje největší pozornost tj. malignit krevtvorby a nádorů mléčné žlázy. Tato druhá část je pouhým úvodem do problematiky onkologické kapitoly molekulové biologie systému vitamínu D<sub>3</sub> a jeho přirozených i synteticky připravených derivátů. Měl by sloužit k úvahám o nových možnostech nádorové terapie, doufáme mnohem účelnější a výhodnější než současná chemoterapie.

**Klíčová slova:** Vitamin D<sub>3</sub>, serová vazebná bílkovina vitamínu D<sub>3</sub>, receptor vitamínu D<sub>3</sub>, leukemie, rakovina prsu.

**Summary:** Several derivatives of Vitamin D<sub>3</sub> have recently attracted attention in relation with their possible curative use in oncology. The purpose of the present brief outline is to inform clinical oncologists of the latest findings and preliminary hypotheses on the function of this very interesting system in normal as well as transformed target cells. The first introductory part describes the transformation of Vitamin D<sub>3</sub> into its basic hormonal derivative (1,25 dihydroxycholecalciferol), its transport in the blood bed and entry into the target cell. It also describes the specific intracellular receptor which, upon receiving the derivative, becomes biologically active on the molecular level. Part Two is a summary of basic literary data on the functions of the dihydroxycholecalciferol system, the mechanics of its action, cellular receptors in target tissues and the situation in tumour tissues of the organs which have so far been in the centre of research activities.

**Key words:** Vitamin D<sub>3</sub>, vitamin D serum binding protein (DBP), vitamin D receptor (VDR), malignancy, review.

### ČÁST I.

#### Úvod

Téměř každým rokem získáváme informace, které podstatně rozšiřují a doplňují naši představu o působení steroidních a sekosteroidních hormonů v cílové buňce. Obecně lze říci, že k základním dějům jejich působení patří především vyvolání změn terciární ev. kvarterní struktury specifického bílkovinného nitrobuňčného receptoru, jako je např. jeho fosforylace, dimerizace, uvolnění se z většího komplexu s HSP-90 (bílkoviny tepelného šoku o m.h.90 kDa). Tím dochází i ke změnám v interakcích receptoru s některými buněčnými komponentami jako jsou např. DNA, RNA nebo jaderné bílkoviny. Všechny změny receptoru přispívají konec konců k tomu, aby se tato bílkovina v nové trojrozměrné podobě stala kompetentní pro ovlivnění přepisu (transkripce) řady specifických cílových „pivotních“ genů a tím navodila novou funkční situaci (v proliferaci, diferenciaci nebo směrem k apoptóze) dané buňky.

Jsou však známy i časně důsledky působení steroidních látek, o kterých nejsme přesvědčeni, že by mohly být přímo závislé na příslušných receptorech. Patří k nim např. změny membránového potenciálu a aktivity fosfolipasy A<sub>2</sub>. To však nebude předmětem našich úvah.

#### 1. 1 $\alpha$ ,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL (1,25 D<sub>3</sub>) A JINÉ DERIVÁTY VITAMINU D<sub>3</sub>

1,25D<sub>3</sub> je bioaktivní forma vitamínu D<sub>3</sub> hormonálního typu, která má velkou paletu biologických účinků na normální i patologic-

kou buňku<sup>(1)</sup>. Především je dobře znám jeho význam v metabolismu minerálů a kostní tkáně. V osmdesátých letech byla však pro tuto látku postupně potvrzena širší biologická úloha, kterou jsme předtím jenom tušili a předpokládali ze skutečnosti, že jeho receptory (VDR) jsou přítomny i ve tkáních, o kterých bezpečně víme, že nehrají v minerálním metabolismu významnou úlohu. Ukazuje se, že 1,25D<sub>3</sub> je mimo jiné i hormon imunoregulační a důležitý faktor diferenciacie.

Masumoto a spol. <sup>(2)</sup> prokázali v roce 1988, že vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) je hydroxylován v jaterních buňkách mitochondriálním enzymem 25-hydroxylázou (cytochromem P-450) na 25(OH)cholecalciferol (25 D<sub>3</sub>), který je předáván do krevního řečiště. Jeho hladina v krvi je u starších lidí často nižší než u mladé populace, pravděpodobně v důsledku menší expozice jejich kůže slunečním paprskům a horšímu vstřebávání vitamínu D<sub>3</sub> z potravy ve střevě. Ve tkáni ledvin se 25 D<sub>3</sub> dále oxyduje na uhlíku C1 a vzniká vlastní hormonálně účinný 1,25D<sub>3</sub>. Také sérová koncentrace 1,25D<sub>3</sub> se s věkem snižuje, snad i v důsledku snižující se aktivity 1-hydroxylázy v ledvinách. Hladina sérového 1,25D<sub>3</sub> má tendenci k nižším

Hlavní použité zkratky: 1,25D<sub>3</sub> = 1,25-dihydroxycholecalciferol; syn. calcitriol  
VDR = receptor vitamínu D<sub>3</sub>  
VDR\* = aktivovaný receptor = transkripční faktor  
VDRE = element odpovědi vitamínu D<sub>3</sub>  
RA = retinová kyselina  
atRA = all - trans - retinová kyselina  
RAR = receptor retinové kyseliny  
RXR = receptor all - trans - retinové kyseliny

## OPRAVA

V 1. čísle tohoto ročníku došlo v článku Hormonální systém vitamínu D3 a onkologie (str. 12–21) k politováníhodné technické chybě v číslování literatury k II. části článku. Prosíme proto čtenáře, aby laskavě od čísla citace v textu II. části odečetli 2, a tak získali správné číslo citace v seznamu literatury II. části. Tak např. citace č. 3 v textu II. části má č. 1 v seznamu. Redakce se za toto nedopatření omlouvá.

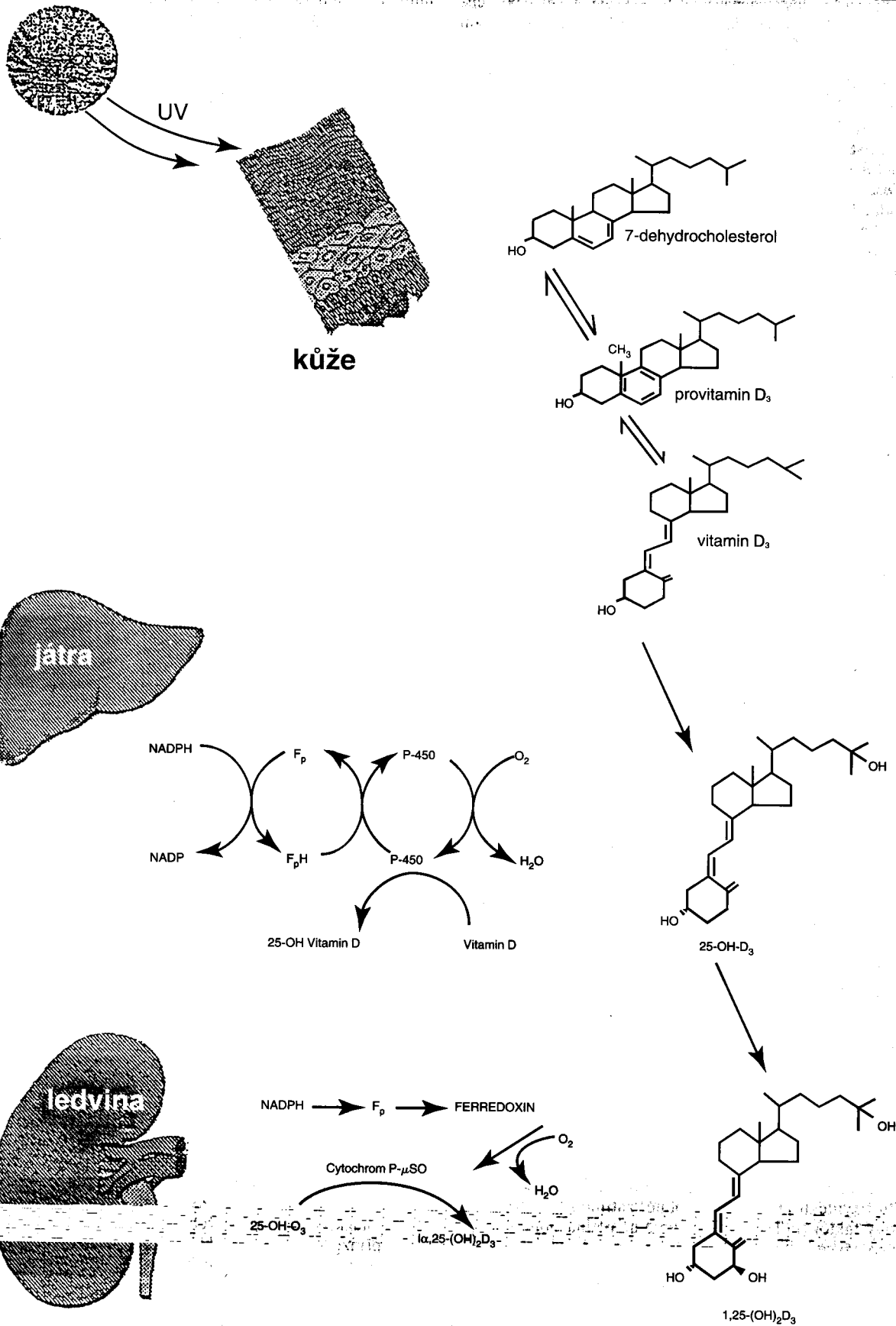


SCHÉMA 1  
Přeměna vitamínu D<sub>3</sub> v hormonálně účinný derivát. Podrobnosti v textu.

hodnotám u žen postmenopauzálních a zvyšuje se u nich po léčbě estradiolem. Z ledvin putuje pak 1,25D3 krevní cestou k buňkám cílových orgánů. (SCHEMA 1).

## 2. TRANSPORTNÍ PLASMATICKÁ VAZEBNÁ BÍLKOVINA VITAMINU D3 A JEHO DERIVÁTU

Transport vitamínu D3 i jeho hormonálních derivátů v krevním řečišti zajišťuje specifická transportní bílkovina - **plasmatická vazebná bílkovina vitamínu D3 (DBP - vitamin D binding protein)** (3). Historie jejího objevu je zajímavá. Původně byla zjištěna při identifikaci skladby alfa-2 globulinů lidského séra v roce 1959 Hirschfeldem jako bohatá skupinově specifická složka a nazývána prostě Gc (*group-specific component*) (4). Velmi brzy se stala předmětem velké pozornosti hlavně proto, že se vyznačovala výrazným polymorfismem geneticky podmíněným a představovala tak výhodný marker pro genetické studie. Vedle většího počtu neobvyklých a vzácně se vyskytujících izoform této bílkoviny byly zjištěny 3 základní fenotypy: Gc 1-1, Gc 2-1 a Gc 2-2, které se vyskytovaly v různé kolísajícím poměru po celém světě. Zdálo se, že jsou důsledkem existence dvou autozomálních alel na jedním lokusu. Dnes víme, že existují 3 nejrozšířenější alely - Gc1S, Gc1F a Gc2, které kodují celkem 5 izoform: každá z Gc1 alel koduje dvě a Gc2 jednu (5, 6). V roce 1975, byla prokázána bezpečně identita mezi Gc-bílkovinou a DBP (7, 8). Syntéza DBP (Gc) probíhá výlučně v jaterních buňkách (9). Bílkovinu tvoří jediný, teplotně velmi stálý, polypeptidový řetězec o molekulární hmotnosti přibližně 52-58 KDa. Pro vazebnou funkčnost bílkoviny je rozhodující její terciární struktura zajišťovaná především specifickým počtem disulfidických můstků, potřebných k vytvoření prostorových útvarů jak pro vazebné místo ligandu tak i pro antigenní determinantu nebo determinanty protilátky (10). Sekvence 41 N-koncových aminokyselin u všech tří hlavních forem DBP je shodná. Počítačovou analýzou byla tato sekvence shledána příbuznou se sekvencemi lidského sérového pre-proalbuminu a pre- $\alpha$ -fetoproteinu, což je další podpora hypotézy, že 3 hlavní plasmatické multitransportní bílkoviny - DBP, albumin a  $\alpha$ -fetoprotein - pocházejí ze stejné ancestrální bílkoviny (11).

300 - 600  $\mu\text{g/l}$  lze považovat v lidském séru za fyziologickou hladinu, během těhotenství dochází k vzestupu hladiny. Orální kontraceptiva (estrogen-progestageny) zvyšují u mladých žen jak hladinu DBP tak i 1,25D3, koncentrace 25D3 však zůstává beze změn (12).

Dominantní funkcí DBP je vazba (a tím dočasná inaktivace) vitamínu D3 i jeho hormonálních derivátů a jejich transport krví k cílovým buňkám. Další schopností této bílkoviny je depolymerizace aktinu a vytváření komplexu DBP-aktin-DNÁza (deoxyribonukleáza I). Funkčnost a smysl těchto mezibílkovinných vazeb není zatím zcela objasněn. Připomíná to interakci hemoglobin-haptoglobin nebo vazebné bílkoviny retinolu s prealbuminem (13).

Experimentálně na kultuře hepatocytů (Hep 3B) byly zjištěny v roce 1995 první informace o mechanismech regulujících tvorbu a tedy i cirkulující hladinu lidské DBP. Američtí autoři (14) měřili syntézu DBP(Gc)mRNA a množství sekretované bílkoviny po působení cytokinů a hormonů. Vybrali také, o kterých se ví, že ovlivňují syntézu jiných bílkovin jaterního původu. Zjistili, že interleukin 6 (IL-6) a dexametazon zvyšují syntézu DBP dvojnásobně, zatímco transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ji snižuje až pětinašobně v závislosti na dávce.

## 3. VSTUP 1,25D3 DO CÍLOVÉ BUŇKY

První informace o vstupu 1,25D3 do buňky máme z pokusů *in vitro*, a to většinou na kulturách linií maligních buněk (15, 16). Skutečné fyziologické poměry *in vivo* budou asi jiné. Je nutno brát v úvahu transportní komplex 1,25D3:DBP. Obecně

nutno říct, že naše představy o tom, jak se steroidní a thyroïdní hormony dostávají do cílových buněk, jsou zatím stále nepřesné a neúplné. Máme k dispozici dva funkční modely. První, který bývá označován jako „nutrient typ“ (17), předpokládá na buněčné membráně cílové buňky specifický receptor pro komplex transportní bílkoviny (v našem případě DBP) a hormonu (1,25D3). Po navázání tohoto holoproteinu dochází pomocí endocytózy k internalizaci ligandu, která může a nemusí být spojena s destrukcí transportního nosiče. Obvykle ale dochází k recyklaci receptoru membránového. Důkazem oprávněnosti této představy jsou výsledky pozorování endocytózy serum albuminu,  $\alpha$ -fetoproteinu i DBP u lidských laktinem stimulovaných T-lymfocytů (18). V tomto případě DBP, značené peroxidázou z křenu, byla v malém množství internalizována nepovlečenými vezikuly, endozomy a byla směřována do multivezikulárních tělísek a nakonec do lysozomů.

Druhá možnost, označovaná jako typ „hormonální“, spočívá v představě, že nedochází k interakci transportní bílkoviny s membránovým receptorem, ale že se v těsné blízkosti buněčného povrchu cílové buňky vlivem specifických podmínek tkáňové tekutiny ligand z nosiče uvolňuje a prochází membránou (17, 15). V osmdesátých letech tato představa převažovala pod vlivem zkušeností s estrogény.

Jsou ovšem možné ještě další úvahy. Například není vyloučená ani možnost, že existují specifické buňky se schopností membránově vázat transportní holoproteiny a tím vytvářet vysoké koncentrace uvolněných ligandů pro potřebu sousedních buněk určitého typu. Internalizace apoproteinu by pak mohla být mechanismem likvidace nosiče. Existence specifických membránových receptorů pro komplex DBP:1,25D3 na povrchu T a B lymfocytů (19, 20) není zatím s definitivní platností prokázána (17, 18).

## 4. RECEPTOR $1\alpha,25$ -DIHYDROXYCHOLEKALCIFEROLU (VDR) - STRUKTURA JEHO GENU A VLASTNÍ BÍLKOVINY

Jak již několikrát bylo řečeno, VDR je **nitrobuněčná receptorová bílkovina**, umožňující biologické působení hormonu 1,25D3 v cílové buňce. Je zde přítomna ve velmi nepatrné koncentraci - přibližně 0,001% z celkových bílkovin buňky. Po navázání 1,25D3 získává tato bílkovina způsobem, který částečně popíšeme později, novou schopnost - schopnost v prostoru buněčného jádra ovlivnit jako transkripční faktor specifická místa na chromatinu a přivodit tak zahájení přepisu (transkripci) specifických genů (21, 22). Produkce nových buněčných bílkovinných komponent, převážně enzymového typu, vytvoří podmínky pro spuštění odlišného programu molekulové biologie cílové buňky především ve směru další její diferenciace. Z hlediska fyziologie organismu tyto nové genové produkty ovlivňují především transport vápníku ve střevě, reabsorpci tohoto minerálu v ledvinách a metabolismus vápníku v kostech a mléčné žláze.

Od roku 1969 se snažila řada laboratoří pomocí iontoměničových technik a gelové filtrace, včetně chromatografie na sloupci s imobilizovanou DNA, izolovat a přečistit VDR nejčastěji z buněk mukózy střeva kuřete. Během těchto pokusů bylo nutno překonat dvě velké obtíže: relativně nízkou koncentraci těchto receptorových bílkovin na jednu buňku a vysoký stupeň jejich biochemické lability. Dlouhou dobu zůstával otevřenou otázkou vliv buněčných proteáz na velikost molekuly VDR při izolaci.

Identifikace nitrobuněčných vazebných bílkovin 1,25D3 se podstatně zlepšila v době, kdy byla připravena monoklonální protilátka (9A7gamma) proti kuřecímu VDR (23, 24). Koncem osmdesátých let se tak podařilo vyizolovat a přečistit dostatečné množství bílkoviny VDR z ptáčích tkání (1987) (25, 26) a později i z tkání krysů a lidské (1988) (27, 28, 29). Kombinací

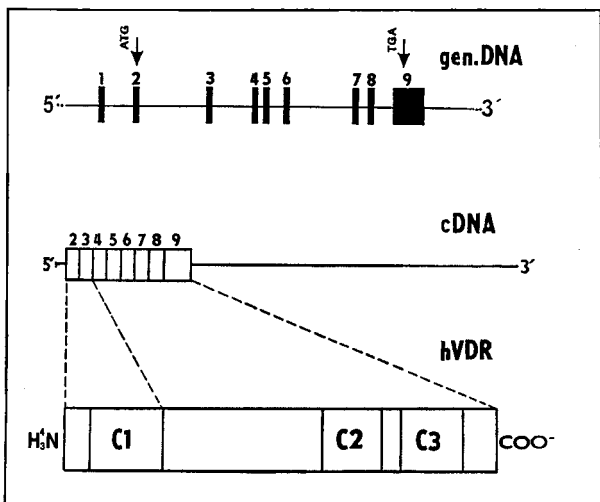


SCHÉMA 2  
Obecné schéma bílkoviny a genu VDR. Funkční oblasti bílkoviny: C1 – vazebná oblast pro DNA C2 a C3 – vazebná oblast pro hormon, pro heterodimerizaci a oblast pro transkripční aktivitu.

experimentálního využití radioaktivně značeného 1,25D<sub>3</sub>, monoklonálních protilátek proti VDR a testů vazby VDR na DNA, denaturace a selektivního proteolytického štěpení VDR byly získány první a základní informace. Týkají se nejen primární struktury receptorové bílkoviny, ale i rozmístění vazebných míst pro 1,25D<sub>3</sub> a DNA i lokalizace centra imunologické aktivity VDR (vazebného místa pro specifickou protilátku).

#### Struktura lidského *dr* genu a lidské VDR bílkoviny (hVDR).

**Struktura lidského genu pro VDR.** Baker a spol. v roce 1988 (27) stanovili sekvenci kompletní cDNA hVDR izolované z „genové knihovny“ buněk lidského střeva a nádorové buněčné linie rakoviny prsu T47D. cDNA se skládá ze 4605 bp (base pair): za vedoucí nepřekládanou částí sekvence o 115 bp následuje úsek 1281 bp kodující vlastní bílkovinu VDR. Plných 3209 bp představuje tedy zbytek sekvence nekódující bílkovinný pro-

dukt, která na 3'-konci cDNA ukončuje (SCHÉMA 2). Důkaz o věrohodnosti této klonované cDNA pro hVDR byl podán její expresí po vpravení (transfekci) do buněk COS-1, které fyziologicky VDR neexprimují: Jediná následně syntetizovaná bílkovina je nerozeznatelná od nativního receptoru hVDR, protože má identické obě fyzikální vlastnosti (sedimentační konstantu v sacharózovém gradientu - 3.2S a charakteristický posun na 7S po navázání protilátky) i identickou afinitu pro 1,25D<sub>3</sub> a jiné deriváty vitamínu D<sub>3</sub> (27).

**Struktura bílkoviny hVDR.** Primární struktura hVDR je tedy známa od roku 1988 (SCHÉMA 2). Srovnání této sekvence s primární strukturou jiných receptorů steroidních hormonů jasně ukazuje na příslušnost k této rodině jaderných transkripčních faktorů přítomností společných charakteristických znaků. Podrobnější analýza především sekvence vazebné oblasti DNA (C1) prokázala, že strukturální podobnost odpovídá spíše podskupině této rodiny, kam řadíme receptor hormonu štítné žlázy a receptor retinoidů. Téměř 50% homologie v této oblasti bohaté na cystein, lysin a arginin, o které soudíme, že slouží nejen k vazbě DNA, ale přispívá i k transkripční aktivitě, je nápadná. Z analogie se známými strukturami jiných transkripčních faktorů předpokládáme, že tato oblast má schopnost vytvářet tzv. prostorové „Zn<sup>2+</sup>-prsty“ vhodné právě pro vazbu s DNA strukturou.

Další vazebná oblast, s podstatně menší homologií, označovaná C2, leží směrem k C-koncové části molekuly VDR a je od DNA-vazebné domény oddělena úsekem asi 150 aminokyselin bez homologie s jinými receptory této rodiny transkripčních faktorů. C2 oblastí začíná část molekuly, která představuje vazebné místo pro hormonální ligand. Sem patří i další velmi specifická doména C3. Rozložení funkčních domén odpovídá tedy obecnému schématu jak jej navrhl Beato (21). Existující druhové rozdíly ve složení vazebných míst v peptidovém řetězci VDR. Je to zřejmé nejen tam, kde známe primární strukturu tohoto receptoru, ale např. i imunologická reaktivita VDR buněk rozdílných zvířecích druhů vůči monoklonálním i polyklonálním protilátkám proti kuřecímu VDR vykazuje kvalitativní rozdíly. Na druhé straně však vysoká homologie, základní společné vlastnosti a rysy u všech dosud izolovaných VDR z různých zvířecích zdrojů jsou důkazem evolučně starobylé molekuly.

## ČÁST II.

### 1. ÚVOD DO FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY PŮSOBNÍ DELTANOIDŮ V CÍLOVÝCH TKÁNÍCH

Již v úvodu k první části tohoto přehledu jsem se zmínil o tom, že velká část biologické odpovědi hormonální dihydroxylované formy vitamínu D<sub>3</sub> je umožněna její vazbou na nitro-buněčný receptor, který se tak „aktivuje“<sup>2</sup>. Aktivní komplex VDR\* se uvolní z dosavadních vazeb s jinými cytosolovými bílkovinami buňky a zaujme nový prostorový tvar vhodný pro jeho vlastní biologickou funkci - **funkci jaderného transkripčního faktoru**. Ten je schopný navázat se v buněčném jádře na specifické úseky sekvencí DNA. Specifické sekvence nazýváme *elementy odpovědi* - RE (podle anglického response element). Leží obecně v nepřekládané části cílových genů. U 1,25D<sub>3</sub> není zatím úplně jasné, zda se na elementy odpovědi vitamínu D<sub>3</sub> (VDRE) váže jen již aktivovaný VDR\* nebo zda je možná i vazba neaktivovaného VDR s dodatečnou aktivací navázáním hormonu. Nejvíce prostudovaným je zatím VDRE na genu lidského osteokalcinu.

#### 1.1 Regulace transkripce a spolupráce s jinými transkripčními faktory.

**VDR a alfa-receptor retinoidu X.** Pro VDR\* identifikovali Carlberg a spol.<sup>3</sup> dvě třídy VDRE. Jedna třída je aktivována v přítomnosti pouze VDR\* asi ve formě homodimeru, druhá pak heterodimerem složeným z VDR\* a z aktivovaného alfa-receptoru retinoidu X (RXR-alfa\*). Výsledky studií posledních roků v tomto směru podporují představu, že RXR-alfa přispívá specifickým způsobem k transkripční aktivitě heterodimeru a tato vlastnost by mohla být regulována kyselinou 9-*c*-retinovou. Obecně se zdá, že RE jsou schopny rozlišovat mezi různými dimery, což asi platí nejen pro deriváty vitamínu D, ale i pro jiné steroidní hormony. To by ovšem znamenalo, že kombinatorická komplexita signálních cest steroidních hormonů je větší než jsme předpokládali<sup>4</sup>.

**VDR a c-MYC.** Dřívější nálezy ze studií exprese VDR u aktivovaných T- a B-lymfocytů, spolu s nálezy ze studií exprese c-myc protoonkogenu u těchto buněk, inspirovaly skupinu

amerických a anglických badatelů vedených S.C. Manolagsem<sup>5</sup> k představě určité souvislosti mezi těmito dvěma jevy. Ověřovali ji na eukaryotických buňkách jiného typu. Srovnali dvě buněčné linie kryšího osteogenního sarkomu. Linie exprimující konstitutivně relativně vysoké hladiny VDR exprimovala také mRNA pro c-MYC. Linie, ve které nebylo možno detegovat VDR, neexprimovala tuto mRNA. Autoři ověřili ještě tuto skutečnost na myších kožních fibroblastech po transfekci rekombinantního plasmidu obsahujícího lidský c-myc onkogen. Můžeme tedy předpokládat, že jistá asociace mezi expresí c-myc mRNA a expresí receptorové bílkoviny pro biologicky účinný derivát vitamínu D3 skutečně existuje.

## 1.2 Dosud zjištěné exprese cílových genů.

### Syntézy bílkovin řízené transkripčním faktorem VDR

Největšímu zájmu v oblasti výzkumu funkční charakteristiky působení vitamínu D3 se těší dvě bílkoviny se specifickou schopností vazby vápníku a dvě bílkoviny kostní tkáně.

### Vazebné bílkoviny vápníku (CaBP) závislé na vitamínu D3.

Vápník a magnesium - dva dvojmocné prvky tvoří v buňkách zvláštní systém, rozhodující o akutním zapojování a vypínání řady signalizačních a život buněk významně ovlivňujících metabolických cest. Jejich koncentrace v buňce je přísně střežena kontrolními mechanismy a systémem pojistek. Jednou z nich jsou na př. v buněčných membránách vápníkové „přechody“, kanálky. Jinou důležitou regulační součástí tohoto systému jsou specifické bílkoviny, které váží a tím inaktivují vápníkový jonť. Vytvářejí se tak zásobárny, z nichž je možno tento signalizační a strategický prvek opět uvolnit, a rozehrát tak novou molekulárně biologickou partii.

Dosud izolované a do značné míry mnohé i biochemicky charakterizované CaBP lze dnes rozdělit do dvou základních kategorií: na závislé a nezávislé na vitamínu D3. Závislost spočívá v tom, že k zahájení syntézy těchto CaBP je potřebná přítomnost transkripčního faktoru ve formě biologicky účinného VDR\*. V roce 1966 poprvé popsali Wasserman a Taylor existenci takové bílkoviny v buňkách sliznice tenkého střeva u rachitického kuřete po podání vitamínu D3<sup>6</sup>. Pochod aktivace genu pro CaBP se odehrává, jak se domníváme, stejně jako u produktů specifických genů ostatních steroidních hormonů.

Do rodiny CaBP závislých na 1,25D3 zařazujeme v současné době více produktů genů, které jsou ve své expresi nebo její modulaci závislé na metabolitech vitamínu D3. O dvou z nich máme již řadu důležitých informací. Jsou to 2 formy tzv. calbindinů, izolovaných ze střevních, ledvinových nebo nervových buněk, jejichž izoformy byly prokázány v řadě dalších tkání:

1. *Calbindin - D9k (CaBP-D9k, iCaBP)*. Nejvíce prostudována je forma vyskytující se v buňkách tenkého střeva - calbindin-D9k. Tato intestinální forma byla však zjištěna i v buňkách jiných orgánů: uteru, placenty a ledvin. Hraje klíčovou roli při vstřebávání vápníku z potravy. Koncentrace této bílkoviny v buňkách tenkého střeva koreluje s aktivním transcelulárním transportem vápníku. Jejím úkolem je pufovat nadměrná množství aktivně přijímaného Ca<sup>2+</sup>, který by se jinak stal pro střevní buňku zničujícím elementem. Dále zvyšuje transcelulární difúzi vápníku a podporuje rychlost jeho vylučování příslušnou „pumpou“ v bazolaterální membráně buňky.

2. *Calbindin-D28K (CaBP-D28K)*. U savců (na rozdíl od ptáků) nebyl calbindin o m.h. 28 kDa nalezen v tenkém střevě, ale v ledvinách, v mozku a přinejmenším ve třech senzoričních systémech (v bulbus olfaktorický, ve vnitřním uchu a sítnici)<sup>7</sup>. Známe jeho primární strukturu<sup>8,9</sup>. Má 4 vazebná místa pro vápník a váže 4-6 molů tohoto prvku na 1 mol bílkoviny. V ledvinách savců i člověka je exprimován v buňkách té tubulární

oblasti distálního nefronu, kde dochází k selektivní reabsorpci vápníku<sup>10</sup>. V pokusech *in vitro* lze prokázat, že přítomnost 1,25D3 indukuje v ledvinové buňce aktivitu proteinkinázy C během 24 hod. se současnou regulací zvyšování tvorby calbindinu-D28K<sup>11</sup>.

**Bílkoviny kostní tkáně.** 1. *Osteocalcin* (synonymum - *kostní Gla-bílkovina, BGP*). Tato bílkovina byla izolována z kostní tkáně<sup>12</sup>. Její syntéza závisí nejen na přítomnosti derivátu vitamínu D, ale i vitamínu K, který (podobně jako u prothrombinu) postranlačně zasahuje v peptidovém řetězci do přeměny zbytků glutamové kyseliny na zbytky kyseliny gama-karboxy-glutamové (Glu na Gla). Právě tato přeměna dává osteocalcinu vazebné vlastnosti pro vápník. Osteocalcin se nachází pouze v kostech, kde je asi syntetizován osteoblasty. Z fyziologických poměrů organismu se nachází ve velmi nízké koncentraci i v cirkulující krvi. Zvýšení jeho hladiny signalizuje buď patologickou situaci v metabolismu kostní tkáně nebo vážné snížení filtrace v ledvinách. Je proto uznáván jako vhodný biochemický klinický marker.

2. *Osteopontin* (synonymum - *44K BPP, sialoprotein 1*) je sekretovaný, silně kyselý, glykosylovaný fosfoprotein, přítomný v demineralizované matrix kosti. Strukturální studie prokázaly, že osteopontin má 12-13 fosforylovatelných míst (jsou to zbytky serinu a treoninu)<sup>13</sup>. Jeho přesná biologická úloha nám zatím uniká. Víme, že se nějak podílí na vývoji a remodelaci kosti formou, související s mechanismy mezi-buněčné adheze nebo adheze buněk s podkladovým substrátem. Pravděpodobně participuje i na tumorigenezi a metastazování<sup>14</sup>.

## 1.3 Účast systému vitamínu D3 na transportu vápníku ve střevě, ledvině a mléčné žláze.

**Transepiteliální transport vápníku ve střevě.** Transport vápníku ze střevního lumina do krve zahrnuje aktivní a pasivní cestu. Pasivní cesta je paracelulární (mimobuněčná), není saturovatelná a jeví se být nezávislá na regulaci vitamínem D3. Tato cesta je účinná po celé délce tenkého střeva. Cesta druhá, aktivní, je v mnoha bodech závislá na vitamínu D3. Je transcelulární, saturovatelná, na přísunu energie závislá a je nejvýraznější v duodenu a proximální části tenkého střeva; v části distální je nepatrná, téměř zanedbatelná.

Máme k dispozici údaje, které svědčí pro 3 postupné kroky při transcelulárním transportu - (1) vstup vápníku do enterocyty, (2) nitrobuňková translokace vápníku a (3) jeho vypuzení (extruze) přes bazolaterální buněčnou membránu. Všechny kroky jsou ovlivněny vitamínem D3. Stupeň ovlivnění jednotlivých kroků je však významně rozdílný. Mechanizmy, kterými může vitamin D3 zvýšit vstup vápníku přes kartáčový lem rezorpčního epitelu nejsou zcela objasněny. Z experimentálních výsledků je však zřejmé, že jeho účinek není limitujícím krokem v tomto úseku vápníkového putování. Vitamin D3 kvantitativně nejvíce ovlivňuje pohyb vápníkového jonť uvnitř buňky a jeho extruzi z enterocyty. Pro usnadnění transportu Ca<sup>2+</sup> v cytoplazmě buňky přicházejí v úvahu 3 mechanismy: (1) Usnadněná difúze zahrnující vazbu vápníku na calbindin-D9k; (2) „doprava“ vápníku v určitých buněčných organelách (např. mitochondriích, Golgiho aparátu, hrubém endoplasmatickém retikulu); (3) transport vezikulární s účastí cytoskeletálních prvků. Vypuzení (extruze) vápníku z enterocyty bazolaterální membránou se děje pod vlivem 1,25D3 především prostřednictvím Ca/Mg-ATPázy, která je na tuto část plazmatické membrány vázána. Nejasný je zatím mechanismus, kterým 1,25D3 „vypumpovávání“ zvyšuje.

**Transepiteliální transport vápníku v ledvinách.** 1,25D3 indukuje v cílových buňkách tohoto hormonu mRNA enzymu 1,25(OH)<sub>2</sub>D-24-hydroxylázy. Forbol ester zvyšuje tento účinek u buněk tenkého střeva a tubulárních buněk ledvin. To

může znamenat, že zde existuje signální cesta interagující se signální cestou protein kinasy C - podobně jako u buněk tenkého střeva, ale na rozdíl od osteoblastů. Cycloheximid, blokující syntézu bílkovin, nezvyšuje účinek 1,25D3. Znamená to, že -podobně jako osteoblasty - buňky renální exprimují neznámou bílkovinu, která je nutná - na rozdíl od buněk střevních - pro akci tohoto hormonu. Z toho je patrné, že existují rozdíly v detailech signálních cest a mechanismů působení delfanoidů v různých druzích buněk organismu<sup>15</sup>.

**Transepiteliální transport v mléčné žláze.** Ve specifickém funkčním metabolismu epitelálních buněk mléčné žlázy hraje vápník a tedy i hormonální systém vitamínu D3 významnou úlohu. Není pochyb o úzkém vztahu mezi metabolismem vápníku a produkcí mléka. Informace o poměrech VDR v normální tkáni mléčné žlázy máme zatím pouze z pokusů na zvířatech<sup>16,17</sup>. Představy mechanismů tvorby mléka na molekulární úrovni s ohledem na přestup vápníku do epitelálních buněk a jeho přestup do mléka nám zatím chybí. Z analogie je však zřejmé, že i zde je asi nutný intenzivní transepiteliální transport vápníku do mléka podobně jako ve střevě do krve a v ledvině do moče.

#### 1.4 Účast hormonálního systému vitamínu D3 na mechanismu proliferace, diferenciaci a apoptózy.

Velký zájem o vyjasnění funkčního významu působení derivátů vitamínu D3 a zvláště 1,25D3 na nečekaně různé druhy tělních buněk vyvolala především skutečnost, že byla zjištěna a potvrzena přítomnost příslušného nitrobuňčného receptoru (VDR) také v leukocytech a aktivovaných T-buňkách. S ohledem na možné léčebné využití se úsilí mnoha laboratorů ještě zvýšilo, když se podařila *in vitro* vlivem 1,25D3 diferenciaci leukemických buněk v normální terminální funkční buňky. Pro klinické využití *in vivo* zůstával však jeden velký limitující problém - průvodní toxická hyperkalcemie! Následovalo horečné hledání delfanoidů (analogů vitamínu D), které by si uchovály co největší schopnost kontrolovat diferenciaci a proliferaci buňky, ale neovlivňovaly podstatně hladinu vápníku v krvi. Toto hledání s určitými již konkrétními výsledky pokračuje.

Udržování stálého počtu buněk *in vivo* i *in vitro* závisí na vyrovnanosti mezi buňčným dělením a apoptózou. Nekontrolovatelný nádorový růst tedy musí být důsledek buď zvýšené proliferace nebo snížené apoptózy nebo obojího. Proto také látky, které mají vyvolat regresi nádorů, musí mít schopnost buď bránit proliferaci nebo aktivovat proces apoptózy.

##### 1.4.1 Ovlivnění proliferace.

**Antiproliferativní účinky 1,25D3.** V současné době máme již u různých linií specifických buněk řadu experimentálních důkazů o antiproliferativním působení nejen fyziologického 1,25D3, ale i delfanoidů uměle syntetizovaných. Uvedu několik příkladů:

A) 1,25D3 brání proliferaci **lymfocytů** v závislosti na dávce, které jsou buňky vystaveny. Zdá se, že tato inhibice růstu má vztah k afinitě vazby derivátů vitamínu D3 na VDR, protože jen vysoké koncentrace přirozených derivátů s nízkou afinitou vykazují antiproliferativní účinek<sup>18</sup>. B) Poučné jsou výsledky experimentů *in vitro* s liniemi normálních lidských a hlodavčích fibroblastů. **O kožních fibroblastech** víme, že exprimují VDR, a že 1,25D3 u nich při pěstování v jednovrstevné kultuře inhibuje proliferaci<sup>19</sup>. C) Méně přehledné jsou však poměry u některých dalších typů buněk. Tak ku příkladu u **buněk rakoviny mléčné žlázy**. Výsledky dosavadních experimentů zaměřených na působení delfanoidů u linie MCF-7 jsou do jisté míry, jak uvidíme později, překvapivé. Ukázalo se, že 1,25D3 ve vyšších koncentracích proliferaci inhibuje, při velmi nízkých koncentracích ji ale podporuje<sup>20</sup>.

**Stimulační účinky 1,25D3 na proliferaci.** I když tedy 1,25D3 u převážné většiny dosud testovaných buňčných typů proliferaci brání, byly zjištěny i buňčné typy, kde se účinek této hormonální látky projevuje zcela opačně - proliferaci jednoznačně podporuje! Několik příkladů: A) Patří k nim např. **buňky hladkých svalů cév** (vascular smooth muscle cells - VSMC) u nichž stimulační účinek 1,25D3 na jejich růst se výrazně liší od potlačování růstu kultivovaných myoblastů. Neznáme zatím důvod tohoto rozdílu v účincích<sup>21</sup>. B) *In vitro* v buňčné linii lidských **C karcinomových buněk tyreoidy** prokázali Lazaretti-Castro a spol.<sup>22</sup>, že 1,25D3 vykazuje silný a specifický účinek proliferativní. Současně inhibuje bazální sekreci calcitoninu. C) **Lidské cirkulující monocyty** inkubovány s 1,25D3 za fyziologických jeho koncentrací (optimální kolem 10 nM) proliferují. Ještě vyšší mitotická aktivita u tohoto typu krevních buněk lze pozorovat po přidání kombinace 1,25D3 a kultivační tekutiny z kultury lymfocytů stimulovaných lektinem<sup>23</sup>.

##### 1.4.2 Ovlivnění diferenciaci buněk.

1,25D3 reguluje diferenciaci osteoklastů a makrofágů - dvou buňčných typů, o kterých se domníváme, že se odvozují od společného myelomonocytárního prekursoru. *In vivo* i *in vitro* v orgánových kulturách indukují sice zvýšení rezorpce kostí, ale neovlivňují rezorpční aktivitu izolovaných osteoklastů. Vysvětlení hledají Billecocq-ová a spol. v tom, že schopnost 1,25D3 spočívá asi primárně v ovlivňování proliferace a/nebo diferenciaci prekursorů ve dřeni kostní, což sekundárně vede ke zvýšení počtu zralých osteoklastů.

Pro tuto představu mluví také *in vitro* experimenty na buňkách normální kostní dřeni i na liniích buněk transformovaných. Shrme-li výsledky, zdá se, že nejdříve 1,25D3 indukují diferenciaci a maturaci linií myelomonocytárních buněk směrem k mononukleárním fagocytům spíše než k linii granulocytární. Pak stimuluje 1,25D3 tvorbu vícejaderných buněk podobných osteoklastům (u dlouhodobých kultur dřeni kostní). Tím se zvyšuje podíl buněk schopných rezorbovat kost<sup>24</sup>.

**1.4.3 Účast na apoptóze.** V tomto ohledu vliv delfanoidů není jednoznačný. Jsou rozdíly i u různých buňčných linií jednoho druhu lidské rakoviny. Na příklad američtí autoři zjistili, že nádorové mamární buňky linie BT47 a MDA-MB-231 nevykazují (měřeno fragmentací DNA) známky apoptózy po expozici 4 - 72 hodin s nejučinějším delfanoidem KH 1060 při jeho vysoké koncentraci (10<sup>-6</sup>M). Naproti tomu buňky linie MCF-7 po inkubaci 48-72 hodin s tímto analogem hynuly apoptózou. Jeden z molekulárně biologických rozdílu mezi buňkami těchto linií, které zatím známe, je to, že buňky linie BT474 a MDA-MB-231 exprimují mutovanou formu bílkoviny p53, zatím co buňky MCF-7 mají nativní (wild) typ p53<sup>25</sup>.

Studie *in vitro* na liniích gliomových buněk (C6 a GHD) ukázaly, že 1,25D3 vyvolává třetí den po 24hod. působení těžké cytotoxické účinky. Opakovaný pokus na gliomových buňkách linie C6 tento nálezkou potvrdil. Zjištěná fragmentace DNA byla identifikována jako intranukleozomální, zvýšené hodnoty c-MYC a transkriptů tkáňové transglutaminasy souhlasily s obrazem apoptózy. Za stejných pokusných podmínek primární astrocyty kryšího mozku zůstaly po působení 1,25D3 nezměněny<sup>26</sup>. 1,25D3 je jednou z látek, které indukují v nervovém systému tvorbu nervového růstového faktoru, který hraje důležitou roli při neuronálně cílených interakcích v mozku pozdně embryonálním a dospělém. Tyto informace z poslední doby vzbuzují určitou naději pro léčebné zásahy u nádorových a degenerativních onemocnění nervové tkáně<sup>27</sup>.

## 2. ÚVOD DO BIOLOGIE SYSTÉMU VITAMÍNU D3 V BUŇKÁCH LIDSKÝCH NÁDORŮ

### 2.1 Malignity hematopoetického a imunitního systému.

Jak jsem se již zmínil, na počátku osmdesátých let se objevi-

lo několik prací, které svědčily pro to, že aktivní hormonální látka 1,25D3 indukují u několika linií leukemických buněk (včetně linie HL-60) diferenciace i směru monocytové cesty. Poněvadž tohoto účinku lze dosáhnout téměř při fyziologické koncentraci, není divu, že od té doby je považován 1,25D3 za přirozený regulátor diferenciace makrofágů také *in vivo* a nebyť jeho hyperkalcemického účinku i za perspektivní látku pro léčbu leukemických nemocných. Pro nedostatek místa, všimneme si v této hemato-onkologické kapitole jen nových poznatků u buněčné linie HL-60. Buňky této linie jsou totiž široce používaným modelem pro výzkum působení diferenciálních a cytotoxických látek na leukemické buňky.

### Lidská promyelocytová leukemie - linie HL-60

**Antiproliferativní účinek 1,25D3 a deltanoidů.** 48 hodin po přidání 1,25D3 ve vysoké koncentraci (nad  $4 \times 10^{-7} M$ ) do kultury HL-60 buněk objeví se zástava proliferace v G1 fázi buněčného cyklu, která dosáhne maxima po 96 hodinách. Současně lze v buňkách prokázat výrazné zvýšení obsahu specifické bílkoviny CDI p27<sup>Kip1</sup>, což podporuje domněnku, že tento inhibitor kinázy závislý na cyklinu je jedním z hlavních prostředníků (mediátorů) antiproliferativního působení deltanoidů. Znamená to také, že bílkovina p27<sup>Kip1</sup> je významným kandidátem na regulátor buněčného cyklu, který blokuje vstup HL-60 buňky do S-fáze. Zvýšení hladiny této látky je závislé na koncentraci 1,25D3 a je provázáno zvýšením dvou dalších bílkovin - cyklinu D a E, jejichž koncentrace normálně vrcholí ve střední části fáze G1 a v době přechodu z G1 do S fáze<sup>28</sup>. Přechodně se zvyšuje v této době i buněčná hladina bílkoviny p21<sup>Cip/Waf1</sup>.

**Deltanoidy jako diferenciální faktor.** Avšak 1,25D3 je pro buňky linie HL-60 také stimulatorem jejich diferenciace. Tyto buňky pěstované v kultivační tekutině s přidávkem séra se působením 1,25D3 v koncentraci  $10^{-7} M$  diferencují ve směru k monocytům. Jako důsledek tohoto působení 1,25D3 bylo zaznamenáno postupné zvýšení nitrobuňčného pH (ze 7.17 na 7.3), které dosáhlo maxima po 48 hodinách inkubace<sup>29</sup>. Odpovídá to dřívějšímu poznatku, že arteficiální nitrobuňčná alkalizace indukují diferenciaci monocytů.

**Synergie s účinkem retinoidů.** Opakovaně bylo prokázáno, že u linie HL-60 vedle 1,25D3 mají výrazný inhibiční (antiproliferativní) účinek také retinoidy - all *trans* retinová kyselina (atRA) i 9-*cis* retinová kyselina (9cRA). Současné působení 1,25D3 (ale i řady syntetických deltanoidů) a atRA (nebo 9cRa) při koncentraci 100 nM má aditivní až synergistický účinek; dosáhneme tím téměř totálního zastavení růstu buněk. Silný synergismus by mohl být využit léčebně nebyť okolnosti limitující - účinku 1,25D3 na metabolismus vápníku, vyvolávající hyperkalcemii. Proto se usilovně hledají deltanoidy s minimálním kalcemickým účinkem. Dva z nich - MC903 a EB 1089 - jsou nadějně. První z nich má přinejmenším stejnou antiproliferativní a diferenciální aktivitu při monocytovém dozrávání. Druhý - analog EB 1089 - je dokonce účinnější než původní molekula 1,25D3, zvláště když se použije v nižší koncentraci! Zdá se tedy, že kombinace účinných retinoidů a deltanoidů je dobrou a nadějnou cestou při hledání optimálních léků některých druhů leukemie<sup>30</sup>.

**Apoptotický účinek deltanoidů.** Velký zájem klinických biochemiků vyvolalo zjištění, že kombinace současného působení 1,25D3 ( $1,25 \times 10^{-9}$  -  $3,1 \times 10^{-10} M$ ) a 9cRA ( $5 \times 10^{-7}$ ) v uvedených koncentracích a za nepřítomnosti séra v kultuře buněk HL-60 vyvolává zástavu růstu a apoptózu<sup>31</sup>. Důkladnou analýzou této spolupráce retinoidů (atRA a 9cRA) a deltanoidu (1,25D3) zjistili Bunce a spol. (1995), že hodnoty použitých koncentrací jsou rozhodující pro typ výsledného účinku, a že vhodnou kombinací by se mohlo docílit optimálních podmínek pro diferenciální terapii buď ve směru neutrofilní a mono-

cytární diferenciace nádorových buněk typu HL-60 nebo ve směru jejich dobrovolné smrti - apoptózy<sup>32</sup>.

Skupina vedená G. P. Studzinskim zjistila, že působení 1,25D3 na buňky HL60 před aplikací látek poškozujících DNA (1-β-D-arabinofuranosyl cytosinu a hydroxy-urei) vede ke snížení výskytu apoptózy, způsobené těmito látkami. Avšak ztráta viability buněk se zvýšila, když sled aplikovaných látek byl obrácený!<sup>33</sup> Další analýzou mechanismu tohoto jevu prokázali, že 1,25D3 rychle snižuje expresi protoonkogenu *bcl-2*, což vylučuje zásah BCL-2 do ochranného účinku hormonálního derivátu vitamínu D3<sup>34</sup>. Rychlost protektivního účinku 1,25D3 souhlasí s hypotézou, že aktivace monocytového diferenciálního programu dostičuje k interferenci s programem vedoucím k buněčné smrti apoptózou!

### 2.2 V buňkách nádorů mléčné žlázy.

#### V buňkách benigních nádorů mléčné žlázy.

Zatím máme k dispozici jen velmi málo informací o poměrech VDR u mastopatií a benigních nádorů mléčné žlázy ženy. Od první studie, ve které byly zveřejněny výsledky vyšetření u 3 benigních nádorů (fibroadenomu, fibroadenose a benigním papilomu) s hodnotami 0,40; 1,5; 6,8 fmol/mg bílkoviny, uplynulo již hodně let<sup>35</sup>. Nedávno jsme měli možnost na našem pracovišti vyšetřit VDR u 17 fyloidních nádorů mléčné žlázy. U 60% z nich jsme prokázali jeho expresi. Jen 36% nádorů vykazovalo hodnotu VDR nad 10 fmol/mg bílkoviny, kterou považujeme za hranici klinické pozitivity. Incidence výskytu je větší, vezmeme-li v úvahu i další vyšetřené vzorky u téže nemocné (70% exprese a 53% klinické pozitivity). Zdá se, že buňky skupiny nádorů bez exprese VDR mají specifický fenotyp: nelze u nich prokázat výskyt kombinace ER+PgR- a ER-PgR-<sup>36</sup>.

#### V buňkách maligních nádorů mléčné žlázy.

##### 1,25D3 a VDR v buňkách primárních nádorů rakoviny mléčné žlázy.

Mnoho buněk zhoubného onemocnění si ponechává podle dosavadních zkušeností schopnost syntetizovat VDR. Počty vyšetřených nádorů mléčné žlázy na VDR nejsou dosud velké; skutečná frekvence publikovaných pozitivních nálezů se pohybuje pravděpodobně kolem 60% - 70% (TAB.). Zjištěné receptory jsou vysoce specifické pro 1,25D3.

U primárních nádorů mléčné žlázy nebyla zjištěna korelace mezi hladinami VDR a receptory estrogenu, progesteronu, ev. androgenu a glukokortikoidů. Rovněž nebyl zjištěn vztah mezi VDR a stavem menstruace, výsledky izotopového vyšetření kostí, výskytu metastáz v mízních uzlinách nebo histologickým typem primárního nádoru<sup>37, 38, 39</sup>. Prognostický význam není zatím znám, studuje se v prospektivních studiích.

##### 1,25D3 a VDR v buňkách buněčných linií rakoviny prsu.

V současné době známe řadu buněčných linií rakoviny prsu, které exprimují VDR. Také zde, pro nedostatek místa, uvedu zatím nejvíce studovanou linii získanou ze tkáně rakoviny ženské mléčné žlázy - linii MCF-7.

#### Buněčná linie rakoviny prsu MCF-7

Původní buňky této linie pochází z pleurálních metastáz nemocné ženy s lobulárním karcinomem prsu<sup>40</sup>. Všeobecně je považována především za výborný model pro studium receptorů steroidních hormonů u zhoubného onemocnění tohoto orgánu. MCF-7 buňky exprimují totiž estrogenové (ER), progesteronové (PgR), androgenové (AR) i glukokortikoidní receptory (GR).

Pro maximální růst *in vitro* a pro vývin nádorů z implantátů u nahé myši *in vivo* je nutná fyziologická hladina estradiolu v kultivační tekutině nebo v krvi zvířete<sup>41</sup>. Z funkčního hlediska není jisté bez zájmovosti skutečnost, že buňky MCF-7 jsou schopny rezorbovat devitalizovanou kost, ve které byly zničeny pomocí ultrafialového záření všechny buňky rezorbující normální kost<sup>42</sup>.



**Tabulka vyšetřených VDR u nádorů rakoviny prsu:**

| Autoři                       | Rok  | Počet vyšetřených | Počet pozitivních | Procento |
|------------------------------|------|-------------------|-------------------|----------|
| Eisman a spol. <sup>35</sup> | 1980 | 11                | 8                 | 64 %     |
| Eisman a spol. <sup>34</sup> | 1981 | 54                | 43                | 80 %     |
| Freake a spol. <sup>38</sup> | 1984 | 68                | 51                | 75 %     |
| Eisman a spol. <sup>37</sup> | 1986 | 263               | 153               | 58 %     |
| Lang a spol. <sup>35</sup>   | 1987 | 50                | 34                | 68 %     |
| Berger a spol. <sup>36</sup> | 1987 | 55                | 43                | 78 %     |

Přítalivost této linie spočívá především v tom, že buňky MCF-7 jsou ovlivnitelné řadou hormonálních systémů, mají charakteristiky dobře diferencovaných epiteliálních buněk a reagují na změny nejbližšího okolí expresí morfologických i funkčních znaků.

Pravděpodobně první, kdo prokázali, že MCF-7 buňky syntetizují i receptory pro 1,25D3 byli Eisman s australskými spolupracovníky v roce 1979. VDR této linie jsou identické s dobře charakterizovanými receptory z cytosolu buněk tenkého střeva a naprosto se liší od vazebných bílkovin lidské plasmu, které transportují metabolity vitamínu D3 v krvi. Receptory jsou nasyceny při koncentraci 1,25D3, která je velmi blízká normální cirkulující krevní hladině tohoto hormonu ( $0,4 \times 10^{-10}$  až  $0,8 \times 10^{-10}$  M/l). Z množství navázaného 1,25D3 při saturaci autoři vypočetli, že na jednu buňku MCF-7 připadá přibližně 4.500 vazebných receptorových míst<sup>43</sup>.

#### Koncentrace VDR v buňkách linie MCF-7:

|  |                  |
|--|------------------|
| Eisman a spol.-1979 <sup>43</sup> .....  | 4.500 VDR/buňka  |
| Findlay a spol.-1980 <sup>44</sup> ..... | 31 fmoI/mg bílk. |
| Thomas,Sipson-1986 <sup>45</sup> .....   | 80 fmoI/mg bílk. |

**Inhibiční a antiestrogení vliv 1,25D3.** Inhibiční účinek hormonální formy vitamínu D3 na růst buněk MCF-7 a to v závislosti na koncentraci v kultivační tekutině je nesporně prokázán. V posledních letech byly testovány na linii MCF-7 buněk i laboratorně připravené deltanoidy - analogy 1,25D3, které se ukázaly být rovněž silnými antiproliferativními látkami. Některé z nich dokonce s mnohonásobně větším účinkem a s menším kalcemickým potenciálem. Signalizační cesta jejich účinků na molekulární úrovni využívá VDR<sup>46</sup>. Výsledkem pát-rání po vhodných derivátech hormonu 1,25D3 bez větší hyperkalcemické aktivity na počátku devadesátých let (v laboratořích společnosti Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. v Tokyuu) byla izolace dvou analogů naprosto opačných typů: 1. **1alfa,25-dihydroxy-22-oxavitamin D3** (22-oxacalcitriol: OCT) se schopností diferenciac a silnou aktivitou antiproliferační, ale s nízkou náchylností k vyvolávání kalcemie. 2. **1alfa,25-dihydroxy-2B-(3-hydroxypropoxy) vitamin D3 (ED-71)** s kalcemickým charakterem a možností využití při léčbě onemocnění kostí. Japonští autoři již zveřejnili, že OCT inhibuje *in vitro* proliferaci buněk rakoviny prsu jak ER+ (MCF-7, T47-D a ZR-75-1) tak ER- (MDA -MB-231 a BT-20) a to silněji než 1,25D3!<sup>47</sup> OCT testovali autoři také *in vivo* po implantaci buněk lidské rakoviny prsu s ER+ i ER- athymické myši. U MCF-7 nádorů s ER+ podávali perorálně OCT i tamoxifen 5x za týden po dobu 1 měsíce. Došlo k potlačení růstu nádoru v závislosti na dávce. Protinádorový účinek 1.0 ug/kg OCT byl srovnatelný s dávkou 2.0 mg/kg tamoxifenu. Navíc pozorovali u těchto nádorů synergistický protinádorový účinek submaximálních dávek OCT a tamoxifenu. Perorální podávání

OCT 3x týdně po dobu 1 měsíce rovněž potlačilo růst MX-1 nádoru, který je ER-, rovněž v závislosti na dávce bez vzestupu koncentrace vápníku v seru. Jejich výsledky tedy ukazují na to, že OCT potlačuje růst ER- i ER+ karcinomů prsu *in vivo* bez nebezpečí hyperkalcemie a že u ER+ nádorů může být účinek OCT umocněn tamoxifenem<sup>48</sup>.

Přibližně ve stejnou dobu testovala holandská výzkumná skupina z Erasmovy univerzity v Rotterdamu ve spolupráci s dánskou farmaceutickou firmou Leo Pharmaceutical Products na téže buněčné linii možnost synergismu inhibice růstu při současném podávání tamoxifenu a deltanoidů. Došla k závěru, že deltanoidy interagují se stimulací E2 **nepřímou**. Současné podávání tamoxifenu (TAM) a 1,25D3 zvyšuje u MCF-7 buněk inhibici růstu přibližně o 15% (ze 70% u TAM na 83% v kombinaci)<sup>49</sup>.

**Deltanoidy a retinoidy.** MCF-7 buňky jsou, podobně jako řada jiných linií ER+ buněk rakoviny prsu, citlivé na inhibici proliferace vlivem působení retinoidů<sup>50</sup>. Mechanismus jejich antiproliferativního účinku není zatím zcela podrobně znám. V mnoha případech jiných linií však víme, že potlačení růstu buněk vlivem kyseliny retinové (RA) je spojeno s následnou diferenciací a, v případě buněk maligních, se zvratem k normálnímu fenotypu. Účinek **současného působení kyseliny retinové (RA) a 1,25D3** na buňky MCF-7 testovali Balaguer a spolupracovníci<sup>51</sup> tak, že přechodně transfektovali příslušné receptory (RAR, RXR a VDR) do těchto buněk. Vpravení RAR nebo RXR samostatně nezměnilo antagonistický účinek RA na růst buněk, ale vpravení RAR v kombinaci s RXR tento antagonistický účinek výrazně zvýšilo! Přidání VDR samotného mírně antagonistický účinek 1,25D3 na růst zvýšilo, zatím co kotransfekce RXR s nebo bez VDR růstově inhibiční účinek neovlivnilo.

**Vliv 1,25D3 a deltanoidů na diferenciaci.** Máme poměrně málo informací o vlivu deltanoidů v tomto ohledu. Příslušná anlyza diferenciac 6 linií buněk rakoviny mléčné žlázy americkou skupinou Elstnerové ukázala, že 1,25D3 a deltanoidy indukují diferenciaci u všech testovaných linií. Nejsilnějším induktorem diferenciac byl deltanoid KH 1060. Výsledky svědčí pro možnost, že k regulaci proliferace a diferenciac vlivem deltanoidů dochází různými signalizačními cestami s účastí VDR. Jejich nálezy kontrastují s informacemi získanými o buňkách akutní myeloidní leukemie, u nich totiž zůstava jejich proliferace a indukce diferenciac je úzce spojena<sup>52</sup>.

WELSH a spolupracovníci vyšetřili markery *apoptózy*, aby objasnili typ buněčné smrti buněk MCF-7 po působení 1,25D3. Ve svých závěrech potvrdili, že 1,25D3 způsobuje inhibici růstu MCF-7 buněk převážně indukci apoptózy, která je charakterizována kondenzací cytoplasmu i chromatinu, reorganizací bílkoviny jaderného mitotického aparátu a zvýšenou expresí clusterinu v nepřítomnosti DNA fragmentace. V paralelních studiích pozorovali tyto autoři, že EB1089, analog vitamínu D3 s minimálním hyperkalcemickým účinkem, indukuje rovněž apoptózu u linie buněk MCF-7. Tyto nálezy by mohly svědčit pro představu, že deltanoidy působí jako koordinační regulátoři jak proliferace tak apoptózy. To by pak představovalo rozumný důvod pro stanovení účinnosti deltanoidů (analogů vitamínu D) při aktivaci apoptotické signalizační cesty u buněk rakoviny prsu. Tatáž americko-kanadská skupina srovnala účinky 1,25D3 a EB1089 na kinetiku buněčného cyklu. Zjistila jediný rozdíl: EB 1089 je 100x účinnější<sup>53</sup>.

**Závěr.** Záměrem tohoto článku bylo především upozornit klinického onkologa na možnosti budoucího příznivějšího přístupu k chemoterapii resp. hormonoterapii některých nádorových onemocnění využíváním regulačních vlastností hormonálního systému vitamínu D3. Stručný základní přehled doplněný příklady z doposud nejvíce zkoumaných oblastí onkologie v tomto směru by chtěl pouze navodit širší diskuzi na toto téma.

## Literatura

- Lang, B. A.: Přeměna cholekalciferolu (vitaminu D3) ve steroidní hormon. Účinné metabolismy cholekalciferolu. Vnitřní lék., 31, 1001-1006 (1985).
- Masumoto, O., Ohnaya, Y., Okuda, K.: Purification and characterization of vitamin D 25-hydroxylase from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 263, 14256-14260 (1988).
- Lang, B. A.: Přepřava cholekalciferolu (vitaminu D3) a jeho metabolitů v krevním řečišti. Vnitřní lékařství 32, 408-412 (1986).
- Hirschfeld, J.: Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobulins. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 47, 160-168 (1959).
- Vavruša, B., Cleve, H., Constans, J.: A deficiency mutant of the Gc system. Hum. Genet. 65, 102-107 (1983).
- Verboven, Ch., De Bondt, H., De Ranter, C., Bouillon, R., Van Baelen, H.: Crystallization and preliminary x-ray investigation of vitamin D-binding protein from human serum. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 107-108.
- Bouillon, R., Van Baelen, H., De Moor, P.: The measurement of the vitamin D-binding protein in human serum. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 225-231 (1977).
- Daiger, S. P., Schanfield, M. S., Cavalli-Sforza, L. L.: Human group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. roc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72, 2076-2080 (1975).
- Imawari, M. et al.: Synthesis of serum and cytosol vitamin-D-binding proteins by rat liver and kidney. J. Biol. Chem. 257, 8153-8157 (1982).
- Kawakami, M., Goodman, W. S.: Effects of protein modification procedures of the interaction between 25-hydroxyvitamin D and the human plasma binding protein for vitamin D and its metabolites. Biochemistry (USA) 20, 5881-5887 (1981).
- Schoentgen, F. et al.: Homology between the human vitamin-D binding protein (group specific component), d-fetoprotein and serum albumin. FEBS Letters 185, 47-50 (1985).
- Bouillon, R., Van Assche, F. A., Van Baelen, H.: Influence of the vitamin D binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D. J. clin. Invest. 67, 589-596 (1981).
- Coué, M., Constans, J., Olomucki, Anna: Effect of serum vitamin-D-binding protein on actin in the presence of plasma gelsolin. Eur. J. Biochem. 160, 273-277 (1986).
- Guha, C., Osawa, M., Werner, P. A., Galbraith, R. M., Paddock, G. V.: Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression *in vitro*. Hepatology 21, 1675-1681 (1995).
- Partridge, W. M.: Transport of protein-bound hormones into tissues *in vivo*. Endocrin. Rev. 2, 103-123 (1981).
- Sher, Elizabeth, Eisman, J. A., Moseley, Jane M., Martin, T. J.: Whole-cell uptake and nuclear localization of 1,25-di-hydroxycholecalciferol by breast cancer cells (T 47D) in culture. Biochem. J. 200, 315-320 (1981).
- Bouillon, R., Van Baelen, H., De Moor, P.: Physiology and pathophysiology of vitamin D-binding protein. In: Binding proteins of steroid hormones. Colloque INSERM John Libbey Eurotext Ltd. Vol. 149, s. 333-356 (1986).
- Geuskens, M., Torres, J. M., Esteban, C., Uriel, J.: Endocytosis of three serum proteins of a multigene family and of arachidonic acid in human lectin-stimulated T lymphocytes. Microsc. Res. Techn. 28, 297-307 (1994).
- Galbraith, R. M., Arnaud, Ph.: The interaction of D-binding protein (Gc) with lymphocytes and its possible biological function. In: Vitamin D, chemical, biochemical and clinical update, eds. A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, D. v. Herrath, pp. 674-681, W. de Gruyter, Berlin 1985.
- Petrini, M., Emerson, D. L., Galbraith, R. M.: Linkage between surface immunoglobulin and the cytoskeleton of B lymphocytes may involve Gc protein. Nature 306, 73-74 (1983).
- Beato, M.: Gene regulation by steroid hormones. Cell 56, 335-344 (1989).
- Green, S.: Promiscuous liaisons. Nature 361, 590-591 (1993).
- Pike, J. W.: Monoclonal antibodies to chick intestinal receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3. Interaction and effects of binding on receptor function. J. Biol. Chem. 259, 1167-1173 (1984).
- Pike, J. W., Marion, S. L., Donaldson, C. A., Haussler, M. R.: Serum and monoclonal antibodies against the chick intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3. Generation by a preparation enriched in a 64,000-dalton protein. J. Biol. Chem. 258, 1289-1296 (1983).
- McDoneell, D. P., Mangelsdorf, D. J., Pike, J. W., Haussler, M. R., O'Malley, B. W.: Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. Science 235, 1214-1217 (1987).
- Pike, J. W., Sleanor, N. M., Haussler, M. R.: Chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3. J. Biol. Chem. 262, 1305-1311 (1987).
- Baker, A. R., McDonnell, D. P., Hughes, M. et al.: Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3294-3298 (1988).
- Burmester, J. K., Maeda, N., DeLuca, H. F.: Isolation and expression of rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1005-1009 (1988).
- Burmester, J. K., Wiese, R. J., Maeda, N., DeLuca, H. F.: Structure and regulation of rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 9499-9502 (1988).

## Literatura k části II:

- Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A. et al.: Two nuclear signalling pathways for vitamin D. Nature 361, 657-660 (1993).
- Green, S.: Promiscuous liaisons. Nature 361, 590-591 (1993).
- Manolagas, S. C., Provvedini, D. M., Murray, S. S., Tsonis, P. A., Spandidos, D. A.: Association between the expression of the c-myc oncogene mRNA and the expression of the receptor protein for 1,25-dihydroxyvitamin D3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 856-860 (1987).
- Wasserman, R. H., Taylor, A. N.: Vitamin D3-induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. Science 152, 791-793 (1966).
- Sans, A., Etchecopar, B., Brehier, A., Thomasset, M.: Immunocytochemical detection of vitamin D-dependent calcium-binding protein (CaBP-28K) in vestibular sensory hair cells and vestibular ganglion neurones of the cat. Brain Res. 364, 190-194 (1986).
- Hunziker, W.: The 28-kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein has a six-domain structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7578-7582 (1986).
- Fullmer, C. S., Wasserman, R. H.: Chick intestinal 28-kilodalton calbindin-D: complete amino acid sequence and structural considerations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4772-4776 (1987).
- Roth, J., Brown, A. W., Orci, L.: Localization of vitamin D-dependent calcium binding protein in mammalian kidney. Am. J. Physiol. 243, F243-F252 (1982).
- Gagnon, A. M., Welsh, J. E.: Phosphorylation and modulation of calbindin D28K by activation of protein kinase C (PKC). In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 406-407.
- Price, P., Baukol, S.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. J. Biol. Chem. 255, 11660-11663 (1980).
- Butler, W. T.: The nature and significance of osteopontin. Connective Tiss. Res. 23, 123-136 (1989).
- Chang, P.-L., Lee, T.-F., Ridall, A. L., Prince, Ch. W.: Regulation of osteopontin by calcitriol in mouse epidermal JB6 cells. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 296-297.
- Armbrrecht, H. J., Hodam, T. L., Boltz, M. A.: Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D differs in kidney, intestine, and bone cell lines. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 302-303.
- Reinhardt, T. A., Conrad, H. R.: Specific binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in bovine mammary gland. Arch. Biochem. Biophys. 203, 108-116 (1980).
- Fry, J. M., Curnow, D. H., Gutteridge, D. H., Retallack, R. W.: Vitamin D in lactation. I. The localization, specific binding and biological effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in mammary tissue of lactating rats. Life Science 27, 1255-1263 (1980).
- Lemire, J. M., Adams, J. S., Sakai, R., Jordan, S. C.: 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. J. Clin. Invest. 74, 657-661 (1984).
- Saati, N., Ravid, A., Liberman, U. A., Koren, Ruth: 1,25(OH)2D3 and agents that increase intracellular cAMP synergistically inhibit the proliferation of mouse fibroblasts. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 463-464.
- Frampton, R. J., Omond, S. A., Eisman, J. A.: Inhibition of human cancer cell growth by 1,25-dihydroxyvitamin D3 metabolites. Cancer Res. 43, 4443-4447 (1983).
- Koh, E., Morimoto, S., Fukuo, K., Itoh, K., Hironaka, T., Shiraiishi, T., Onishi, T., Kumahara, Y.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation *in vitro*. Life Science 42, 215-223 (1988).
- Lazaretti-Castro, M., Vieira, J. G. H., Raue, F.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces growth of thyroid C cells and inhibits calcitonin secretion *in vitro*. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 451-452.
- Ohta, M., Okabe, K., Ozawa, K., Urabe, A., Takaku, F.: 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) stimulates proliferation of human circulating monocytes *in vitro*. FEBS Lett. 185, 9-13 (1985).
- Billecocq, Agnes, Emanuel, J. R., Levenson, R. Baron, R.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of carbonic anhydrase II in nonerythroid avian bone marrow cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6470-6474 (1990).
- Elstner, Elena, de Vos, S., Pakkala, S., Heber, D., Binderup, Lise, Uskokovic, M., Umiel, Tehila, Koeffler, H. P.: *In vitro* effects of potent vitamin D3 analogs on proliferation and differentiation of seven human breast cancer cell lines. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 441-448.
- Naveilhan, P., Baudet, C., Berger, F., Benabid, A. L., Brachet, P., Wion, D.: Induction of glioma cell death by 1,25 dihydroxyvitamin D3. (In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 644-645).
- Saporito, M. S., Robbins, E., Brown, E., Hartpence, K. C., Battle, J., Vaught, J., Carnswell, S.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor in the brain. In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 629-632.
- Wang, Q. M., Jones, J. B., Studzinski, G. P.: Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. Cancer Res. 56, 264-267 (1996).
- Hazav, P., Shany, S., Moran, A., Levy, Rachel: Involvement of intracellular pH elevation in the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on HL-60 cells. Cancer Res. 49, 72-75 (1989).
- Commes, Therese, Defacque, Helene, Sevilla, C., Yajid, Fatima, Dornand, J., Marti, J.: Differentiation of human myelomonocytic leukemia cell lines by retinoic acid and vitamin D3 analogs, MC903 and EB1089: characterization of cooperative effects. (In: Vitamin D. (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 345-346).
- Wallington, L. A., Bunce, C. M., Durham, J., Brown, G.: Particular combinations of signals by retinoic acid and 1alpha,25dihydroxyvitamin D3, promote apoptosis of HL60 cells. Leukemia 9, 1185-1190 (1995).
- Bunce, C. M., Wallington, L. A., Harrison, P., Williams, G. R., Brown, G.: Treatment of HL60 cells with various combinations of retinoids and 1alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 results in differentiation towards neutrophils or monocytes or a failure to differentiate and apoptosis. Leukemia 9, 410-418 (1995).

31. Studzinski, G. P., Bhandal, A. K., Brelvi, Z. S.: Potentiation by 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 of cytotoxicity to HL-60 cells produced by cytarabine and hydroxyurea. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 641-648 (1986).
32. Xu, H.-M., Tepper, C. G., Jones, J. B., Fernandez, C. E., Studzinski, G. P.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects HL60 cells against apoptosis but down-regulates the expression of the bcl-2 gene. *Exptl. Cell Res.* 209, 367-374 (1993).
33. Eisman, J. A., MacIntyre, I., Martin, T. J., Frampton, R. J., King, R. J. B.: Normal and malignant breast tissue is a target organ for 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D3. *Clin. Endocrinol.* 13, 267-272 (1980).
34. Lang, B. A., Vermousek, I., Šimíčková, M., Černoch, M., Nekulová, M., Pačovský, Z., Reithar, A.: Phylloid breast tumors and three steroid hormone receptors. *Neoplasma* 44, 53-57 (1997).
35. Eisman, J. A., Eisman, J. A., Suva, L. J., Martin, T. J.: Significance of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in primary breast cancers. *Cancer Res.* 46, 5406-5408 (1986). D72
36. Freake, H. C., Abeyasekera, G., Iwasaki, J., Marcocci, C., MacIntyre, I., McClelland, R. A., Skilton, R. A., Easton, D. F., Coombes, R. Ch.: Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in breast cancer and their relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Res.* 44, 1677-1681 (1984).
37. Lang, B. A., Černoch, M., Vermousek, I., Šimíčková, M., Stratil, P., Rejthar, A., Hlávková, J., Sakalová, J., Cely, J.: Complex biochemical analysis of human breast tumor tissue. *Neoplasma* 38, 61-69 (1989).
38. Soule, H. D., Vasquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M.: Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Natl. Cancer Inst.* 51, 1409-1416 (1973).
39. Lippman, M. E., Osborne, C. K., Knazek, R., Young, N.: In vitro model systems for the study of hormone-dependent human breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 296, 154-159 (1977).
40. Eilion, G., Mundy, G. R.: Direct resorption of bone by human breast cancer cells *in vitro*. *Nature* 276, 726-728 (1978).
41. J. A., Martin, T. J., MacIntyre, I., Moseley, J. M.: 1,25-dihydroxyvitamin D receptor in breast cancer cells. *Lancet* II, 1335-1336 (1979).
42. Findlay, D. M., Michelangeli, V. P., Eisman, J. A., Frampton, R. J., Moseley, J. M., MacIntyre, I., Whitehead, R., Martin, T. J.: Calcitonin and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 40, 4764-4767 (1980).
43. Thomas, G. A., Sipson, R. U.: High performance liquid chromatography analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in malignant cells. *Cancer Biochem. Biophys.* 8, 221-234 (1986).
44. Brenner, R. V., Shabahang, M., Schumaker, L. M., Nauta, R. J., Uskokovic, M. R., Evans, S. R., Buras, R. R.: The proliferative effect of vitamin D analogs on MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 92, 77-82 (1995).
45. 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* 129, 832-837 (1991).
46. Nishii, Y., Kubodera, N., Sato, K., Kumaki, K.: Future prospects for vitamin D analogs. In *Vitamin D* (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 64-71.
47. Vink-van Wijngaarden, T., Pols, H. A. P., Binderup, L., Buurman, C. J., van den Bernd, G.-J. C. M., Birkenhäger, J. C., van Leeuwen, J. P. T. M.: Synergic inhibition of breast cancer cell growth by vitamin D3 analogs and tamoxifen. In *Vitamin D* (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 504-505.
48. Lacroix, A., Lippman, M. E.: Binding of retinoids to human breast cancer cell lines and their effects on cell growth. *J. Clin. Invest.* 65, 586-591 (1980).
49. Balaguer, P., Gagne, D., Joyeux, A., Demirpence, E., Pons, M., Nicolas, J.-C.: Antiproliferative and antiestrogenic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and all-trans retinoic acid in breast cancer cells. In: *Vitamin D* (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 345-346.
50. Elstner, E., Linker-Israeli, M., Said, J., Umiel, T., de Vos, S., Shintaku, I. P., Heber, D., Binderup, L., Uskokovic, M., Koeffler, H. P.: 20-epi-vitamin D3 analogues: a novel class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 55, 2822-2830 (1995).
51. Welsh, J., Simboli-Campbell, M., Tenniswood, M.: Induction of apoptotic cell death by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in MCF-7 breast cancer cells. In: *Vitamin D* (eds. A. W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset) de Gruyter, Berlin, New York 1994, pp. 526-527.
52. 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.* 41, 5121-5124 (1981).
53. Lang, B. A., Vermousek, I., Šimíčková, M., Rejthar, A.: The incidence of 1-alpha, 25-dihydroxycholecalciferol receptors in human breast carcinoma tissue. *IRCS Med. Sci. - Biochem.* 15, 1411 (1987).
54. Berger, Uta, Wilson Patricia, McClelland, R. A., Colston, K., Haussler, M. R., Pike, J. W., Coombes, R. Ch.: Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer. *Cancer Res.* 47, 6793-6799 (1987).