

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Jana Tvarůžková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Analogy vitamínu D
a jejich imunomodulační vliv.

Bakalářská práce

Jana Tvarůžková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Ivany Fellnerové, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 25. července 2013

.....

podpis

Souhrn

Vitamín D je již dlouhá léta znám pro svůj pozitivní efekt v léčbě onemocnění způsobených narušením metabolismu vápníku a fosfátu, jako je křivice (rachitis) nebo osteomalacie. Aktuálně se však pozornost stále více zaměřuje na jeho účinky imunomodulační a protinádorové. Vitamín D totiž prostřednictvím svých receptorů, lokalizovaných mimo jiné také v buňkách imunitního systému, indukuje zvýšenou tvorbu některých populací regulačních T-lymfocytů, tlumících rozvoj zánětlivé reakce. Díky těmto svým imunopresivním vlastnostem příznivě působí proti rozvoji autoimunitních onemocnění, mezi která řadíme například lupénku, diabetes mellitus I. typu, roztroušenou sklerózu, alergické reakce, astma či posttransplantační komplikace. Pozitivní vliv vitamínu D byl zjištěn i v případě léčby několika typů rakovinných onemocnění. Tato látka má proto vysoký potenciál jakožto imunomodulační agens, které by mohlo doplnit nebo alespoň částečně nahradit značně rizikovou terapii autoimunitních onemocnění léčivou na bázi kortikoidů. Využití vitamínu D v imunomodulační terapii je však limitováno jeho hyperkalcemickými a hyperfosfatemickými vlastnostmi. Ve snaze tyto nežádoucí účinky eliminovat probíhá vývoj celé řady syntetických analogů vitamínu D, které by měly nejen minimální kalcemické vlastnosti, ale i vyšší léčebnou potenci a účinnost bez závažných doprovodných vedlejších účinků.

Tato práce zahrnuje rozsáhlou literární rešerši, zabývající se imunomodulačními vlastnostmi vitamínu D, a navíc srovnává jeho pět syntetických analogů. Konkrétně se jedná o alfacalcidol, calcipotriol, inecalcitol, tacalcitol a maxacalcitol, které porovnává z hlediska jejich toxicity, účinnosti, kalcemických či fosfatemických vlastností i celkové bezpečnosti. Ačkoli se tyto látky, včetně celé škály dalších, zde nerozebíraných analogů, využívají již celou řadu let v léčbě lupénky v rámci kombinované lokální léčby s kortikoidy, není zatím zcela jasné, který z nich vykazuje nejvyšší terapeutickou účinnost a zároveň nejnižší škálu nežádoucích účinků. Nicméně ačkoli dostupné údaje o jednotlivých zde srovnávaných analogích vitamínu D nejsou zdaleka kompletní, jeví se tyto látky jako reálná budoucnost nejen v léčbě lupénky, ale také dalších imunopatologických onemocnění a rakoviny.

Summary

Vitamin D is known for several years, especially for its uses in the treatment of calcium and phosphate metabolism-related diseases eg. rachitis or osteomalacia. However, the attention of researchers is focused mainly on vitamin's D immunomodulatory and anticancer properties recently. Vitamin D suppresses the T-lymphocytes-induced inflammation and induces the production of suppressor T-lymphocytes via its cytoplasmic receptor in major. In this way, vitamin D eliminates the inflammation which is considered as a high risk factor for the development of serious autoimmune diseases such as psoriasis, diabetes mellitus, multiplex sclerosis, allergy, asthma, or post-transplant complications. It has been also discovered that administration of vitamin D has an positive effect in the cancer treatment. Thus, this substance is considered as a very potent immunomodulatory agent which should replace contemporary dangerous and complicated corticoid-based treatment of the autoimmune diseases. Nevertheless, the hypercalcemic and hyperphosphatic properties of vitamin D limits its uses. This is the reason for the searching for the vitamin D analogues, which are supposed to have higher therapeutic potency without vitamin D-characteristic adverse effects.

This thesis includes all-round review of literature, where immunomodulating properties of vitamin D are discussed and the properties of synthetic vitamin D analogues as well. Concretely, the thesis is aimed on alfacalcidol, calcipotriol, inecalcitol, tacalcitol and maxacalcitol, comparing them with emphasis to their toxicity, effectivity, calcemic and phosphatic properties, and general safety profile. These (and many other) compounds has been used for a long period of time in the combination with corticoids for the treatment of psoriasis, although it has never been established which analogue is the most active and harmless. Despite the fact that the scientific knowledge and the information about the vitamin D analogues is very insufficient, analogues of vitamin D seems to be real agents for the future cure of psoriasis and immunopathologic diseases in general, or even cancer.

Tato bakalářská práce vznikla za podpory projektu CZ.1.07./2.2.00/15.0252 "Kreativní přístup ve výuce fyziologie – integrované (motivační) vzdělávací moduly".

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce RNDr. Ivaně Fellnerové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, podněty, cenné rady a poskytnuté materiály.

Obsah

1	ÚVOD	11
2	CÍLE PRÁCE	13
3	OBEČNÁ CHARAKTERISTIKA VITAMÍNU D	7
3.1	Formy a zdroje vitamínu D.....	7
3.2	Metabolismus vitamínu D	9
3.2.1	Syntéza cholekalciferolu.....	9
3.2.2	Transport cholekalciferolu do jater	10
3.2.3	Vznik 1,25-dihydroxycholekalciferolu.....	11
3.2.4	Regulace metabolismu vitamínu D.....	13
3.3	Mechanismus účinku vitamínu D	20
3.3.1	Výskyt a struktura VDR	20
3.3.2	Genomický mechanismus účinku VDR	21
3.3.3	Negenomický mechanismus účinku VDR.....	24
3.3.4	Buněčná odpověď na aktivaci VDR.....	25
3.3.5	Hladiny 25(OH)D ₃ v krevní plasmě	26
3.3.6	Deficience 25(OH)D ₃	26
3.3.7	Toxicita 25(OH)D ₃	27
4	IMUNOMODULAČNÍ ÚČINKY VITAMÍNU D	28
4.1	Základní mechanismy nespecifické imunitní reakce.....	28
4.1.1	Dendritické buňky	29
4.1.2	Makrofágy	30
4.2	Základní mechanismy specifické imunitní reakce.....	30
4.2.1	T-lymfocyty a jejich subpopulace	31
4.2.2	B-lymfocyty.....	35
4.3	Význam vitamínu D v imunitních reakcích.....	36
4.3.1	Přítomnost VDR v buňkách imunitního systému	36
4.3.2	Obecná interakce vitamínu D s imunitním systémem.....	36

4.4	Imunomodulační mechanismy vitamínu D.....	38
4.4.1	Aktivace VDR dendritických buněk	38
4.4.2	Aktivace VDR makrofágů	38
4.4.3	Aktivace VDR T-lymfocytů	39
4.4.4	Aktivace VDR B-lymfocytů.....	40
4.4.5	Mechanismus inhibice IL-12	42
4.4.6	Mechanismus inhibice NF- κ B a TNF- α	42
4.4.7	Mechanismus inhibice IFN- γ	44
4.4.8	Mechanismus inhibice IL-2	44
4.4.9	Mechanismus inhibice GM-CSF	45
4.4.10	Mechanismus inhibice IL-17	45
5	AUTOIMUNITNÍ A IMUNOPATOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ.....	50
5.1	Běžná onemocnění spojená s deficitem vitamínu D.....	50
5.1.1	Hyperparathyreóza.....	51
5.2	Autoimunitní onemocnění spojená s deficitem vitamínu D	51
5.2.1	Vznik a průběh autoimunitních onemocnění.....	52
5.2.2	Diabetes mellitus I. typu	54
5.2.3	Roztroušená skleróza	55
5.2.4	Idiopatická střevní onemocnění.....	56
5.2.5	Infekční onemocnění	56
5.2.6	Transplantace orgánů.....	56
5.2.7	Lupénka (psoriáza)	57
5.3	Imunopatologická onemocnění a hypersenzitivita	59
5.3.1	Bronchiální astma a alergické projevy	59
5.3.2	Rakovina.....	60
6	IMUNOMODULAČNÍ ÚČINKY ANALOGŮ VITAMÍNU D	64
6.1	Vitamín D a hyperkalcémie.....	64
6.2	Charakteristika analogů vitamínu D	66
6.2.1	Variabilita mezi jednotlivými analogy	67
6.3	Alfacalcidol	70
6.3.1	Odlišnost oproti 1,25(OH) ₂ D ₃	70

6.3.2	Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie	71
6.4	Calcipotriol (calcipotriene).....	71
6.4.1	Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie	72
6.4.2	Imunomodulační účinky	72
6.5	Tacalcitol	73
6.5.1	Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie	73
6.5.2	Imunomodulační účinky	74
6.6	Inecalcitol	74
6.6.1	Odlišnost oproti 1,25(OH) ₂ D ₃	75
6.6.3	Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie	76
6.7	Maxacalcitol	77
6.7.1	Odlišnost oproti 1,25(OH) ₂ D ₃	77
6.7.2	Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie	78
7	ZÁVĚR	79
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	81
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	85
10	PŘÍLOHY	102

1 ÚVOD

Imunitní systém za normálních okolností chrání organismus před cizorodými a infekčními částicemi, likviduje staré či poškozené buňky a zároveň toleruje vlastní nenarušené a plně funkční struktury. Selhání některé z těchto jeho funkcí, stejně jako příliš silná reakce namířená proti cizorodým, ale zcela neškodným částicím, vede k vývoji autoimunitního onemocnění, nádorového bujení nebo různých typů hypersenzitivity. Konkrétně autoimunitní onemocnění jsou výsledkem selhání tolerance vůči vlastním strukturám. Tato „sebevražedná reakce“ buněk se vyskytuje velice často, až u 7 % populace, a to zejména v případě mladých jedinců a žen v reprodukčním věku. Vzhledem k závažným autoimunitním projevům, snižujícím kvalitu života pacientů, a také vzhledem k rizikové skupině se jedná o velmi podstatný problém, který je při pozdní identifikaci obzvláště problematicky léčitelný až neléčitelný. Příznaky počátku onemocnění přitom bývají často velmi nespecifické a snadno přehlédnutelné, což značně komplikuje diagnostiku choroby. Výskyt autoimunitních onemocnění a hypersenzitivních reakcí, a to zejména astmatu a alergií, v posledních několika desítkách let v celé populaci značně stoupl a vybízí tak k hledání účinné a zároveň pro pacienta co nejméně zatěžující léčby.

Vitamín D se vzhledem ke svým imunomodulačním účinkům jeví jako potenciálně účinné léčivo, nebýt komplikací způsobených častým vznikem hyperkalcémie při jeho užívání. Nicméně analogy vitamínu D, u kterých je riziko škodlivého navýšování hladiny sérového vápníku zanedbatelné, se jasně nabízejí jako řešení, a to zejména v kombinaci s kortikoidy. Právě kortikoidy byly dlouhá léta využívány v léčbě příznaků autoimunitních onemocnění, a ačkoli se jedná o extrémně účinné látky, jejich nežádoucí účinky téměř převyšovaly léčebný přínos. K lokální léčbě lupénky se často zároveň předepisoval například dehet či ditranol, jejichž rizikovost není třeba rozvádět. Kombinace analogů vitamínu D s kortikoidy, kdy by analogy podporovaly pozitivní terapeutický efekt kortikoidů a zároveň tlumily jejich nežádoucí účinky, se tedy zdá být průlomová. Nicméně tento objev není žádnou novinkou a předepisování analogů vitamínu D zejména v léčbě lupénky představuje již dlouholetou rutinu. Existuje bezpočet syntetických přípravků nahrazujících doposud používané látky ve snaze původní léčbu co nejvíce zefektivnit a minimalizovat nežádoucí účinky, nicméně hledání optimálního léčebného přípravku představuje značně zdoluhavý a komplikovaný proces. V této práci jsou zpracovány dostupné literární zdroje

týkající se celkem pěti analogů vitamínu D s cílem vzájemného srovnání jak z hlediska terapeutické účinnosti, tak z hlediska eliminace nežádoucích účinků.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat podrobnou literární rešerši, týkající se imunomodulačních účinků vitamínu D a jeho analogů.

První část práce je věnována současnému stavu teoretických i praktických znalostí imunomodulačních účinků vitamínu D, a to zejména z hlediska specifické imunitní reakce. Dále je v práci zrekapitulována s léčebným užitím vitamínu D velmi často spojená problematika hyperkalcémie.

Druhá část literární rešerše se zaměřuje na celkem pět vybraných analogů vitamínu D, využívaných v praxi k léčbě autoimunitních onemocnění. Cílem této části je zmapování dosavadních znalostí o léčebné účinnosti, ale také o nežádoucích účincích, doprovázejících využití analogů vitamínu D v klinické praxi. V neposlední řadě jsou analogy vitamínu D porovnávány v rámci realizovaných klinických studií.

Závěry srovnání budou předány zadávající farmaceutické společnosti Teva Czech Industrie. Zpracovaná literární rešerše tak poskytne základní teoretický přehled, který může pomoci při dalším směřování v oblasti výroby analogů vitamínu D, popřípadě v obohacení portfolia léčebných přípravků sloužících pro léčbu autoimunitních onemocnění.

3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VITAMÍNU D

3.1 Formy a zdroje vitamínu D

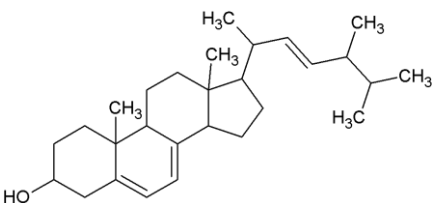
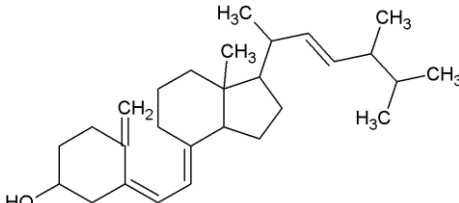
Vitamín D patří mezi vitamíny rozpustné v tucích a z chemického hlediska se jedná o sekosteroidní látku. V organismu působí jako regulátor řady biologických funkcí. V přírodě se vyskytuje ve 2 hlavních formách – jako ergokalciferol (vitamín D₂) a cholekalciferol (vitamín D₃), přičemž D₂ se od formy D₃ chemicky odlišuje pouze přítomností dvojně vazby mezi C22 a C23 a umístěním methylové skupiny na C24, jak lze vidět v Tab. 1 a v Tab. 2 (Jovičić *et al.*, 2012). Další rozdíly spočívají ve schopnosti vazby na transportní vitamín D vazebný protein (DBP, *vitamin D-binding protein*) a v metabolismu, který vyplývá z rozdílného chemického složení postranních řetězců obou forem. Z těchto dvou příčin nevykazuje suplementace vitamínem D₂ stejnou schopnost udržení sérové hladiny 25(OH)D₃ (25-hydroxycholecalciferol, 25-hydroxyvitamín D₃, kalcidiol) v krvi jako stejná dávka D₃, přičemž D₂ navíc rychlost degradace D₃ zvyšuje (Armas *et al.*, 2004). Tkáňové rozdíly v biologické aktivitě D₂ i D₃ jsou naopak zanedbatelné (Bikle, 2009).

Jiná experimentální studie však žádné negativní ovlivnění sérové hladiny 25(OH)D₃ při současném podávání D₂ a D₃ nezaznamenala, stejně jako nepotvrdila negativní ovlivnění katabolismu D₃ a množství 25(OH)D₃ při denní dávce D₂ alespoň 1000 IU (mezinárodní jednotka sloužící k vyjádření množství vitamínů rozpustných v tucích, 1 IU odpovídá 0,025 µg vitamínu D). V tomto případě tedy byla v udržení sérové hladiny 25(OH)D₃ nad průměrnou hodnotou 20 ng/ml stejně účinná jak forma D₂, tak forma D₃ v dávce minimálně 1000 IU (Holick *et al.*, 2008). Otázka jejich rozdílné účinnosti a potence tak stále zůstává zcela neobjasněna.

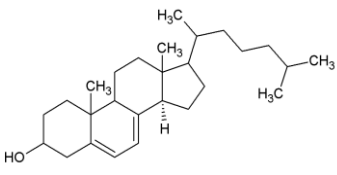
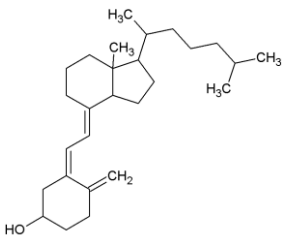
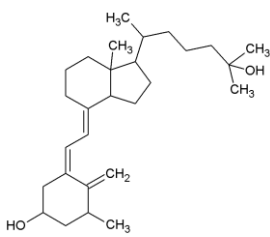
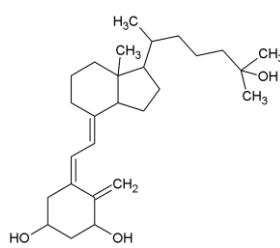
Hlavním zdrojem vitamínu D pro člověka je fotochemická reakce odehrávající se v epidermis, kde dochází k syntéze pre-vitamínu D₃ (pre-D₃) působením fotonů ultrafialové části spektra B (UVB, *ultraviolet B*) slunečního záření. V menší míře mohou být vitamíny D₂ i D₃ získávány z několika druhů potravin, ve kterých se přirozeně vyskytují. Bohatý zdroj vitamínu D₂ představuje zejména olej z tresčích jater a dále ryby s vysokým obsahem tuku, jako jsou sardinky, losos či makrely, méně pak mléko nebo

žloutky. Vitamín D₂ se naopak pouze stopově vyskytuje v obilninách (Holick, 2004) a pomerančové šťávě (Tangpricha *et al.*, 2003). Vzhledem k obrovské kapacitě a schopnosti kůže vyrábět vitamín D je však přiměřené vystavování se slunečnímu záření v naší zeměpisné šířce během jara, léta a podzimu ve většině případů dostačující k pokrytí požadavků na optimální hladinu vitamínu D bez nutnosti užívat doplňky stravy. V průběhu zimních měsíců je produkce vitamínu D již od 35° severní šířky naopak zcela minimální nebo žádná (Holick *et al.*, 2007). Pouhá expozice kůže rukou a obličeje UVB paprskům letního slunce po dobu 10 min zajišťuje v naší zeměpisné oblasti dostatečnou denní dávku vitamínu D, tedy přibližně 15 µg (Lennarz *et al.*, 2004). Po zbytek roku se pak, jakožto vitamín rozpustný v tucích, ukládá zejména v tukové tkáni, ale také v játrech a svalch, odkud dochází v případě potřeby k jeho mobilizaci a následnému využití (Holick, 2004).

Tab. 1. Formy vitamínu D₂.

Vitamín D₂		
Název	Ergosterol	Ergokalciferol
Zdroj	syntéza steroidů	potrava
Funkce	pre-vitamín D ₂	pre-vitamín D ₂
Strukturní vzorec		

Tab. 2. Formy vitamínu D₃.

Vitamín D ₃				
Název	7-Dehydrocholesterol	Cholekalciferol	Kalcidiol	Kalcitriol
			25(OH)D ₃	1,25(OH) ₂ D ₃
Zdroj	syntéza cholesterolu	expozice kůže UVB záření, potrava	metabolismus	metabolismus
Funkce	pre-vitamín D ₃	pre-vitamín D ₃	plasmatická forma D ₃	biologicky aktivní forma D ₃
Strukturní vzorec				

3.2 Metabolismus vitamínu D

3.2.1 Syntéza cholekalciferolu

Proces biosyntézy vitamínu D u člověka závisí na expozici UVB složce slunečního záření, kdy dochází k absorpci fotonů 7-dehydrocholesterolem a 8-dehydrocholesterolem v kůži (Rojas-Rivera *et al.*, 2010). Tyto dvě modifikace cholesterolu, vzniklé během jeho syntézy *de novo* (Bouillon *et al.*, 2008), se vyskytují v plasmatických membránách epidermálních buněk (Holick *et al.*, 2007) v koncentraci, pro kterou je kritická přítomnost enzymu 7DHC- Δ 7-reductasy (Bouillon *et al.*, 2008).

Vlivem absorpce fotonů o vlnové délce 290 – 315 nm (Holick *et al.*, 2007) dochází k rozpojení B kruhu 7-dehydrocholesterolu mezi C9 a C10 (Bikle, 2009). Toto by za normálních okolností vedlo ke vzniku 2 konformací pre-D₃, a to nejprve 5,6-cis,cis (cZc), který z důvodu své vysoké nestability způsobené sterickou interferencí vyvolanou

methylovou skupinou na C19 následně rotuje na konformaci 5,6-trans,cis (tZc). Vzhledem k tomu, že vitamín D₃ může vzniknout pouze z konformace cZc, došlo k vyřešení tohoto problému vmezeřením 7-dehydrocholesterolu přímo mezi polární a nepolární skupiny do fosfolipidové dvojvrstvy plasmatické membrány, což zabraňuje rotaci cZc formy na tZc a zároveň umožňuje mnohem rychlejší a efektivnější přeměnu pre-D₃ na vitamín D₃. Nestabilní, termocitlivá cZc konformace pre-D₃ tak okamžitě po svém vzniku tepelně izomeruje na cholekalciferol (Holick, 2004).

Přeměna 7-dehydrocholesterolu na pre-D₃ není katalyzována enzymy. Rozhodující roli hraje pouze intenzita UVB a stupeň pigmentace kůže, kdy přítomnost velkého množství melaninu produkci pre-D₃ svou schopností absorbovat UVB snižuje. Intenzita UVB závisí na faktorech zahrnujících roční období, zeměpisnou šířku, povrch těla zahalený oblečením či pokrytý opalovacím krémem (Bikle, 2009) a nadmořskou výškou. Zaznamenán byl také vliv stárnutí (Holick *et al.*, 2007).

Téměř stejným způsobem dochází k produkci vitamínu D₂ (ergokalciferolu) také v rostlinách, kvasinkách a houbách, ačkoli D₂ zde na rozdíl od D₃ vzniká z ergosterolu (Holick *et al.*, 2007).

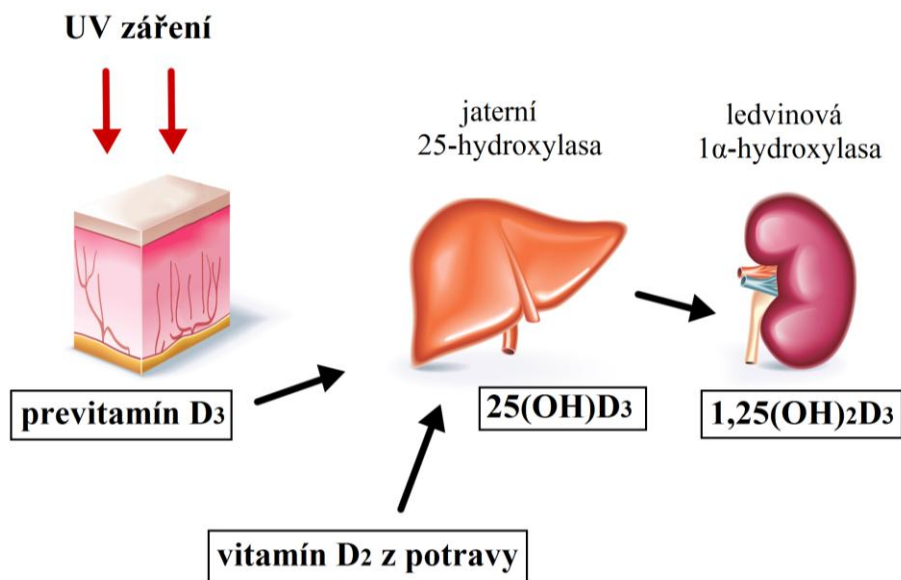
3.2.2 Transport cholekalciferolu do jater

Po transformaci pre-D₃ na cholekalciferol je k dalším metabolickým procesům nezbytný transport produktu z plasmatické membrány do extracelulárního prostředí, což mohlo v minulosti vést ke zvýšení permeability membrány pro Ca²⁺ a tím k posílení transportu těchto iontů do buňky a představovat tak příčinu evoluční změny v propustnosti membrán v souvislosti s vlivem slunečního záření na metabolismus vápníku (Holick *et al.*, 2007).

Cholekalciferol se v extracelulárním prostředí váže na transportní plasmatické proteiny, a to zejména na DBP, který umožňuje přenos cholekalciferolu do kožního kapilárního řečiště, popřípadě transport ergokalciferolu z gastrointestinálního traktu do krve, odkud dochází k jeho proudění do jater (Holick *et al.*, 2007). DBP je strukturně i evolučně podobný albuminu a kromě vysoké afinity pro 25(OH)D₃ navíc umožňuje depolymerizaci a vazbu aktinu (Bouillon *et al.*, 2008).

3.2.3 Vznik 1,25-dihydroxycholecalciferolu

Vznik metabolicky aktivní formy vitamínu D umožňuje dvojí hydroxylace cholecalciferolu, konkrétně v pozicích 25 a 1 α . Enzymy, umožňující tuto systémovou přeměnu prekurzorů na aktivní metabolit vitamínu D, jsou lokalizovány v orgánech zachycených na Obr. 1. K primární hydroxylaci, vedoucí ke tvorbě 25(OH)D₃, dochází prostřednictvím jaterního enzymu 25-hydroxylasy, náležící mezi monooxygenasy cytochromu P450. Jedná se konkrétně o mikrosomální isoformy CYP2D2, CYP2D5, CYP3A4 a CYP2R1 a mitochondriální CYP27A1 (Bouillon *et al.*, 2008). Ačkoli je nejvíce pozornosti věnováno isoformě CYP27A1 (Bikle, 2009), pravděpodobnějším, pro hydroxylaci klíčovým enzymem se jeví být CYP2R1. CYP27A1 totiž hraje důležitější roli v metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin a jeho 25-hydroxylasová aktivita je pouze slabá (Cheng *et al.*, 2004). Deficience CYP27A1 navíc nevykazuje žádný vliv na hladinu 25(OH)D₃ (Jovičić *et al.*, 2012). Naopak jediný CYP2R1 má schopnost katalyzovat tuto hydroxylaci na 25(OH)D₃ *in vivo* (Zhu *et DeLuca*, 2012). Pro všechny tyto enzymy cytochromu P450 je typická různá substrátová specifita pro vitamín D₂ a D₃ (Bikle, 2009).



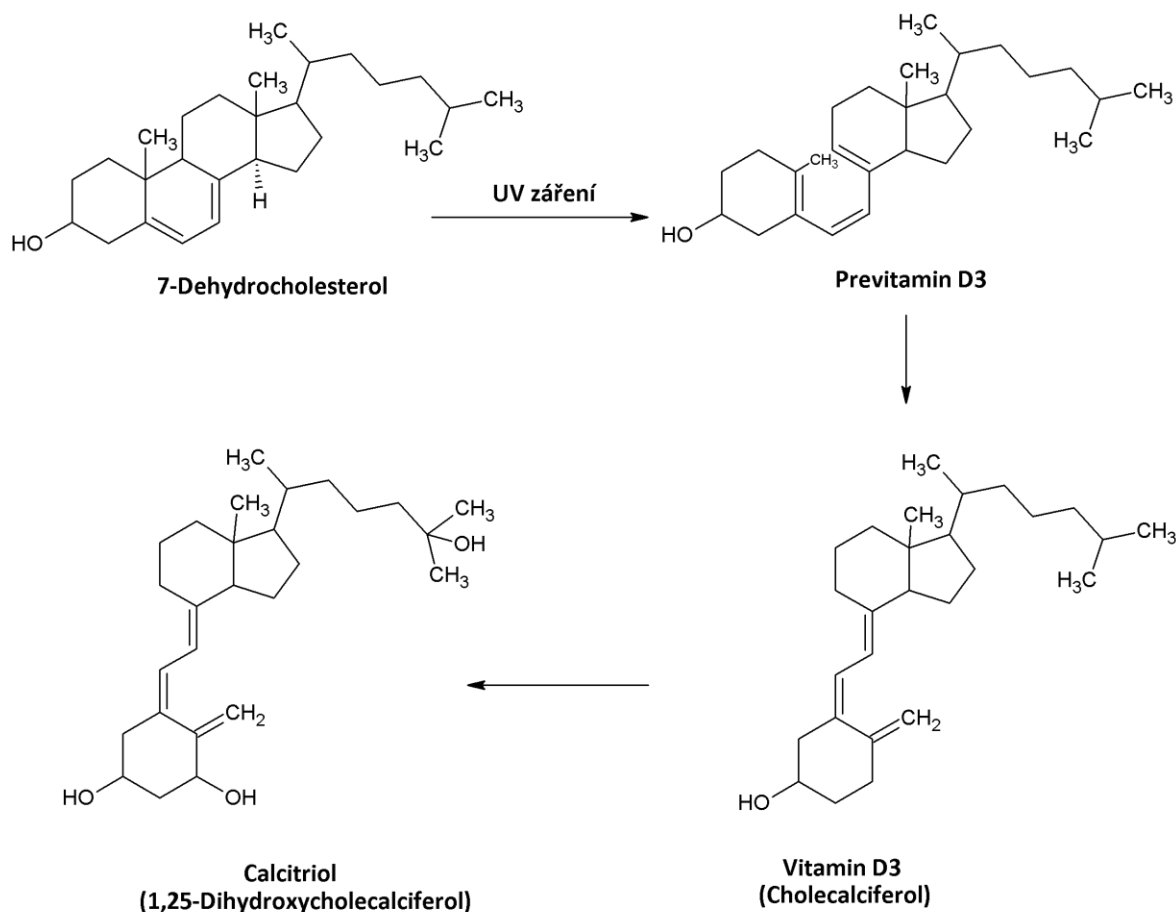
Obr. 1. Lokalizace enzymů pro přeměnu prekurzorů vitamínu D na aktivní formu. Za přítomnosti UV záření vzniká v kůži z cholesterolových prekurzorů pre-vitamín D₃, který je následně krví transportován do jater, stejně jako vitamín D₂ přijatý z potravy. V játrech dochází v procesu primární hydroxylace, katalyzované zde přítomným enzymem

25-hydroxylasou, ke vzniku 25(OH)D₃, který se pak opětovně uvolňuje do krve. Sekundární hydroxylace v pozici 1 α probíhá v ledvinách, kde 1 α -hydroxylasa přeměňuje 25(OH)D₃ na aktivní metabolit vitamínu D 1,25(OH)₂D₃, zprostředkovávající účinek tohoto vitamínu na úrovni buněk. Zkratky: 1,25(OH)₂D₃ – kalcitriol; 25(OH)D₃ – kalcidiol.

25(OH)D₃ obsažený v krevní plasmě představuje významný a velmi spolehlivý ukazatel množství vitamínu D v lidském organismu, neboť se jeho hladina zvyšuje úměrně s hladinou metabolicky aktivní formy, a využívá se tak k diagnostickému stanovení zásobení organismu vitamínem D. Vznik 25(OH)D₃ z cholekalciferolu je proces pomalý, trvající 5 – 7 dní, a jeho poločas rozpadu činí přibližně 15 dní (Rojas-Rivera *et al.*, 2010).

Před sekundární hydroxylací opouští 25(OH)D₃ játra spolu s krví, ve které je opět navázán na DBP (Rojas-Rivera *et al.*, 2010). Hydroxylaci v poloze 1 α katalyzuje mitochondriální enzym 1 α -hydroxylasa (CYP27B1), vyskytující se zejména v buňkách proximálního tubulu ledvin. Zde totiž CYP27B1 zajišťuje endokrinní (systémovou) produkci tohoto hormonu. Vedle toho se pak CYP27B1 nachází v celé řadě dalších zdravých i patologických buněk, a to v monocytech, buňkách kostní tkáně, placentě (Bouillon *et al.*, 2008), makrofázích, keratinocytech, buňkách epitelu plic a tlustého střeva (Jovičić *et al.*, 2012), β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (Bland *et al.*, 2004), buňkách mléčné žlázy (Welsh, 2007), brzlíku, vlasových folikulů, mozkové kůry, mozečku, lymfatických uzlin či v buňkách nadledvin (Zehnder *et al.*, 2001). Působení tohoto enzymu zde tak může být jak parakrinní, tak apokrinní (Bouillon *et al.*, 2008). Výskyt CYP27B1 byl rovněž zaznamenán v příštítých těliscích, kde plní jednoznačně funkci intrakrinní a parakrinní (Segersten *et al.*, 2002). Mutace enzymu CYP27B1 neumožňuje hydroxylaci 25(OH)D₃, což zejména u dětí způsobuje vznik vitamínu D rezistentní křivice (rachitis) I. typu (Lennarz *et al.*, 2004).

Ve výsledku vzniká konečná, metabolicky aktivní forma vitamínu D – 1,25(OH)₂D₃ (1,25-dihydroxyvitamín D₃, 1,25-dihydroxycholekalCIFerol, kalcitriol), jehož poločas rozpadu se pohybuje mezi 4 – 7 hodinami (Rojas-Rivera *et al.*, 2010). Celý chemický proces přeměny 7-dehydrocholesterolu na 1,25(OH)₂D₃ zachycuje sled reakcí na Obr. 2.



Obr. 2. Přeměna 7-dehydrocholesterolu na 1,25(OH)₂D₃ v lidském těle. Působením fotonů UV záření dochází k rozpojení B kruhu v kůži přítomného 7-dehydrocholesterolu mezi C9 a C10 za místního vzniku pre-vitamínu D₃. Ten okamžitě spontánně izomeruje na cholecalciferol. Cholecalciferol následně podléhá dvojí hydroxylaci, a to nejprve připojením OH-skupiny v poloze 25 a následně v poloze 1 α . Výsledkem této chemické reakce, odehrávající se v odlišných orgánech, je aktivní forma vitamínu D, tedy 1,25(OH)₂D₃ neboli kalcitriol.

3.2.4 Regulace metabolismu vitamínu D

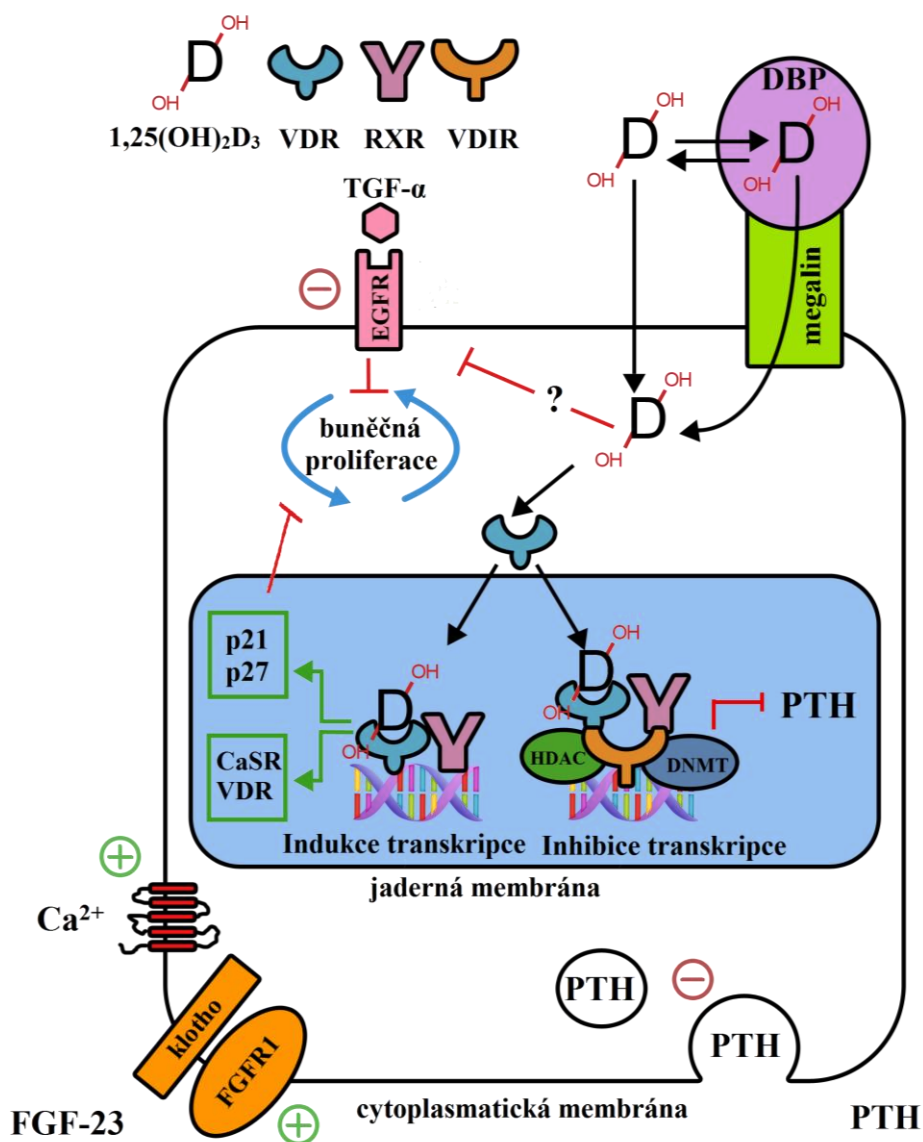
Regulace procesů vedoucích k přeměně pre-D₃ na aktivní metabolit 1,25(OH)₂D₃ zahrnuje několik mechanismů, a to vznik inaktivních produktů při nadměrné expozici slunečnímu záření, reakci na krevní hladinu parathormonu (PTH), přítomnost fibroblastového růstového faktoru 23 (FGF-23, *fibroblast growth factor 23*), koncentraci Ca²⁺ a fosforu a také na množství již vytvořeného 1,25(OH)₂D₃ (Lennarz *et al.*, 2004).

Dlouhodobá expozice slunečnímu záření nevede k toxickému zvýšení hladin cholekalciferolu při maximální nasycenosti tkáně. V tomto případě dochází k fotokonverzi pre-D₃ na biologicky inaktivní nekalcemické produkty lumisterol a tachysterol. Tento proces je reverzibilní, a tak při poklesu hladiny pre-D₃ v kůži nastává zpětná přeměna lumisterolu a tachysterolu na pre-D₃ a jeho následná izomerace na cholekalciferol. Stejně tak již vytvořený 1,25(OH)₂D₃ vykazuje schopnost přeměny při nadměrné expozici slunečnímu záření na inertní nekalcemické látky suprasterol I, suprasterol II a 5,6-transvitamín D₃ (Bikle, 2009).

Další, velmi důležitý stupeň regulace tvorby 1,25(OH)₂D₃ se týká aktivity enzymu CYP27B1, který zajišťuje sekundární hydroxylaci 25(OH)D₃ v poloze 1 α , odehrávající se v proximálním tubulu ledvin. CYP27B1 hraje klíčovou roli v udržování homeostázy Ca²⁺ v lidském organismu, za kterou odpovídá zejména PTH syntetizovaný příštítnými tělisky prostřednictvím své vazby na receptory pro Ca²⁺, a to spolu s působením hormonu kalcitoninu a právě 1,25(OH)₂D₃ (Jovičič *et al.*, 2012). PTH se uvolňuje při hypokalcémii a aktivací receptorů osteoblastů zvyšuje odbourávání Ca²⁺ z kostí. V ledvinách zároveň prostřednictvím své vazby na receptory nefronů PTH podporuje reabsorpci Ca²⁺ (Lennarz *et al.*, 2004) a exkreci fosfátu. Snížená hladina fosfátu v krevní plasmě totiž inhibuje vylučování Ca²⁺ ve formě kostního minerálu. V případě hyperkalcémie pak nastává aktivace hormonu kalcitoninu, produkovaného C-buňkami štítné žlázy, který hladinu Ca²⁺ potlačením činnosti osteoblastů naopak snižuje. V buňkách proximálního tubulu (Bikle, 2009) představuje právě PTH hlavní aktivátor exprese CYP27B1 v reakci na nízkou hladinu cirkulujícího Ca²⁺, což vede ke zvýšení plasmatické hladiny 1,25(OH)₂D₃ přeměnou z 25(OH)D₃. Stejný enzym rovněž ovlivňuje kalcitonin, inhibující hydroxylaci 25(OH)D₃ a udržující tak nižší hladinu 1,25(OH)₂D₃ v krvi (Lennarz *et al.*, 2004). 1,25(OH)₂D₃ následně svou vazbou na receptory pro vitamín D (VDR, *vitamin D receptor*) způsobuje vyrovnaní hladiny Ca²⁺ v krvi (Jones *et al.*, 2012), a to prostřednictvím ovlivnění tří procesů. Jedná se o stimulaci aktivního vychytávání Ca²⁺ střevními epitelárními buňkami, kde je Ca²⁺ přenášen skrz apikální kalciové kanály typu TRPV (*transient receptor potential vanilloid*), a to konkrétně zde exprimované subtypy TRPV6 a méně také TRPV5. Následuje buněčný transport těchto iontů ve vazbě na calbindin, tedy cytoplasmatický Ca²⁺ vazebný protein (CaBP, *calcium-binding protein*). Konečné aktivní odčerpání Ca²⁺ z buněk do krve, odehrávající se v basolaterální části cytoplasmatické membrány, umožňují enzymy vápníková adenosin trifosfatasa (ATPasa, *adenosin*

triphosphatase) a sodnodraselná pumpa (Bouillon *et al.*, 2003). Ačkoli je výsledkem signalizace PTH vzestup sérového Ca^{2+} a pokles sérového fosfátu, v konečném důsledku vede působení $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ k nárůstu obou těchto parametrů, čehož je dosaženo řadou zpětnovazebných okruhů. Nakonec se tedy jak PTH, indukující syntézu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v proximálním tubulu, tak $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podílejí na zvyšování plasmatických hladin Ca^{2+} . $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ však následně sekreci PTH potlačuje (Silver *et al.*, 1986). Kromě tohoto mechanismu hladinu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rovněž reguluje samotná koncentrace Ca^{2+} a fosfátu jakožto signálních molekul, a to jinými, odlišnými mechanismy závislými i nezávislými na PTH (Jovičić *et al.*, 2012).

Regulační látku přítomnou v kostech i proximálním tubulu představuje FGF-23. Působení tohoto hormonu nejenže způsobuje inhibici exprese PTH v příštítných tělískách, ale spolu s membránovým peptidem klotho dále ovlivňuje fosfaturii, tedy vylučování fosfátu močí, a jedná se navíc o významný inhibitor aktivity enzymu CYP27B1. Jak lze vidět na Obr. 3, nadprodukce FGF-23 tedy vede k rapidnímu snížení hladiny $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v krevní plasmě (Jones *et al.*, 2012). Na stimulaci či inhibici exprese CYP27B1 se dále rovněž podílí samotná hladina již vytvořeného $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a to prostřednictvím vazby VDR na vitamín D responzivní element (VDRE), přičemž rostoucí koncentrace $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ expresi CYP27B1 snižuje (Bikle, 2009).



Obr. 3. Funkce 1,25(OH)₂D₃ v buňkách příštítných tělísek. 1,25(OH)₂D₃ prostupuje do buňky volnou difúzí přes cytoplasmatickou membránu a následně se v cytoplasmě, popřípadě v buněčném jádře, váže na VDR. Buňky příštítných tělísek navíc ve své cytoplasmatické membráně obsahují megalin, receptor stimulující v přítomnosti Ca²⁺ vychytávání steroidních hormonů buňkami. Megalin váže komplex 1,25(OH)₂D₃ a DBP a z něj pak do buňky uvolňuje 1,25(OH)₂D₃, který se následně navazuje na VDR. Aktivovaný VDR dimerizuje s RXR a v jádře se ve formě heterodimeru váže buď na VDRE promotoru 1,25(OH)₂D₃ regulovaného genu, nebo na konzervativní sekvenci E-boxu navázaný VDIR. Vazba na VDRE vyvolává inhibici buněčné proliferace indukci exprese proteinů buněčného cyklu p21 a p27 a současně zvyšuje citlivost parathyroidní buňky na hladiny Ca²⁺ a FGF-23, a to stimulací exprese membránových proteinů CaSR

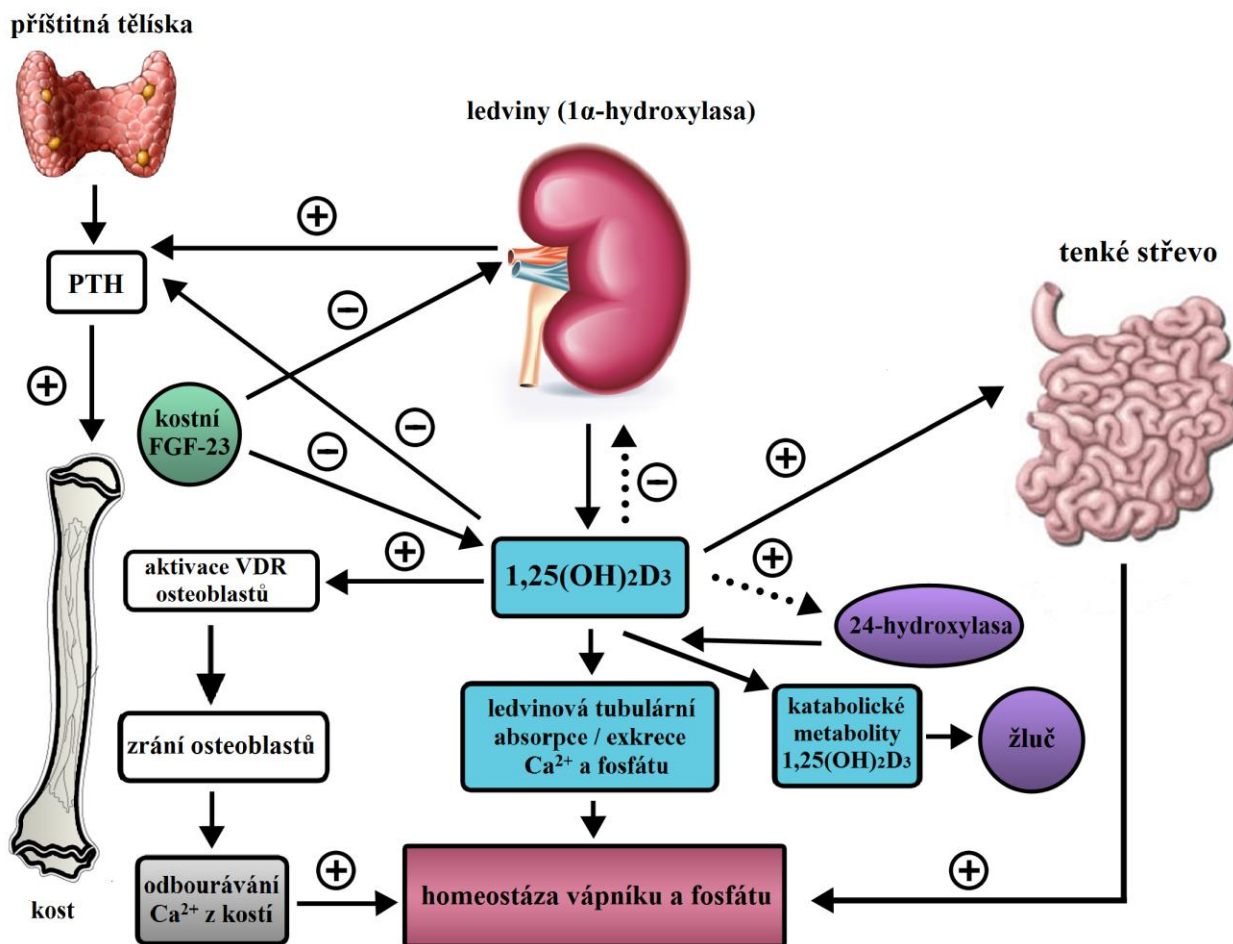
a klotho. Vedle toho stoupá i množství exprimovaných VDR v buňce. Interakce mezi VDR-RXR a VDIR pak rekrutuje represory transkripce genu pro pre-pro-PTH, a to HDAC a DNMT, což vede k inhibici syntézy PTH. Proces na VDR nezávislý navíc brzdí proliferaci parathyroidních buněk potlačením exprese receptoru EGFR pro TGF- α . Zkratky: 1,25(OH) $_2$ D $_3$ – kalcitriol; CaSR – kalciový receptor; DBP – vitamín D vazebný protein; DNMT – DNA-methyltransferasa; E-box – *enhancer box*; EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor; FGF-23 – fibroblastový růstový faktor 23; HDAC – histonová deacetylaza; PTH – parathormon; RXR – retinoidní X receptor; TGF- α – transformující růstový faktor α ; VDIR – *VDR interacting repressor*; VDR – receptor pro vitamín D; VDRE – vitamín D responzivní element.

Důležitou regulační funkci hraje rovněž mitochondriální enzym 24-hydroxylasa, jejíž produkci indukuje samotný 1,25(OH) $_2$ D $_3$ navýšením transkripce příslušného genu (Jovičić *et al.*, 2012). 24-hydroxylasa zprostředkovává hydroxylaci v pozici 24 vedoucí ke vzniku degradovaných produktů vitamínu D. Jedná se konkrétně o konverzi 25(OH)D $_3$ na 24,25(OH) $_2$ D $_3$ a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ na 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$. 24-hydroxylasa se skládá ze tří podjednotek, a to z ferredoxinu, ferredoxin reduktasy a CYP24A1, který zodpovídá za katalýzu hydroxylace. Indukce CYP24A1, zapříčiněná zvýšeným množstvím 1,25(OH) $_2$ D $_3$ nebo 25(OH)D $_3$, pravděpodobně zabraňuje nadměrné aktivaci VDR v cílových buňkách. CYP24A1 se vyskytuje jak v ledvinách, kde reguluje množství 25(OH)D $_3$ hydroxylovaného na 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a zároveň množství 1,25(OH) $_2$ D $_3$ transportovaného do konkrétní tkáně, tak v cílových buňkách. Zde pak ovlivňuje vazbu aktivního metabolitu vitamínu D na VDR. Výsledný efekt CYP24A1 v ledvinách proto musí být v rovnováze s činností CYP27B1, katalyzujícího přeměnu 25(OH)D $_3$ na 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Míra indukované exprese CYP24A1 prostřednictvím 1,25(OH) $_2$ D $_3$ se snižuje v přítomnosti PTH, který zapříčiňuje destabilizaci nebo zvýšené odbourávání tohoto enzymu, a to prostřednictvím signální dráhy cyklického adenosin monofosfátu / protein kinasy A (cAMP / PKA, *cyclic adenosine monophosphate / protein kinase A*) signální dráhy v ledvinách. Opačný efekt tato dráha způsobuje v osteoblastech, kde je naopak míra exprese CYP24A1 zvýšena (Jones *et al.*, 2012).

Obecně se regulace množství 1,25(OH) $_2$ D $_3$ v jednotlivých tkáních s výjimkou ledvin liší. V buňkách makrofágů hladinu tohoto substrátu řídí pravděpodobně jeho dostupnost,

přičemž zde regulace CYP27B1 nezávisí na PTH ani FGF-23 z důvodu absence dostatečného počtu receptorů pro tyto dvě látky. Vedle toho v makrofázích dochází k alternativnímu sestříhu pre-mRNA CYP27B1, což vede ke vzniku cytoplasmatické intaktní formy CYP27B1, snižující množství vzniklých 24-hydroxylátů 25(OH)D₃ a 1,25(OH)₂D₃ omezením kontaktu mezi 1,25(OH)₂D₃ a CYP24A1. Indukce CYP27B1 dále nastává aktivací makrofágů a keratinocytů prostřednictvím *toll-like receptors* (TLR) (Bikle, 2009). Celkový přehled regulace a metabolismu vitamínu D v lidském organismu znázorňuje Obr. 4.

Po zahrnutí hormonů ovlivňujících výše zmíněné látky řídící hladiny 1,25(OH)₂D₃ v krevní plasmě řadíme mezi pozitivní regulátory Ca²⁺, PTH, kalcitonin, somatotropin a *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), a mezi negativní regulátory potom fosfor, FGF-23 a 1,25(OH)₂D₃ (Bouillon *et al.*, 2008).



Obr. 4. Regulace metabolismu vitamínu D. Na regulaci metabolismu vitamínu D se podílí zejména Ca^{2+} , fosfor, PTH, FGF-23 a množství již vytvořeného $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Příštitnými tělísky produkovaný PTH zvyšuje odbourávání kostního Ca^{2+} prostřednictvím stimulace zrání osteoblastů, podporuje vstřebávání Ca^{2+} v tenkém střevě a stimuluje reabsorpci Ca^{2+} ledvinovými tubuly a zároveň exkreci fosfátu, což vede k nárůstu plasmatické hladiny Ca^{2+} . PTH dále stimuluje aktivitu ledvinové 1α -hydroxylasy a zvyšuje tak produkci $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Tento aktivní metabolit vitamínu D působí zpětnovazebně, kdy se zvyšující se hladinou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potlačuje aktivitu 1α -hydroxylasy. Zároveň pak vazbou na VDR stimuluje produkci PTH a podílí se tedy na procesech vedoucích k nárůstu plasmatické hladiny Ca^{2+} . $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rovněž indukuje expresi enzymu 24-hydroxylasy, katalyzujícího přeměnu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na inaktivní katabolické metabolity, které jsou následovně odstraňovány žlučí. FGF-23 snižuje množství $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a potlačuje aktivitu 1α -hydroxylasy. Zkratky: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – calcitriol; FGF-23 – fibroblastový růstový faktor 23; PTH – parathormon; VDR – receptor pro vitamín D.

3.3 Mechanismus účinku vitamínu D

Vitamín D je k cílovým buňkám přenášen enterohepatálním oběhem. Zatímco DBP s vysokou afinitou váže zejména prekurzory i degradované formy $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, jeho schopnost vázat biologicky aktivní formu vitamínu D je poměrně slabá. Metabolity vitamínu D transportují částečně také lipoproteiny či jiné albuminy než DBP, nicméně samotný $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se v krevním séru vyskytuje v hojné míře volně. Pro srovnání, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ má přibližně 100× vyšší afinitu k VDR než $25(\text{OH})\text{D}_3$, nicméně koncentrace $25(\text{OH})\text{D}_3$ v krevní plasmě dosahuje až 1000× vyšších hodnot (Rojas-Rivera *et al.*, 2010).

Před interakcí s cílovou buňkou se $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ z případné vazby na DBP uvolní. Vzhledem ke dvojí buněčné lokalizaci VDR, a to cytoplasmatické a membránové, následují dvě možnosti vazby na tento receptor a současně tak dva typy jeho intracelulárního účinku – genomický a negenomický. Největší část $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ díky svému lipofilnímu charakteru vstupuje do buněk volnou difúzí přes fosfolipidovou dvojvrstvu cytoplasmatické membrány a v cytoplasmě se následně váže na intracelulární VDR, zprostředkovávající genomický účinek tohoto agonisty. Intracelulární VDR se rovněž nalézá v karyoplasmě buněčného jádra. Výrazně menší množství $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se naopak váže na VDR integrovaný do cytoplasmatické membrány, ačkoli je tento způsob daleko rychlejší a k aktivaci negenomické signální dráhy tak dochází doslova okamžitě. Cytoplasmatický VDR totiž z důvodu modulace exprese cílových genů zprostředkovává výslednou buněčnou odpověď daleko pomaleji, a to většinou v rámci několika hodin (Haussler *et al.*, 2011).

3.3.1 Výskyt a struktura VDR

VDR se řadí do superrodiny steroidních / thyroidních hormonálních receptorů a díky jeho velikosti čítající 427 aminokyselin patří mezi nejmenší z receptorů této superrodiny. Jedná se o transkripční faktor aktivovaný ligandem (Lennarz *et al.*, 2004). Na základě molekulárních analýz u něj byla potvrzena příslušnost ke třídě receptorů lokalizovaných v buněčném jádře (Bouillon *et al.*, 2008), nicméně v případě absence ligandu se většina VDR vyskytuje v cytoplasmě. Tyto receptory jsou v menší či větší míře exprimovány prakticky v buňkách všech tkání včetně buněk nádorových, z čehož vyplývá široká škála

účinků vitamínu D. Výjimku představují pouze některé vysoce diferencované buňky mozku, a to Purkyňovy buňky v mozečku a CH4 cholinergní neurony Meynertova jádra (*nucleus basilaris*), malé oblasti šedé hmoty mozkové (Eyles *et al.*, 2005). Jako jediný z jaderných receptorů VDR netvoří žádné subtypy (Lennarz *et al.*, 2004).

Trojrozměrná struktura VDR sice dosud nebyla zcela identifikována, nicméně na základě jiných, sekvenčně příbuzných jaderných receptorů ji částečně popsat lze. Mezi hlavní komponenty VDR patří ligand-vazebná doména (LBD, *ligand-binding domain*), DNA-vazebná doména (DBD, *DNA-binding domain*), nacházející se v blízkosti N-konce, a transaktivační doména (TAD, *trans-activating domain*) (Rachez *et Freedman*, 2000). DBD specificky rozpoznává a s vysokou afinitou váže promotorovou oblast VDRE, blízce sousedící s $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulovaným genem, kde později dochází k iniciaci transkripce daného genu a k její regulaci (Takeyama *et al.*, 1999). LBD, skládající se ze 12 – 14 helixů, pak umožňuje navázání ligandu na ligand-vazebnou kapsu (LBP, *ligand-binding pocket*) (Brzozowski *et al.*, 1997). Pro vazbu koregulačních molekul (transkripčních faktorů) jsou u většiny jaderných receptorů přítomny na LBD dvě transaktivační (dimerizační) domény označované jako *activation function* (AF), a to konkrétně AF-1 na N-konci a AF-2 na C-konci (Takeyama *et al.*, 1999). V případě VDR, který má oproti ostatním receptorům N-koncovou oblast zkrácenou, však AF-1, tedy na hormonu nezávislá (konstitutivní) doména, chybí. Proto zde interakce s koregulátory probíhá pouze v rámci AF-2. Hlavní stavební prvky AF-2 domény představují amfipatické α -helixy (Lennarz *et al.*, 2004). Mimo to je LBD důležitým komponentem pro heterodimerizaci s jedním ze tří typů retinoidních X receptorů (RXR) – RXR- α , RXR- β nebo RXR- γ – a následnou transkripci daného genu (Rachez *et Freedman*, 2000).

3.3.2 Genomický mechanismus účinku VDR

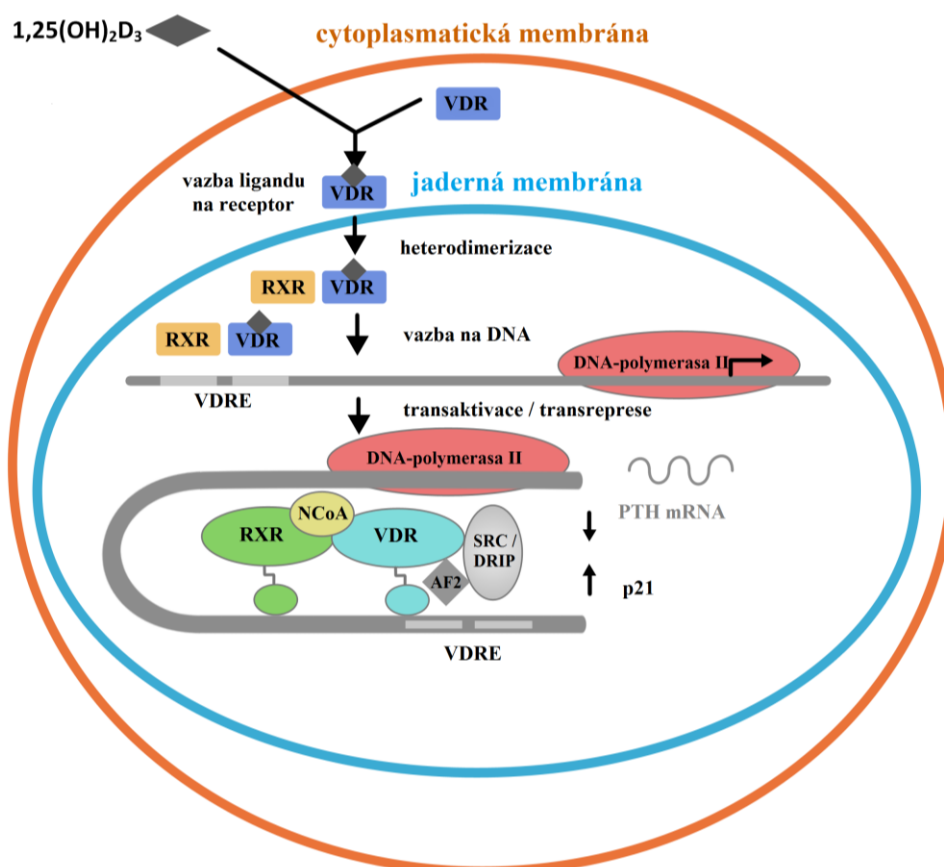
Velmi komplikovaný proces spuštění genové exprese schématicky popisuje Obr. 5. Po vazbě agonisty na VDR dochází k připojení receptoru RXR za vzniku heterodimeru VDR-RXR. Agonistou RXR je kyselina *all-trans*-retinová, nicméně v případě tvorby dimeru s jiným receptorem musí být RXR volný. Komplex VDR-RXR následně translokuje do jaderné oblasti, kde se váže na VDRE lokalizovaný v promotorové oblasti cílového genu ovlivňovaného $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Vzhledem k tomu, že se RXR, stejně jako

VDR, nachází současně i v jádře, k heterodimerizaci může docházet taktéž zde. VDRE má motiv opakovaných sekvencí DR-3 (*direct repeats-3*) oddělených třemi dusíkatými bázemi (Nagpal *et al.*, 2005). Vazba VDR-RXR na VDRE musí zachovávat danou funkční polaritu, kdy VDR zaujímá polovinu vazebného místa čítající N-konec, zatímco RXR se váže na polovinu zakončenou C-koncem. Na VDRE se však rovněž nespécificky váží další dva jaderné receptory, a to pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR, *constitutive androstane receptor*) v podobě heterodimerů PXR-RXR a CAR-RXR. Tyto receptory spojuje s VDR schopnost vázat metabolity žlučových kyselin a aktivovat enzymy cytochromu P450 zodpovědné za detoxifikaci xenobiotik. Na druhou stranu však vazba PXR a CAR do VDRE ovlivňuje činnost enzymů zprostředkovávajících účinky vitamínu D (Lennarz *et al.*, 2004). Po interakci VDR-RXR s VDRE nastává rekrutace několika specifických koregulačních proteinů (koregulatorů), a to koaktivátorů či korepresorů, rozhodujících o aktivaci či represi konkrétního cílového genu. O výsledné expresi pak rozhoduje celková bilance těchto proteinů (Rojas-Rivera *et al.*, 2010).

Proces aktivace genové exprese vyžaduje přítomnost koaktivátorů, tedy proteinů zesilujících aktivitu transkripčních faktorů (Rachez *et Freedman*, 2000), které prostřednictvím modifikace histonů a rekrutace iniciačních transkripčních faktorů spouštějí přestavbu chromatinu (Rachez *et al.*, 2000). Koaktivátory VDR náleží do proteinové rodiny p160. Konkrétně se jedná o dvě třídy proteinů, a to o koaktivátory steroidních receptorů (SRC, *steroid receptor coactivator*), čítající koaktivátory SRC-1, SRC-2 a SRC-3, a dále s VDR interagující protein 205 (DRIP 205, *vitamin D receptor interacting protein*) (Rachez *et Freedman*, 2000). Tyto dvě třídy koaktivátorů se však na VDR neváží současně a navíc se liší svou tkáňovou lokalizací, neboť aktivita různých genů je řízena různými koaktivátory. Zatímco DRIP převažuje například v proliferujících keratinocytech, SRC-3 se nalézá spíše v keratinocytech již diferencovaných (Oda *et al.*, 2003). V případě vazby ligandu na VDR koaktivátory třídy SRC interagují s AF-2 v blízkosti helixu 12 (H12) na LBD (Brzozowski *et al.*, 1997), čímž zprostředkovávají následnou rekrutaci proteinu vázajícího responzivní element pro cyklický adenosin monofosfát (CREB, *cAMP response element-binding protein*), histonové acetyltransferasy (HAT) a metyltransferasy. Tento proces vede k destabilizaci chromatinu, což umožňuje zahájení transkripce daného genu. Acetylace histonů navíc pravděpodobně zlepšuje dostupnost promotoru (Rachez *et Freedman*, 2000). Naopak iniciace transkripce prostřednictvím působení DRIP 205 zprostředkovává rekrutaci RNA polymerasy II do místa transkripčního počátku

a současnou vazbu bazálních transkripčních faktorů, což ve výsledku vede k zahájení genové exprese cílového genu (Rachez *et al.*, 2000).

Korepresory naopak buněčnou odezvu blokují. Čtyři nejznámější korepresory, a to *nuclear receptor co-repressor 1* (NCoR-1), NCoR-2, *silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor* (SMRT) a *hairless* (Hr), se vážou na VDR v nepřítomnosti ligandu a podílejí se na deacetylaci histonů v oblasti promotoru DNA. To vede ke stabilizaci chromatinu a současné inhibici transkripční aktivity daného genu. V případě vazby ligandu a rekrutace koaktivátorů naopak dochází k potlačení aktivity korepresorů. Stejně jako je tomu v případě koaktivátorů, dostupnost jednotlivých korepresorů v různých tkáních se liší (Bikle, 2009).



Obr. 5. Genomický účinek vazby 1,25(OH)₂D₃ na VDR. 1,25(OH)₂D₃ díky své lipofilitě volně prostupuje skrz cytoplasmatickou membránu a následně směřuje do jádra. Zde se váže na VDR, který následovně heterodimerizuje s RXR – vazba ligandu na VDR a heterodimerizace může probíhat také v cytoplasmě buňky, kde se oba receptory rovněž

vyskytují, načež následuje jejich translokace do jádra. Heterodimer VDR-RXR se pak váže na VDRE DNA a na základě poměru přítomných koaktivátorů a korepresorů dochází k transaktivaci či transrepresi transkripce konkrétního genu. V případě vazby koaktivátorů NCoA a SRC / DRIP na AF-2 komplexu VDR-RXR s DNA dochází k zachycení se DNA-polymeras na replikačních počátcích. Výsledkem transkripce a následné translace konkrétních genů je zejména nárůst exprese proteinu p21, tedy regulačního proteinu buněčného cyklu podporujícího proliferaci a diferenciaci buněk, a naopak snížení množství mRNA PTH, což přispívá k regulaci hladiny plasmatického Ca^{2+} . Zkratky: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – kalcitriol; AF2 – *activation function 2*; NCoA – *nuclear receptor coactivator*; PTH – parathormon; RXR – retinoidní X receptor; SRC / DRIP – *steroid receptor coactivator / vitamin D receptor interacting protein*; VDR – receptor pro vitamín D; VDRE – vitamín D responzivní element.

3.3.3 Negenomický mechanismus účinku VDR

Membránová forma VDR se nachází v cytoplasmatické membráně buněk napojená na lipidové mikrodomény (rafty) nebo prostupuje membránou v místech obsahujících vysoké frakce caveolae. Caveolae vytváří invaginace cytoplasmatické membrány tvořené proteiny caveoliny, které jsou navíc, stejně jako lipidové mikrodomény, obohaceny cholesterolem a sfingolipidy. V místech jejich výskytu se hromadí velké množství molekul potřebných pro rychlý přenos signálu z extracelulárního prostředí do buňky, čímž se caveolae významně podílí na regulaci buněčných procesů. Přítomnost VDR v bezprostřední blízkosti těchto struktur je tedy klíčová pro zprostředkování negenomického účinku $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Huhtakangas *et al.*, 2004). Caveolae tvoří součást cytoplasmatické membrány endoteliálních buněk, adipocytů, fibroblastů, β -buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, Sertoliho buněk, osteoblastů, buněk hladké a příčně pruhované svaloviny či střeva (Haussler *et al.*, 2011).

Vazba $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na membránový VDR *in cellulo* aktivuje celou řadu signálních molekul, čímž zprostředkovává svůj účinek buď prostřednictvím transportu iontů přes cytoplasmatickou membránu, nebo řízením intracelulárních signálních drah. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ iniciovaná aktivace protein kinasy A (PKA), protein kinasy C (PKC) či fosfolipasy C (PLC, *phospholipase C*) tak může vést k navýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+}

otevřením kanálů pro tyto ionty nebo změnou v produkci cyklického adenosin monofosfátu (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*) a jiných druhých posílů. Membránová forma VDR se dále vyznačuje schopností regulovat aktivitu dráhy mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK, *mitogen activated protein kinase*), popřípadě Jun kinasy. Mezi výsledky indukce několika různých kaskád buněčných reakcí patří otevření napětových kanálů pro Ca^{2+} či Cl^- , exocytóza v rámci osteoblastů a Sertoliho buněk, sekrece insulínu nebo zvýšené vstřebávání Ca^{2+} ve střevě. Navíc mohou tyto velmi rychlé negenomické účinky $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ovlivnit i účinky genomické, a to například fosforylací VDR vedoucí k modulaci potence a *efficacy* (účinnosti) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Hausler *et al.*, 2011). Ovlivnění exprese genů regulovaných $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prostřednictvím negenomického působení tohoto ligandu se často označuje jako *cross-talk*. Otázkou však zůstává, nakolik jsou negenomické efekty $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vivo* významné a fyziologicky shodné s účinky v experimentech *in cellulo*, neboť *in vivo* byl zatím testován pouze jejich zlomek (Losel *et al.*, 2003).

3.3.4 Buněčná odpověď na aktivaci VDR

Po spuštění signální kaskády VDR v konkrétní buňce nastává buněčná odpověď, kterou můžeme klasifikovat jako klasický nebo neklasický účinek vitamínu D. Mezi klasické účinky řadíme ovlivnění kostní tkáně, ledvin nebo střev, zatímco neklasické účinky jsou chápány spíše v souvislosti s buňkami maligními, imunitními či svalovými (Bouillon *et al.*, 2008). Obecně se neklasický efekt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ týká hormonálních funkcí a jejich regulace, imunitního systému a procesů diferenciací a proliferace (Bikle, 2009).

Podíl vitamínu D na mnoha fyziologických funkcích a na vzniku celé řady poruch či onemocnění je dáván do souvislosti se známou skutečností, že aktivita $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ovlivňuje 0,8 – 5 % lidského genomu. Vitamín D tak mimo jiné řídí procesy zahrnující buněčný růst, diferenciaci, apoptózu, reparaci DNA, membránový transport, oxidační stres a řadu dalších (Griffin *et al.*, 2004).

3.3.5 Hladiny 25(OH)D₃ v krevní plasmě

Na základě dokumentu z listopadu 2010 vydaného Institutem medicíny Národní akademie věd USA (IOM) činí průměrná optimální dávka vitamínu D získaná expozicí slunečnímu záření pro osoby mladší 70 let, těhotné a kojící ženy 600 IU. Tato hodnota po přepočtu, kdy se 1 IU vitamínu D rovná 0,025 µg, odpovídá množství 15 µg/den. U osob starších 70 let se doporučuje dávka vyšší, a to 800 IU, tedy 20 µg/den. Nejvyšší horní hranice příjmu vitamínu D pak pro většinu věkových skupin s výjimkou dětí do 8 let činí 100 µg/den získaných ze 4000 IU (Institute of Medicine, 2010).

3.3.6 Deficience 25(OH)D₃

Nedostatek vitamínu D představuje globální problém, jehož primární příčinou bývá nedostatečná expozice slunečnímu záření, a to zejména v industriálních oblastech severní Evropy a Severní Ameriky. Jeho hladina se navíc liší v závislosti na sezóně (Holick *et al.*, 2007). Ideální koncentrace cirkulujícího 25(OH)D₃ v krevní plasmě dostačující pro udržení optimálního zdravotního stavu a pro prevenci vzniku rakoviny činí 30 – 50 ng/ml, což odpovídá hodnotám 75 – 125 nmol/l. V případě nedostatku vitamínu D se jako ideální řešení jeví jeho suplementace, přičemž při dávkování je potřeba brát v úvahu tělesnou hmotnost daného jedince a závislost přírůstku 25(OH)D₃ na jeho výchozí hodnotě (Ross *et al.*, 2011).

Na základě těchto mezních hodnot sérového vitamínu D se problém nedostatku či malabsorpce týká odhadem 1 miliardy lidí na celém světě, a to obou pohlaví u všech věkových skupin. Vedle známého onemocnění křivice způsobují nízké hladiny vitamínu D široké spektrum dalších poruch, jako je zpomalení růstu kostí a jejich deformace během děložního vývoje i v dětském věku, v dospělosti pak vznik či zhoršený průběh osteomalacie, osteopenie, osteoporózy nebo myopatie, projevující se svalovou slabostí (Holick, 2007). Nedostatek tohoto vitamínu dále doprovází řadu zánětlivých stavů a onemocnění, a to zejména chronické onemocnění ledvin (CKD, *chronic kidney disease*), vznikající v souvislosti s rozvojem kostních metabolických poruch (Rojas-Rivera *et al.*, 2010). Na druhou stranu optimální hladina vitamínu D hraje významnou roli v prevenci i léčbě rakoviny tlustého střeva, autoimunitních a kardiovaskulárních chorob či různých infekčních onemocnění (Holick, 2007).

3.3.7 Toxicita 25(OH)D₃

Vzhledem k tomu, že vitamín D vykazuje potencionální toxicitu, popřípadě nebezpečí zvýšené sensitivity jedince na zvýšenou sérovou hladinu 25(OH)D₃, je podle IOM označován jako rizikový příjem vyšší než 100 µg, tedy 4000 IU za den. Nicméně všechny publikované případy, ve kterých došlo k toxickým účinkům zahrnujícím projevy hyperkalcémie, se týkaly příjmu vitamínu D v dávce vyšší nebo rovné 1000 µg (40 000 IU) za den (Vieth, 1999).

4 IMUNOMODULAČNÍ ÚČINKY VITAMÍNU D

Účinky vitamínu D na imunitní systém objevil roku 1849 C. J. B. Williams, který úspěšně využíval olej z tresčích jater k léčbě tuberkulózy (Williams, 1849). Dnes již víme, že $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prostřednictvím vazby na VDR ovlivňuje růst a diferenciaci celé řady buněk včetně elementů imunitního systému, a jeho imunomodulační efekt se uplatňuje v léčbě řady chorob (Mathieu *et* Adorini, 2002).

4.1 Základní mechanismy nespecifické imunitní reakce

Nespecifická (vrozená) imunita zajišťuje bazální ochranu organismu vůči nežádoucím molekulám, buňkám či organismům. Jednak tvoří jakousi fyzickou bariéru proti vstupu infekce kůží a sliznicemi, jednak slouží i jako prvotní obranná reakce, snažící se zlikvidovat či oslabit dané infekční agens bezprostředně po průniku do organismu, tedy dříve než zafungují mechanismy specifické imunitní odpovědi. Mezi buňky zprostředkovávající nespecifickou imunitní reakci patří makrofágy (respektive monocyty jakožto nezralé stádium makrofágů), neutrofilní, eozinofilní a basofilní granulocyty, mastocyty a dendritické buňky (DC, *dendritic cells*); vedle nich zde navíc řadíme také proteiny komplementu, interferony a enzym lysozym (Delves *et al.*, 2011).

Buňky nespecifické imunity svými PPR receptory (*pattern recognition receptors*) nejprve rozpoznávají vysoce konzervované s patogenem asociované molekulární vzory (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) lokalizované na povrchu patogenních organismů; důležité je, že PAMP jsou společné celým skupinám mikroorganismů, ale u hostitele se nikdy přirozeně nevyskytují. Po rozpoznání PAMP buňkami nespecifické imunity pak nastává buď fagocytóza patogenů, nebo k poškození patogenních enzymů či samotných PAMP, které jsou pro původce esenciální. Následkem samotného fagocytického pohlcení částice pak dochází k její úplné likvidaci uvnitř fagocytující buňky v procesu oxidativního vzplanutí, probíhajícího prostřednictvím reaktivních forem kyslíku (ROS, *reactive oxygen species*); klíčovým činitelem je zde zejména peroxid vodíku (Delves *et al.*, 2011).

V případě fagocytické likvidace patogenu dochází navíc k vyslání informace o daném infekčním agens buňkám specifického imunitního systému. Některé fagocytující buňky totiž zastávají rovněž funkci antigen prezentujících buněk (APC, *antigen-presenting cell*), vyznačujících se schopností prezentovat na své cytoplasmatické membráně antigen jimi pohlcené cizorodé částice, a to ve vazbě na vlastní molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, *major histocompatibility komplex*) I. či II. třídy. Komplex antigen-MHC je následně rozpoznán T-lymfocyty, což vede ke spuštění specifické imunitní odpovědi. Mezi APC konkrétně řadíme různé subpopulace DC, makrofágy a rovněž B-lymfocyty specifické imunity. Nespecifická imunita tedy nejen že sama brání propuknutí velké části infekcí bez nutnosti zapojení specifické reakce, ale současně prezentuje buňkám specifické imunity informaci o daném patogenu či cizorodé částici nebo nádorové buňce (Delves *et al.*, 2011).

4.1.1 Dendritické buňky

DC se vyskytují jak v lymfoidních, tak v nelymfoidních orgánech i v krevním oběhu. Jedná se o APC schopné fagocytózy, které lze rozdělit do tří typů – z myeloidní buněčné linie odvozené Langerhansovy buňky a intersticiální DC (kožní DC) a dále z lymfoidní linie odvozené lymfoidní DC. Tyto imunitní buňky vznikají v kostní dřeni a následně jako nezralé DC cirkulují v krvi, kde je jejich hlavní úlohou rozpoznání patogenů nebo také vlastních nekrotických buněk. V okamžiku setkání s cizorodým antigenem začíná jejich zrání. DC tyto antigeny fagocytují, intracelulárně štěpí a následně migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde prezentují T-lymfocytům antigenní peptidy lokalizované na svém povrchu ve vazbě na MHC molekul I. či II. třídy. Zralé DC se tak vyznačují schopností aktivovat všechny typy T-lymfocytů (Delves *et al.*, 2011). Kromě schopnosti prezentace antigenu zralé DC na svém povrchu modulují aktivitu T-lymfocytů ještě dvěma dalšími způsoby, a to produkcí kostimulačních molekul zesilujících signál cytokinů. Pro plnou aktivaci naivních T-lymfocytů musí být tedy nutně splněny všechny tři následující aspekty: prezentace antigenu ve vazbě na MHC molekuly na povrchu APC, exprese kostimulačních molekul a tvorba cytokinů prostřednictvím APC či jiných buněk (Maldonado *et von Andrian*, 2010).

4.1.2 Makrofágy

Makrofágy, buňky odvozené z monocyto-makrofágové linie, se stejně jako DC vyskytují v celém těle. Jejich interakce s patogenem začíná rozpoznáním PAMP, což vede ke spuštění makrofágní aktivity prostřednictvím na jaderném faktoru kappa-B (NF- κ B, *nuclear factor kappa B*) závislé signální dráhy. Daný patogen či poškozená nebo vlastní nádorová buňka je pak makrofágem fagocytována a antigen opět prezentován ve vazbě na MHC molekuly na buněčném povrchu makrofágu T-lymfocytům (Delves *et al.*, 2011).

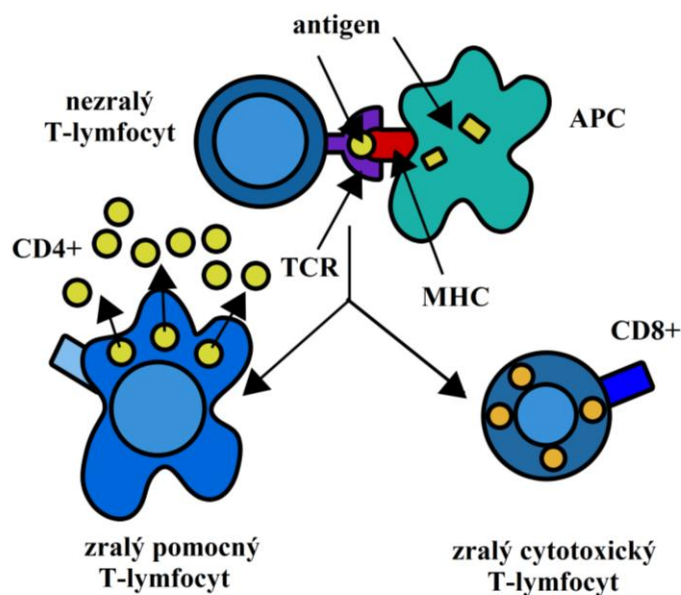
4.2 Základní mechanismy specifické imunitní reakce

Zatímco nespecifická imunitní reakce poskytuje tělu okamžitou reakci namířenou obecně vůči široké škále patogenů, specifická (získaná, adaptivní) imunita je zacílena proti konkrétnímu infekčnímu agens či cizorodé částici při vypuknutí infekce. Vytváří se během života jedince průběžným kontaktem s různými antigeny, proti kterým vytváří specifické protilátky chránící organismus při příštím napadení antigenem totožným. Ačkoli se na specifické imunitě podílí odlišné typy buněk než na imunitě nespecifické, je důležitý vzájemný kontakt mezi buňkami obou typů imunitních reakcí, a to zejména kontakt T-lymfocytů s APC, ze kterého vyplývá provázanost s nespecifickou imunitou i pro B-lymfocyty. Imunita specifická tedy vykazuje závislost na funkci imunity nespecifické, což se odráží také v této práci, konkrétně ve vztahu mezi T-lymfocyty a DC (Delves *et al.*, 2011).

Specifickou imunitní reakci zprostředkovávají dva typy bílých krvinek, a to B-lymfocyty a T-lymfocyty. Pro tyto buňky je charakteristická přítomnost T-buněčných receptorů (TCR, *T-cell receptor*) nebo B-buněčných receptorů (BCR, *B-cell receptor*) v cytoplasmatické membráně, vyznačujících se obrovskou diverzitou ve schopnosti rozpoznávání jednotlivých antigenů (Delves *et al.*, 2011).

4.2.1 T-lymfocyty a jejich subpopulace

Nezralé T-lymfocyty vznikají v krvetvorných orgánech, odkud migrují do brzlíku, kde nastává jejich zrání, tedy kontrola schopnosti rozpoznávat MHC vlastního organismu a současně kontrola afinity k molekulám vlastního i cizího původu. Nezralé T-lymfocyty se zde setkávají s antigeny vázanými na MHC prezentujících epitelárních buněk nebo DC. Při tomto procesu dochází na cytoplasmatické membráně nezralých T-lymfocytů k expresi povrchových markerů CD (diferenciační skupina, *cluster of differentiation*), konkrétně CD4 a CD8. Příslušnost ke konkrétní diferenciacní skupině je dána afinitou koreceptorů k MHC, kdy MHC I. třídy váží koreceptory CD8, zatímco MHC II. třídy koreceptory CD4. Během procesu dozrávání jsou z populace T-lymfocytů eliminovány jednak všechny autoreaktivní T-lymfocyty, dále T-lymfocyty exprimující současně oba receptory CD4 i CD8 (tzv. *double positive T-cell*) a v neposlední řadě také všechny lymfocyty vykazující příliš silnou nebo naopak nedostatečnou afinitu k vlastním MHC molekulám. Z brzlíku do periferie jsou tak uvolňovány jen zralé T lymfocyty exprimující buď CD4, nebo CD8, které vykazují slabou afinitu k MHC a nereagují s vlastními antigeny. Tyto vyzrálé naivní T-lymfocyty se následně dostávají do krve a tou do sekundárních lymfatických orgánů. Zde pak nastává jejich samotné setkání se specifickými antigeny prostřednictvím APC, zodpovědné za rozvoj zánětlivé reakce. Jedná se o interakci mezi APC, prezentující na svém povrchu antigen navázaný na MHC, a TCR daného T-lymfocytu, která je znázorněna na Obr. 6. K tomu, aby tato vazba byla pro T lymfocyt stimulační, je však nutná přítomnost dalších signálů, konkrétně kostimulačních molekul, cytokinů a adhezivních molekul. To indukuje diferenciaci T-lymfocytů na buňky jednotlivých subpopulací, jejich exponenciální klonální expanzi a migraci do cílových tkání (Delves *et al.*, 2011). Tuto diferenciaci provází přestavba chromatinu a acetylace histonů v regulovaných oblastech interferonu γ (IFN- γ) a interleukinu 4 (IL-4) (Murphy *et Reiner*, 2002).



Obr. 6. Signalizace antigen prezentujících buněk nezralým T-lymfocytům a jejich následné zrání a diferenciace. Setkání nezralého T-lymfocyty s APC s navázaným antigenem přes molekulu MHC vede k dočasné vazbě MHC na TCR daného T-lymfocyty. Následuje exprese povrchových markerů příslušné CD na povrchu T-lymfocyty, jeho zrání a diferenciace nejčastěji na zralé pomocné T-lymfocyty (CD4+) nebo zralé cytotoxické T-lymfocyty (CD8+). Zkratky: APC – antigen prezentující buňka; CD4, CD8 – diferenciační skupina 4, 8; MHC – hlavní histokompatibilní komplex; TCR – T-buněčný receptor.

Subpopulace T-lymfocytů se od sebe liší jednak typem exprimovaných povrchových molekul (receptoru, koreceptorové molekuly) a dále produkcí odlišného spektra cytokinů, tedy malých proteinových signálních molekul zodpovědných za vznik ochranné i patologické zánětlivé reakce a za její regulaci. Existují dvě základní subpopulace T-lymfocytů, na které T-lymfocyty diferencují po kontaktu s konkrétním antigenem. Pomocné T-lymfocyty (T_H , *helper T cells*) exprimují povrchový marker CD4, jsou stimulovány antigenem ve vazbě na MHC II. třídy a prostřednictvím cytokinů ovlivňují aktivitu řady imunocytů. Cytotoxické (tlumivé) T-lymfocyty (T_C , *cytotoxic T cells*) exprimují povrchový marker CD8, k jejich stimulaci dochází prostřednictvím antigenu navázaným na MHC I. třídy a vyznačují se schopností likvidovat další buňky. Oba typy lymfocytů vytváří po ukončení imunitní reakce populaci paměťových T-lymfocytů, schopných při opakovaném kontaktu se stejným antigenem reagovat mnohem efektivněji (Delves *et al.*, 2011).

T_H dále diferencují na dvě stěžejní linie – tvorbu T_{H1} (zánětlivé) linie indukují zejména bakteriální či virové antigeny, vznik T_{H2} (regulační) linie je pak stimulován spíše antigeny parazitárními a alergeny prezentovanými B-lymfocyty (Delves *et al.*, 2011). T_{H1} a T_{H2} představují dvě odlišné populace populace vyznačující se odlišným spektrem cytokinů stimulujících specifické imunitní reakce. Zatímco T_{H1} se díky své schopnosti exprese IFN- γ , IL-2 a tumor nekrotizujícího faktoru β (TNF- β) podílejí zejména na rozvoji zánětu, T_{H2} mají účinek opačný. Kromě toho, že potlačují rozvoj T_{H1} , hrají důležitou roli v patogenezi atopií a astmatu; prostřednictvím exprese IL-4, IL-5 a IL-13 indukují proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů, stejně jako tvorbu specifických protilátek. O případném vzniku autoimunitní reakce organismu nakonec rozhoduje poměr množství těchto dvou linií T-lymfocytů, kdy dojde k převaze T_{H1} (Delves *et al.*, 2011). Samotnou diferenciaci T_H do jednotlivých linií pravděpodobně ovlivňuje typ a intenzita antigenního stimulu k této diferenciaci, druh APC, která setkání s antigenem zprostředkovala, a cytokinová signalizace. V posledním případě je známo, že IL-1, IL-12, IL-18 a zejména IFN- γ *in vivo* působí vznik T_{H1} populací, zatímco IL-4 a IL-13 vznik T_{H2} (Avni *et al.*, 2002). Pro rovnováhu mezi patologickou a autoimunitní reakcí je důležité rovněž antagonistické působení těchto dvou linií, kdy jedna svými produkovánými cytokiny brzdí aktivaci a proliferaci buněk druhé linie. T_{H1} tak prostřednictvím IFN- γ tlumí diferenciaci T-lymfocytů na T_{H2} , zatímco IL-4 naopak inhibuje diferenciaci na T_{H1} (Delves *et al.*, 2011).

Vedle T_{H1} a T_{H2} diferenciuje T_H také na regulační T-lymfocyty (T_{REG} , *regulatory T cells*), které obecně tlumí imunitní reakce řady dalších imunocytů, a proto byly dříve označovány jako supresorové T-lymfocyty (Delves *et al.*, 2011). Populace T_{REG} představuje značně heterogenní skupinu pomocných lymfocytů. Patří k nim např. T_{H3} , regulační T-lymfocyty typu 1 (Tr1, *type 1 regulatory T-cells*) a buňky obsahující peptid Qa-1, jejichž role v imunitních reakcích není zcela jednoznačná, ale i lépe prozkoumané $CD4^+ 25^+$ T-lymfocyty exprimující protein Foxp3 (*forkhead box*), které se podílejí na udržování periferní tolerance a tlumení autoimunitních reakcí. Buňky T_{REG} rozlišujeme na přírodní T_{REG} (nT_{REG} , *natural regulatory T cells*), vznikající v brzlíku a exprimující na svém povrchu CD4 molekuly, a indukované T_{REG} (iT_{REG} , *induced regulatory T cells*), které jsou produktem diferenciaci naivních $CD4^+$ T-lymfocytů v periferním krevním řečišti. iT_{REG} exprimují většinou jak CD4, tak CD8. Regulace obou typů T_{REG} spadá pod činnost transkripčního faktoru Foxp3 (Tang *et al.*, 2008). Jejich účinek se podobá působení

linie T_{H2} , neboť chrání organismus před patologickou imunitní odpovědí oslabováním imunitních reakcí a navozováním tolerance vůči vlastním buňkám organismu (Toubi *et* Shoenfeld, 2010). Je známo, že T_{REG} inhibují aktivitu a proliferaci nejen $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů, ale také B-lymfocytů či DC, tedy většího množství efektorů, než je tomu v případě T_{H2} , a to včetně APC, což ještě více brzdí rozvoj zánětu (Delves *et al.*, 2011). Tento účinek je zprostředkován schopností T_{REG} indukovat apoptózu cílových buněk či produkcí celé řady protizánětlivých molekul, zejména cytokinů IL-10, transformujícího růstového faktoru β (TGF- β , *transforming growth factor β*) a IL-35. Navíc přítomnost nT_{REG} stimuluje diferenciaci naivních T-lymfocytů na iT_{REG} , čímž se prohlubuje inhibiční efekt na imunitní reakci (Tang *et* Bluestone, 2008).

Další subpopulací T_H lymfocytů jsou buňky T_{H17} , exprimující cytokin IL-17. Lymfocytární linie T_{H17} se stejně jako T_{H1} vyznačuje svou významnou rolí při udržování zánětlivé reakce vedoucí až k poškození tkáně, neboť se IL-17 podílí na vzniku a progresi zánětlivé imunitní odpovědi (Harrington *et al.*, 2005), stejně jako IL-21 a IL-22 (Miossec *et al.*, 2009). K diferenciaci T_H na T_{H17} u člověka dochází pouze v přítomnosti IL-23 a / nebo IL-1 β , nicméně tyto cytokiny stimulují při současné přítomnosti TGF- β rovněž produkci T_{REG} (Delves *et al.*, 2011).

T_C se vyznačují schopností likvidace infikované či nádorové buňky, stejně jako samotného infekčního agens. Na rozdíl od T_H rozpoznávají MHC I. třídy, které jsou prezentovány na povrchu jaderných buněk, což zvyšuje jejich možnosti v identifikaci a likvidaci nádorového bujení. Imunitní reakce zprostředkovaná T_C se uskutečňuje v sekundárních lymfatických orgánech, kde T_{H1} zejména prostřednictvím produkce IFN- γ a IL-2 stimuluje APC k vyšší aktivitě a tím podporují cytotoxický účinek T_C , který spočívá v indukci apoptózy u cílových buněk. Kromě toho se, stejně jako v případě ostatních populací, jedná o producenty regulačních cytokinů, konkrétně prozánětlivých cytokinů jako jsou například IFN- γ a TNF- α . Tyto cytokiny pak ještě přispívají k aktivitě DC a makrofágů, tedy k intenzitě antigenní prezentace (Delves *et al.*, 2011).

4.2.2 B-lymfocyty

Úloha B-lymfocytů spočívá zejména v produkci specifických protilátek (imunoglobulinů, Ig) vůči konkrétnímu antigenu. Stejně jako T-lymfocyty vznikají prekurzory B-lymfocytů v krvetvorných orgánech, především v kostní dřeni, a stejně tak jejich proces zrání spočívá v testování schopnosti rozpoznat vlastní molekuly od cizích antigenů prostřednictvím vysoce specifického membránového receptoru BCR. V závislosti na konkrétním typu B-lymfocytu má BCR formu IgM a / nebo IgD. Zralé naivní B-lymfocyty následně migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde po kontaktu s extracelulárním antigenem nastává jejich transformace v lymfoblasty, tedy efektorové buňky produkující protilátky. Tzv. přirozené nízkoafinitní IgM protilátky (tzv. *T-cell independent*) jsou sekretovány na základě přímé stimulace B-lymfocytu antigenem. Sekrece vysoce afinitních protilátek vyžaduje interakci B-lymfocytů s T_H2 a jimi produkovanými cytokiny, přičemž zde B-lymfocyt vystupuje v roli APC. BCR je spolu s navázaným antigenem pohlcen, antigen degradován a ve vazbě na MHC molekuly B-lymfocytů prezentován T_H lymfocytům. Ty potom prostřednictvím cytokinů modulují selekci a proliferaci B-lymfocytárních klonů, jejichž protilátky (tzv. *T-cell dependent*) vykazují největší afinitu k antigenu. V signalizaci mezi B-lymfocitem jakožto APC a T_H hrají důležitou roli kostimulační molekuly; jedná se zejména o interakci mezi molekulami CD80 a CD86 exprimovanými na povrchu B-lymfocytů a CD28 T-lymfocytů, dále CD40 B-lymfocytů a CD40L T-lymfocytů či CD30 a CD30L. Stádium lymfoblastu v tuto chvíli zároveň diferencuje částečně na plasmatické buňky schopné tvorby protilátek za přítomnosti IL-5 a IL6, částečně na buňky paměťové. Diferenciace je doprovázena klonální expanzí obou těchto buněčných typů. Protilátky produkované plasmatickými buňkami mají svou strukturu naprosto totožnou se strukturou BCR, který rozpoznal antigen. Primární izotyp protilátek představuje IgM, přičemž tvorba jiných izotypů je podmíněna složitým procesem izotypového přesmyku syntézy těžkých řetězců Ig za přítomnosti interakce CD40 a CD40L. O konkrétním izotypu pak rozhoduje cytokinové působení, zejména IL-5, TGF- β či IFN- γ ; pro tuto práci hraje důležitou úlohu IL-4 indukovaný prostřednictvím T_H2 , který kromě IgG vytváří také IgE. IgE totiž charakteristicky indukují alergickou až anafylaktickou reakci tak, že se svou Fc doménou váží na Fc receptor mastocytů a basofilů. Při současné vazbě IgE na antigeny v podobě alergenů pak dochází k degranulaci mastocytů i basofilů, což vede k uvolnění histaminu, heparinu a dalších látek. Ty spolu s TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13 způsobují tělesné alergické projevy (Delves *et al.*, 2011).

4.3 Význam vitamínu D v imunitních reakcích

4.3.1 Přítomnost VDR v buňkách imunitního systému

VDR nalezneme zejména v antigenem aktivovaných T-lymfocytech a APC, konkrétně v DC a makrofázích, a dále také v antigenem aktivovaných B-lymfocytech. Nejvyšší koncentrace těchto receptorů se vyskytuje v CD8⁺ T-lymfocytech, menší pak v CD4⁺, nicméně VDR obsahují do jisté míry všechny populace T-lymfocytů. Jeho nízké hladiny byly na druhou stranu nalezeny u makrofágů a DC odvozených od monocytů, i když aktivace VDR v nich samotných ani v jejich populaci žádný účinek nevyvolává. Hladina receptorů se ve všech případech zvyšuje při suplementaci 1,25(OH)₂D₃ i jeho analogy (Veldman *et al.*, 2000). Naopak při experimentálně navozené delecii VDR v buňkách imunitního systému či při nedostatku vitamínu D v organismu k významným změnám aktivity imunitních buněk nedochází a zároveň se naopak zvyšuje riziko rozvoje patologických, zejména zánětlivých stavů (Mathieu *et Adorini*, 2002).

4.3.2 Obecná interakce vitamínu D s imunitním systémem

1,25(OH)₂D₃ ovlivňuje specifickou i nespecifickou imunitní reakci, a to nejen díky přítomnosti VDR v membráně buněk imunitního systému, ale rovněž prostřednictvím schopnosti těchto buněk exprimovat enzym CYP27B1, který je klíčový pro aktivaci cirkulující neaktivní formy 25(OH)D₃. Gen pro tvorbu tohoto enzymu se v rámci imunitního systému vyskytuje stejně jako VDR v makrofázích, DC, T-lymfocytech a B-lymfocytech (Kamen *et Tangpricha*, 2010), kde reguluje lokální navyšování množství dostupného 1,25(OH)₂D₃ pro řízení vlastních imunitních funkcí těchto buněk. Přeměna cirkulujícího 25(OH)D₃ prostřednictvím katalýzy posledního kroku aktivace tohoto hormonu na aktivní formu 1,25(OH)₂D₃ extrarenálním CYP27B1 probíhá stejným způsobem jako v játrech. Stejně tak struktura tohoto enzymu se shoduje s jaterní formou (Mathieu *et Adorini*, 2002). Aktivita CYP27B1 však v imunitním systému není regulována hormonálně PTH, ale imunitními signály (Arnson *et al.*, 2007). Autokrinní a parakrinní účinky vitamínu D tak mohou být řízeny imunitními buňkami samostatně v závislosti na množství dostupného 25(OH)D₃ v krevní plasmě (Kamen *et Tangpricha*, 2010).

Efekt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na nespecifický imunitní systém je zprostředkován aktivací signálního typu PPR receptorů, TLR. TLR se vyskytují na povrchu monocytů, makrofágů, nezralých DC a epitelárních buněk celé řady tkání, jako jsou například plíce, epitel střeva, dásně či epidermis; všechny tyto buňky na svém povrchu mimo TLR rovněž obsahují VDR. TLR představují transmembránové receptory schopné rozpoznat patogen, aktivovat se po interakci s membránovými strukturami PAMP tohoto patogenu a následně spouštět přímou antimikrobiální reakci *in vitro*. Stimulace TLR receptorů mikrobiálním peptidem v makrofázích či stimulace TLR v keranocytech prostřednictvím poranění kůže zvyšuje expresi enzymu CYP27B1, což vede ke stimulaci lokální produkce $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ z cirkulujícího $25(\text{OH})\text{D}_3$ těmito buňkami a jeho následné vazbě do VDR. Aktivace VDR zde díky okamžité produkci IL-12 rovněž způsobuje up-regulaci exprese antimikrobiálních peptidů odvozených od cathelicidinu a produkci ROS, které umožňují přímou likvidaci patogenu. Příliš nízká hladina cirkulujícího $25(\text{OH})\text{D}_3$, nedostatečná koncentrace CYP27B1 či VDR na povrchu buněk je naopak příčinou dysfunkce této kaskády, znemožňující sekreci cathelicidinu v důsledku nedostatečné citlivosti buněk nespecifického imunitního systému vůči $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Bikle, 2009). Tuto nespecifickou imunitní reakci pravděpodobně dále doplňuje specifická složka, konkrétně aktivace cytokinů a uvolnění prozánětlivého enzymu granulysinů působením T_C . Výše popsaný mechanismus byl pozorován při studiu nákazy lidského organismu bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, která byla likvidována činností cathelicidinu a která celou kaskádu spouštěla vazbou svých lipopeptidů na TLR1 / 2 (Liu *et al.*, 2006). Tento efekt vitamínu D na nespecifický imunitní systém představuje klíčový prvek v obraně celého organismu, neboť působí komplexněji, tedy i ve tkáních mimo lymfopoetický systém (Bikle, 2009).

Zatímco v případě nespecifické imunitní odpovědi má $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jednoznačně aktivační účinky spojené se zvýšenou schopností obrany buněk proti infekci, na příliš aktivní specifickou imunitní odpověď působí spíše inhibičně (Kamen *et Tangpricha*, 2010). Obecně zde vlivem vazby $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na VDR na povrchu antigenem aktivovaných T-lymfocytů a B-lymfocytů dochází ke snížení produkce imunoglobulinů a k regulaci uvolňování cytokinů v závislosti na jejich konkrétním typu (Bikle, 2009).

4.4 Imunomodulační mechanismy vitamínu D

4.4.1 Aktivace VDR dendritických buněk

Nejvýznamnější podíl na imunitní reakci představuje působení vitamínu D na antigen prezentující schopnost DC a tím na T-lymfocyty. Celkový efekt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na DC je zprostředkován několika cestami. První z nich zahrnuje vysokou schopnost $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibovat zrání a diferenciaci DC do zralých forem, tedy vytvářet a udržovat tolerogenní DC, což má velký význam v tlumení autoimunitních reakcí (Mathieu *et Adorini*, 2002). K udržování tolerogenních forem a inhibici jejich diferenciaci prostřednictvím suprese kostimulačních molekul CD40, CD80, CD86 a MHC II. třídy a naopak ke zvýšení exprese inhibičních molekul ILT3 (*immunoglobulin-like transcript*) postačují fyziologické hladiny $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Kamen *et Tangpricha*, 2010).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* tedy nejenže potlačuje expresi CD40, CD80 a CD86, ale dále také snižuje produkci cytokinu IL-12, zatímco expresi IL-4, IL-5 a IL-10 zvyšuje (Boonstra *et al.*, 2001). Tyto účinky ve výsledku vedou ke snížení schopnosti DC aktivovat T-lymfocyty svými zánětlivými signály (viz Obr. 7), a tedy k supresi vzniku a rozvoje autoimunitní reakce (Daniel *et al.*, 2008).

4.4.2 Aktivace VDR makrofágů

Makrofágy představují APC buňky nespecifické imunity, vznikající z monocytů. Indukce této přeměny je iniciována prostřednictvím vazby $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ do VDR, nicméně diferenciaci monocytů probíhá i bez přítomnosti receptorů v membráně monocytů a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tento proces tedy pouze podporuje. Vitamín D zároveň moduluje činnost makrofágů a jimi zprostředkovanou imunitní reakci. Zvýšené množství $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v krevní plasmě dále přispívá k dozrávání makrofágů a s tím spojené schopnosti exprese povrchových antigenů či oxidativního vzplanutí, tedy vznik ROS prostřednictvím lyzozomálního enzymu kyselá fosfatasy. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se tedy podílí na zvýšení fagocytární aktivity makrofágů (Arnson *et al.*, 2007).

Působením $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ však také zároveň dochází k potlačení schopnosti prezentace antigenu makrofágy prostřednictvím potlačení exprese MHC molekul II. třídy, což tlumí aktivaci T-lymfocytů (Arnson *et al.*, 2007). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dále inhibuje sekreci makrofágy produkovaných zánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1 (Kong *et al.*, 2006), IL-2 (Alroy *et al.*, 1995), IL-12 (D'Ambrosio *et al.*, 1998) a TNF- α . Vedle toho působí na produkci cytokinů obecně buňkami od monocytů odvozených – snižuje sekreci granulocytárního makrofágového kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF, *granulocyte / macrophage colony stimulating factor*) (Towers *et al.*, 1998) a naopak podporuje uvolňování prostaglandinu E_2 (Koren *et al.*, 1986).

4.4.3 Aktivace VDR T-lymfocytů

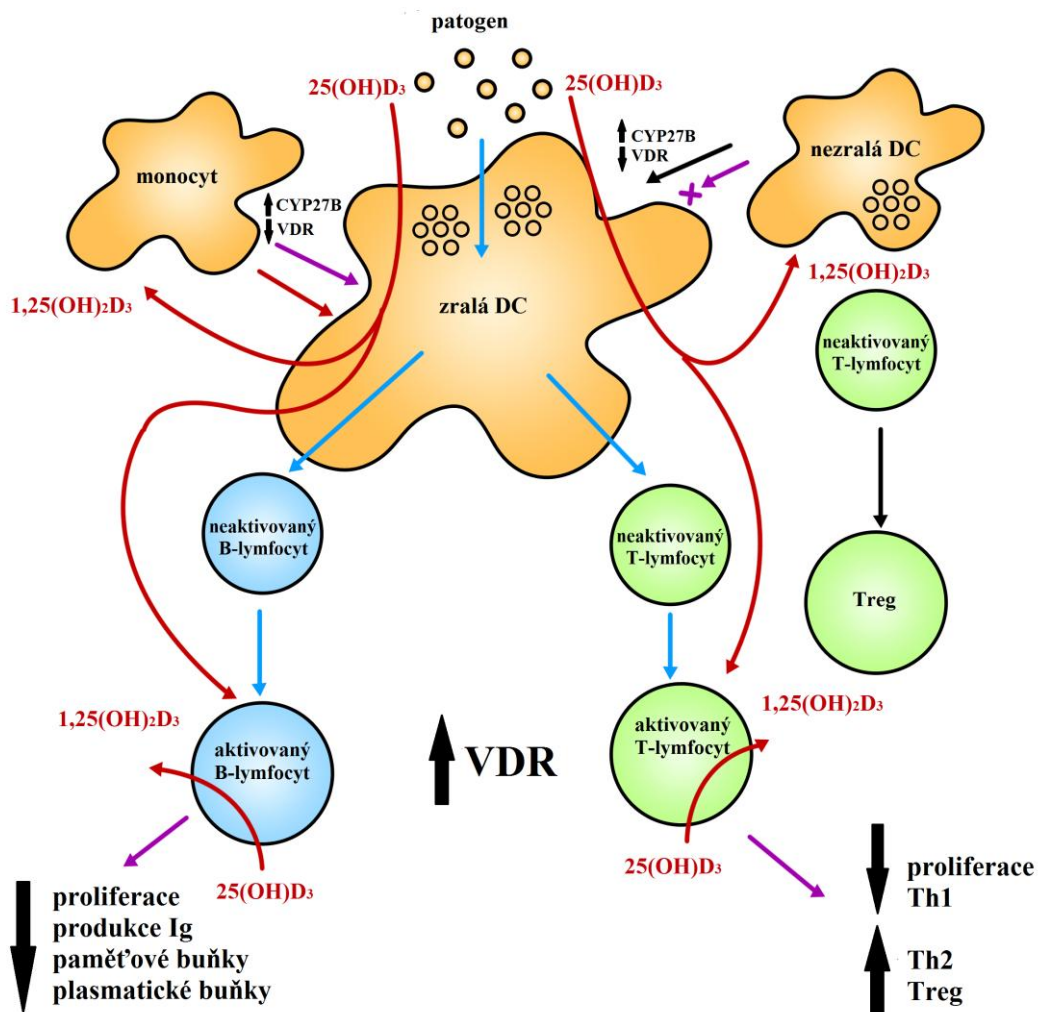
Nezralé T-lymfocyty vytvořené v kostní dřeni migrují do brzlíku, kde dozrávají a následně se v krvi či sekundárních lymfatických orgánech setkávají s antigenem, což je hlavním stimulem pro jejich přeměnu v efektorové buňky (Macian, 2005). Konkrétně naivní CD4^+ T-lymfocyty po navázání antigenu prezentovaného DC do TCR až pětinašobně více proliferují (Kamen *et al.*, 2010). Účinek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na T-lymfocyty spočívá v celkové inhibici sekrece cytokinů a proliferace T-lymfocytů (viz Obr. 7). Mimo to potlačuje rozvoj zánětlivých linií $\text{T}_{\text{H}1}$ a $\text{T}_{\text{H}17}$ snížením exprese IL-2, IFN- γ a GM-CSF a naopak indukuje nárůst množství $\text{T}_{\text{H}2}$ (Towers *et al.*, 1999). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dále inhibuje tvorbu $\text{T}_{\text{H}17}$ prostřednictvím DC, downreguluje expresi IL-6, který vznik $\text{T}_{\text{H}17}$ stimuluje, a zabraňuje sekreci IL-17, interleukinu, který ještě podporuje produkci zánětlivých cytokinů (Kamen *et al.*, 2010).

Zvýšená exprese VDR a 1α -hydroxylasy (Beake *et al.*, 2010), a to zejména v případě naivních a časných paměťových buněk, nastává v T-lymfocytech aktivací TCR prostřednictvím iniciace mitogenem indukované alternativní proteinkinasové dráhy, a je spojená s jejich vyšší reaktivitou (von Essen *et al.*, 2010). Vzhledem k tomu, že aktivace VDR prostřednictvím DC způsobuje inhibici exprese kostimulačních molekul klíčových pro aktivaci T-lymfocytů a naopak zvýšení exprese T_{REG} , dochází omezením antigen prezentující aktivity DC k redukcii reaktivity T-lymfocytů *in vitro*. To by mohlo mít velký význam při snižování rizika vzniku nemoci štěpu proti hostiteli (GVHD, *graft versus host disease*) (Joseph *et al.*, 2012). Stejně tak byla potvrzena přímá spojitost mezi hladinou

sérového $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a schopností T_{REG} inhibovat proliferaci T-lymfocytů a tedy potlačovat rozvoj autoimunitních chorob (Smolders *et al.*, 2009).

4.4.4 Aktivace VDR B-lymfocytů

B-lymfocyty, jakožto složka specifické imunity, rozpoznávají antigen a následně proliferují a diferencují v plasmatické (efektorové) B-lymfocyty, produkující imunoglobuliny specifické vůči rozpoznanému antigenu. Zatímco v neaktivovaných B-lymfocytech nebyla exprese VDR detekována, v aktivovaných buňkách vyvolává vazba $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ do přítomných receptorů inhibici proliferace a diferenciaci B-lymfocytů *in vitro*, a to zejména při vysokých hladinách tohoto hormonu. Tento efekt pak potlačuje produkci IgG (Kamen *et Tangpricha*, 2010). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dále inhibuje aktivaci a diferenciaci B-lymfocytů na plasmoblasty (viz Obr. 7) produkujících IgE *in vitro* i *in vivo*, a to s největší pravděpodobností inhibicí translokace p65 proteinové domény NF- κ B z cytoplasmy do jádra mechanismem nezávislým na I κ B α . Díky této schopnosti potlačovat produkci IgE by mohl být $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potenciálně využíván v předcházení patologických reakcí zejména v případě astmatu (Geldmeyer-Hilt *et al.*, 2011).



Obr. 7. Interakce mezi buňkami imunitního systému a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ při infiltraci patogenu. Zralé DC a monocyty rozpoznávají a fagocytují patogeny, což vede k nárůstu hladiny enzymu CYP27B, který umožňuje lokální přeměnu $25(\text{OH})\text{D}_3$ na aktivní metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ten následně vazbou na VDR nezralých monocytů podporuje diferenciaci těchto buněk na makrofágy, čímž stimuluje nespecifickou imunitní odpověď. V případě nezralých DC přítomnost $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jejich přeměnu do zralých forem naopak inhibuje, což vede k potlačení specifické imunitní odpovědi, zároveň však posiluje imunosupresivní efekt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ po vazbě na VDR aktivovaných T-lymfocytů následně indukuje nárůst Treg a Th2 buněčné linie a naopak tlumí proliferaci T-lymfocytů a rozvoj Th1 linie. Efekt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na aktivované B-lymfocyty zahrnuje inhibici proliferace B-lymfocytů, blokuje jejich diferenciaci na plasmatické i paměťové buňky a rovněž produkci Ig. Zkratky: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – kalcitriol; $25(\text{OH})\text{D}_3$ – kalcidiol; CYP27B – 1α -hydroxylasa, DC – dendritické buňky, Ig – imunoglobuliny, Th1 – pomocné zánětlivé T-lymfocyty, Th2 –

pomocné regulační T-lymfocyty, Treg – regulační T-lymfocyty, VDR – receptory pro vitamín D.

4.4.5 Mechanismus inhibice IL-12

Konkrétně cytokin IL-12 je v modulaci T-lymfocytů prostřednictvím DC velmi významný, neboť představuje důležitý faktor pro vývoj T_{H1} buněk a inhibice jeho exprese vede k odklonění od T_{H1} zánětlivé linie pomocných T-lymfocytů k regulační T_{H2} linii, stejně jako zvýšená produkce IL-10 (Mathieu *et Adorini*, 2002). IL-12 navíc zastává funkci růstového faktoru T-lymfocytů a NK buněk (přírození zabíječi), prostřednictvím jejichž vývoje stimuluje sekreci IFN- γ . Skládá se ze dvou samostatnými geny exprimovaných proteinových domén, a to p35 a p40, přičemž exprese p40 je na transkripční úrovni podstatně více inducibilní. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ potlačuje transkripční aktivaci genů pro obě tyto domény IL-12, a to po heterodimerizaci VDR-RXR a vazbě tohoto heterodimeru na promotorovou oblast genu pro IL-12. Následně 1,25(OH) $_2$ D $_3$ jednak částečně inhibuje připojení jaderného transkripčního faktoru NF- κ B na κ B sekvenci promotoru p40, jednak způsobuje downregulaci exprese samotného NF- κ B. Tyto dva mechanismy současně pak zajišťují sníženou produkci IL-12. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ navíc pravděpodobně ovlivňuje procesy vedoucí k jaderné translokaci či samotnou aktivaci NF- κ B (D'Ambrosio *et al.*, 1998).

4.4.6 Mechanismus inhibice NF- κ B a TNF- α

TNF- α produkovaný makrofágy a monocyty zaujímá roli významného iniciátoru protizánětlivé reakce organismu na infekci patogeny prostřednictvím masivního zvýšení koncentrace leukocytů v místě infekce. Na druhou stranu je však nadměrná či dlouhodobá produkce TNF- α jedním z příznaků systémových zánětů, které mohou být spojeny s autoimunitním onemocněním, a zároveň příčinou jejich patologických následků – jeho regulace má tedy v případě zánětlivých onemocnění velký význam (Udalova *et al.*, 1998).

Transkripční faktor NF- κ B, přítomný v řadě různých buněk, je hlavním regulátorem aktivity genů, jejichž produkty se podílejí na imunitních, zánětlivých a stresových reakcích organismu, ale také na apoptóze a dalších procesech. Ke spuštění kanonické dráhy NF- κ B dochází prostřednictvím ligandem zprostředkované aktivace receptorů pro cytokiny, jako

jsou IL-1 či TNF- α , dále antigenem indukovanou aktivací receptorů T-lymfocytů a B-lymfocytů (Zheng *et al.*, 2011) a vazbou bakteriálních nebo virových produktů, například bakteriálních lipopolysacharidů, na TLR (Jacobs *et Harrison*, 1998). Nejvíce je však zkoumána pro svůj stimulační vliv na aktivaci, proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů. NF- κ B se strukturně skládá z dimeru tvořeného kombinací dvou z pěti proteinů Rel proteinové rodiny – p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 / p105 (NF- κ B₁) nebo p52 / p100 (NF- κ B₂), z nichž každý obsahuje DNA-vazebnou doménu RHR (Rel homologní region), zprostředkovávající spuštění transkripce cílových genů (Zheng *et al.*, 2011). RHR je tvořen 2 doménami: C-terminální doména (RHR-c) umožňuje dimerizaci konkrétních Rel proteinů, zatímco N-terminální doména (RHR-n) obsahuje sekvenci usnadňující interakci celého RHR s DNA v jádře (Jacobs *et Harrison*, 1998).

Dimery Rel proteinů jsou v nepřítomnosti stimulu lokalizovány v cytoplasmě ve vazbě na inhibiční protein I κ B α (Cohen-Lahav *et al.*, 2006). I κ B α tyto dimery udržuje inaktivované prostřednictvím inhibiční vazby své ARD domény na RHR proteinů p65, RelB nebo c-Rel (Zheng *et al.*, 2011) a navíc zabraňuje fosforylaci p65 svým připojením na katalytickou doménu PKA, což znemožňuje translokaci NF- κ B do jádra, zde pak jeho vazbu na DNA a spuštění transkripce. V reakci na vnější stimuly dochází k aktivaci kanonické, na I κ B α závislé dráhy NF- κ B, zahrnující fosforylaci I κ B α , její ubiquitinaci prostřednictvím ubiquitin-E3 ligasy a následnou degradaci I κ B α 26S proteasomem, což způsobuje přerušování inhibice PKA, která následně fosforyluje p65 a zvyšuje tak jeho transkripční aktivitu. Po současném odkrytí RHR domény následuje uvolnění NF- κ B z vazby v cytoplasmě a spuštění transkripce cílových genů v jádře (Jacobs *et Harrison*, 1998). 1,25(OH)₂D₃ způsobuje zvýšenou expresi I κ B α a zároveň potlačuje jeho fosforylaci, což vede k inhibiční vazbě NF- κ B v cytoplasmě a zabránění jeho translokace do jádra. V důsledku toho dochází ke snížení exprese genů kódujících zánětlivé proteiny včetně TNF- α (Jacobs *et Harrison*, 1998).

Alternativní nonkanonická NF- κ B se od kanonické odlišuje zejména tím, že k uvolnění NF- κ B z vazby nedochází fosforylací a následnou degradací I κ B α . V tomto případě blokuje NF- κ B v cytoplasmě p100 a uvolnění jaderného faktoru z vazby umožňuje fosforylace a následné zpracování p100, který podstupuje stejně jako I κ B α proteazomální degradaci. Tento proces je však složitější a oproti kanonické dráze NF- κ B odlišně regulován. Také signální mechanismy se zde liší (Sun, 2011). Na druhou stranu

nonkanonická dráha NF- κ B rovněž hraje důležitou roli v regulaci imunitních funkcí, konkrétně umožňuje organogenezi sekundárních lymfatických orgánů a brzlíku, zrání DC, B-lymfocytů a nejspíš i diferenciaci T-lymfocytů. V posledním případě pravděpodobně inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů a zároveň vyvolává expresi protizánětlivého proteinu indolamin-2,3-dioxygenasy, čímž dvojnásobně posiluje tvorbu T_{REG}. Nicméně problematika nonkanonické dráhy NF- κ B je celkově značně složitá, neboť její účinek není pouze protizánětlivý, ale může také působit opačně směrem k vývoji TH₁ a TH₁₇ buněk (Sun, 2012).

4.4.7 Mechanismus inhibice IFN- γ

K inhibici exprese genu pro IFN- γ *in vitro* dochází po navázání heterodimeru VDR-RXR do VDRE promotorové oblasti genu kódujícího IFN- γ , což způsobuje interferenci s transkripcí tohoto genu. Dále zde však ještě zůstává zbytková negativní regulace exprese IFN- γ zapříčiněná působením 1,25(OH)₂D₃ na nadřazenou oblast s enhancerem, která má výrazný vliv na aktivaci promotoru (Cappitelli *et* Santoni, 1998). Nicméně některé *in vivo* studie tyto experimenty nepotvrzují (Mathieu *et* Adorini, 2002).

4.4.8 Mechanismus inhibice IL-2

V rámci experimentálních studií byl potvrzen významný stimulační vliv IL-2 na vznik a progresi zánětlivých autoimunitních onemocnění, a jeho inhibice prostřednictvím 1,25(OH)₂D₃ se tak jeví jako další klíčový faktor imunosuprese. Represe transkripce genu pro IL-2 je umožněna blokadou tvorby komplexu NFAT / AP-1 obsazením kompozitního elementu NFAT / AP-1 promotoru IL-12 pomocí VDR-RXR (Alroy *et al.*, 1995). NFAT (jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů, *nuclear factor of activated T cells*) se mimo jiné vyznačuje schopností vazby zejména na promotor genu pro IL-12 lidských T-lymfocytů, vazebná místa byla však také nalezena na IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, TNF- α , GM-CSF a IFN- γ . Většina genů pro cytokiny klíčové pro zrání a diferenciaci T-lymfocytů je tedy regulována právě NFAT (Trevillyan *et al.*, 2001). Tento jaderný faktor se po navázání transkripčních faktorů podílí na aktivaci T-lymfocytů vyvoláním funkčních změn jejich genové exprese charakteristických pro aktivované T-lymfocyty (Macian, 2005). Konkrétně se jedná o transkripční faktory Fos a Jun, které dimerizují za vzniku

proteinu AP-1 (Hai *et* Curran, 1991) a následně tvoří kvarterní komplexy s NFAT a DNA na NFAT / AP-1 kompozitních elementech promotoru genu pro IL-12, což vede k aktivaci jeho genové exprese. Navíc při vazbě NFAT s připojeným transkripčním faktorem do promotoru genu pro IFN- γ v průběhu ranných fází aktivace naivních T-lymfocytů dochází k jejich vývoji v T_{H1} linii, zatímco vazba do promotoru genu pro IL-4 vede po diferenciaci T-lymfocytů k jejich zařazení do T_{H2} linie (Macian, 2005).

Pro vytvoření komplexu NFAT / AP-1 je nezbytná jednak Ca²⁺ signalizace klíčová pro aktivaci NFAT, jednak RAS-MAPK dráha zodpovědná za vznik a aktivaci Fos a Jun. Aktivaci NFAT a celkovou regulaci zrání T-lymfocytů umožňuje přítomnost Ca²⁺ a kalcineurinu, přičemž intracelulární hladiny Ca²⁺ se navíc zvyšují pre-TLR signalizací, což je impuls k aktivaci NFAT a NF- κ B (Macian, 2005).

4.4.9 Mechanismus inhibice GM-CSF

Exprese GM-CSF probíhá nejen v aktivovaných T-lymfocytech, ale také v makrofázích či endoteliálních buňkách. Jedná se o faktor, umožňující proliferaci, diferenciaci a přežívání zralých granulocytů a monocytů. Enhancer promotoru genu pro GM-CSF obsahuje čtyři vazebná místa pro AP-1, přičemž jedno z nich je blízce podobné kompozitnímu elementu pro vazbu NFAT / AP-1, který se vyskytuje v IL-2. 1,25(OH)₂D₃ způsobuje represi transkripce genu pro GM-CSF dvěma způsoby. Jde o vytlačení NFAT1 z vazby na kompozitní element prostřednictvím VDR, nicméně vzniklá represe může být snížena zvýšenou expresí NFAT1 *in vivo*. V druhém případě interakce mezi VDR a c-Jun sice vede ke stabilizaci vazby Jun-Fos heterodimeru na přilehlém AP-1 místě, nicméně k represí transkripce dochází vlivem zvýšené exprese c-Jun. Inhibice tvorby GM-CSF pak způsobuje inhibici proliferace T-lymfocytů a supresi imunitní odpovědi (Towers *et al.*, 1999).

4.4.10 Mechanismus inhibice IL-17

K produkci cytokinu IL-17 dochází zejména prostřednictvím buněk T_{H17}, méně však také v důsledku aktivity makrofágů, DC, neutrofilů, mastocytů či tzv. přirozenými zabíječi (NK, *natural killers*), řadících se mezi lymfocyty. Jedná se o cytokin produkováný

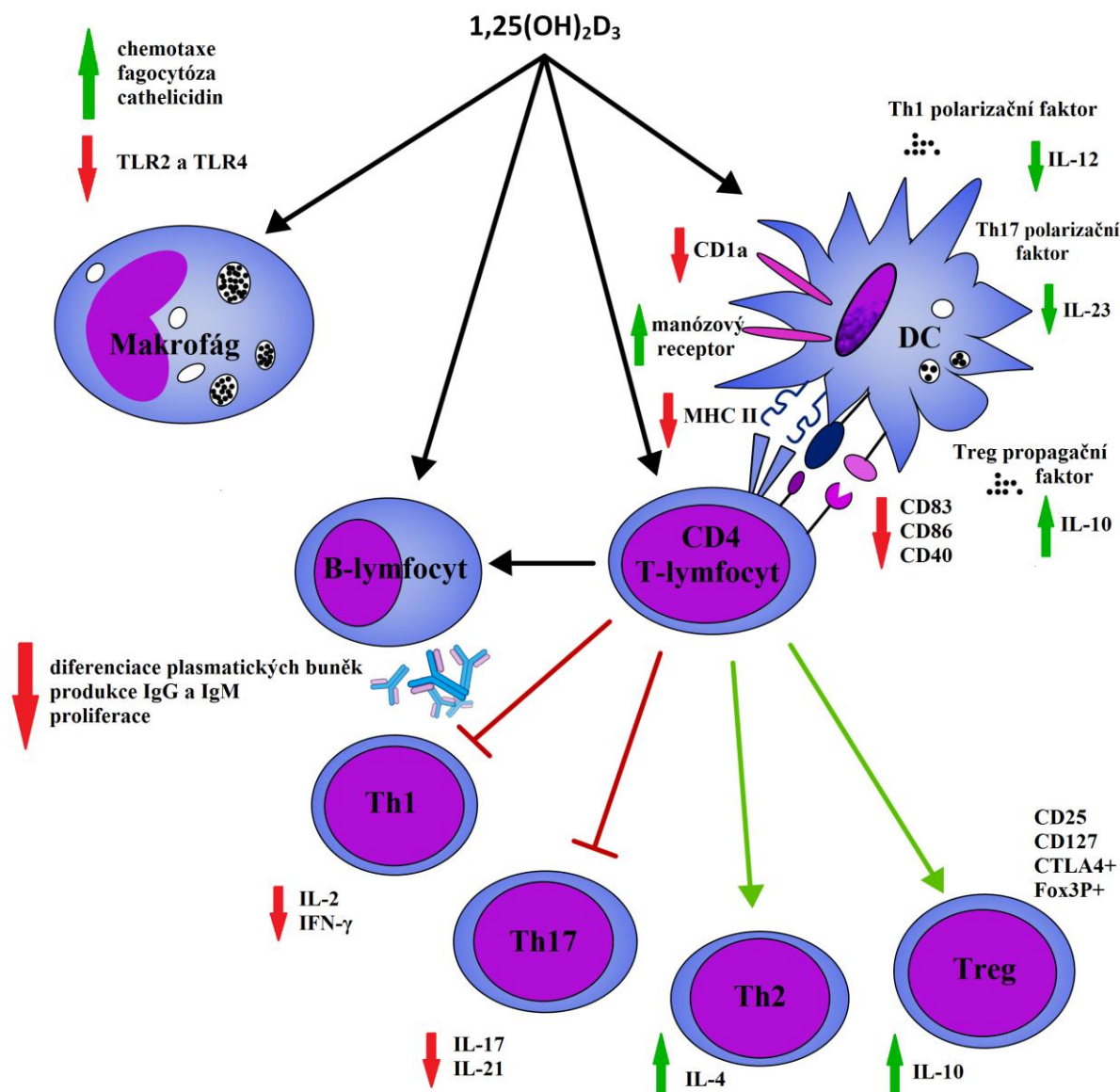
zejména při bakteriální či mykotické infekci jakožto reakce na signalizaci IL-23 k zahájení či podpoře zánětlivých procesů, a to za současné přítomnosti IL-1 a IL-6 (Zhu *et Qian*, 2012). Tvorbu IL-17 rovněž podněcuje přítomnost TNF- β , který však pro tvorbu tohoto cytokinu není esenciální jako IL-1, IL-6 a IL-23 (Ghoreschi *et al.*, 2010) a ve vysokých koncentracích navíc produkci IL-17 přes inhibici IL-23 potlačuje za současného navyšování hladiny T_{REG} (Lee *et al.*, 2009). Působení IL-17 zpravidla doprovází další prozánětlivé molekuly. Jeho význam je obrovský především v zánětlivých reakcích oblasti epitelu či sliznic. K up-regulaci tohoto cytokinu dochází rovněž v rámci zánětlivých ložisek postižených autoimunitní reakcí, díky čemuž hraje nesmírně důležitou roli v patogenezi autoimunitních chorob, přestože cytokiny indukované T_{H1} jeho produkci tlumí (Zhu *et Qian*, 2012).

Proteinová rodina cytokinů IL-17 zahrnuje celkem šest členů, a to IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E a IL-17F, které vykazují značnou homologii vůči IL-17A, někdy obecně označovanému jako IL-17. Stejně tak receptory, specifické pro jednotlivé členy proteinové rodiny IL-17, jsou označovány IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD a IL-17RE. Tyto receptory dimerizují a specificky váží jednotlivé subtypy IL-17, což vyvolává konkrétní imunitní odpověď. Dimery rovněž vytváří IL-17A spolu s IL-17F, vážící se do receptoru IL-17RA / IL-17RC, což indukuje zánětlivé signály či autoimunitní reakci. Stejnou odpověď indukuje též vazba IL-17C do heterodimeru IL-17RA / IL-17RE. Objasněnou funkci má pak ještě vazba IL-17E do IL-17RA / IL-17RB, vyvolávající nárůst buněk linie T_{H2} (Song *et Qian*, 2013). Na základě objevu z loňského roku víme, že IL-17RD reguluje signalizaci IL-17A, nicméně IL-17A samotný se zde neváže (Mellett *et al.*, 2012). Odpověď na vazbu IL-17B do dosud neznámého heterodimeru zatím není známa, stejně jako receptor pro IL-17D (Song *et Qian*, 2013).

Mechanismus působení IL-17 spočívá v indukci celé řady dalších prozánětlivých cytokinů, chemokinů, růstových faktorů, adherních molekul a proteinů, a to nejen pro jeho tvorbu klíčových IL-1 a IL-6, ale také IL-8, TNF- α , antimikrobiálních peptidů, enzymů matrixových metaloproteinů a dalších, a to prostřednictvím několika různých signálů. Jedná se zejména o dobře prozkoumanou NF- κ B signální dráhu, ale také o méně objasněné dráhy MAPK, vazebných proteinů pro enhancer CCAAT C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins) a posttranskripční stabilizaci mRNA. Následný patologický efekt jakožto příčina konkrétních onemocnění je dán typem buněk exprimujících receptor pro IL-17R –

ten patří mezi všudypřítomné receptory, nicméně jeho exprese je obzvláště vysoká v hematopoetických tkáních (Zhu *et* Qian, 2012), dále v již zmíněných epitelárních buňkách, fibroblastech, keratinocytech, endoteliárních buňkách a osteoblastech, stejně jako v DC či makrofázích (Kolls *et* Lindén, 2004).

Současná léčba autoimunitních onemocnění zacílením tohoto cytokinu spočívá buď v přímé inhibici tvorby IL-17 a jeho vazby na IL-17R, nebo nepřímo v potlačení aktivity signálních drah regulujících činnost IL-17 a expresi IL-17R. Stejně tak by potenciálně připadala v úvahu suprese prozánětlivých cytokinů podílejících se na tvorbě IL-17 či TH₁₇ samotných (Zhu *et* Qian, 2012). Komplexní přehled vlivu 1,25(OH)₂D₃ na produkci cytokinů je zobrazen na Obr. 8.



Obr. 8. Vliv $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na produkci cytokinů. Vlivem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na vrozenou imunitu dochází k jejímu celkovému posílení, a to jak podporou produkce antimikrobiálních peptidů, tak schopnosti chemotaxe a fagocytózy makrofágů. V případě DC je nespecifická imunita rovněž posílena zvýšenou expresí manósového receptoru pro rozpoznání bakteriálních polysacharidů. Na úrovni DC však prostřednictvím $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zároveň dochází ke snížené expresi antigenu vázaného přes molekulu MHC II na povrchu této imunitní buňky, což znesnadňuje aktivaci T-lymfocyty a následný rozvoj specifické imunitní reakce. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ současně moduluje typ DC produkovaných kostimulačních molekul. Snížená exprese IL-12 a IL-23 má za následek inhibici polarizace T-lymfocytů na zánětlivé linie Th1 a Th17, čímž směřuje polarizaci buněk k regulační linii Th2, zatímco

zvýšená exprese IL-10 indukuje polarizaci buněk na regulační Treg. Prostřednictvím snížení hladiny zánětlivých cytokinů IL-2 a IFN- γ potlačuje 1,25(OH) $_2$ D $_3$ polarizaci T-lymfocytů na Th1 a IL-17 a IL-21 na Th17. Naopak regulační až imunosupresivní odpověď je vyvolána indukcí tvorby IL-4, cytokinu umožňujícího polarizaci T-lymfocytů na regulační linii Th2, a dále zvýšenou expresí IL-10 a tím polarizaci Treg. Treg pak na svém povrchu exprimují pro svou funkci typické molekuly, a to CD25, CD127, CTLA4 a vlastní transkripční faktor Fox3P. V případě B-lymfocytů 1,25(OH) $_2$ D $_3$ snižuje diferenciaci na plasmatické buňky, inhibuje jejich proliferaci a produkci IgG a IgM. Zkratky: 1,25(OH) $_2$ D $_3$ – kalcitriol; CD1 α , CD4, CD25, CD40, CD83, CD86, CD127 – diferenciací skupina 1 α , 4, 25, 40, 83, 86, 127; CTLA4 – antigen 4 asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty; DC – dendritická buňka; Fox3P – *forkhead box 3* (scurfin); P IFN- γ – interferon γ ; IgG, IgM – imunoglobuliny (protilátky) třídy G, M; IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, – interleukiny; MHC II – hlavní histokompatibilní komplex II. třídy; TLR2, TLR4 – *toll-like receptor 2, 4*; Th1, Th17 polarizační faktor – faktor udávající polarizaci pomocných T-lymfocytů (Th) do linií zánětlivých pomocných Th1 a Th17; Treg propagační faktor – faktor důležitý pro produkci regulačních T-lymfocytů.

5 AUTOIMUNITNÍ A IMUNOPATOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

Činnost všech imunitních buněk musí být neustále udržována v rovnováze, jinak hrozí odchýlení od fyziologické imunitní reakce jedním nebo druhým směrem k reakci patologické. Zánětlivé procesy mohou gradovat v přehnanou imunitní odpověď vedoucí k poškození vlastních buněk a tkání, vývoji autoimunitních onemocnění, rejekci (odmítnutí) transplantátu, alergií, astmatu či atopií. Na druhou stranu přílišná suprese obranných procesů, stejně jako nadměrná indukce protizánětlivých cytokinů, může vést ke ztrátě imunitního dohledu a tak k nekontrolované infiltraci patogenů či vzniku nádorového bujení. Za tyto dva odlišné stavy odpovídají většinou různé subpopulace T-lymfocytů, přičemž T_{H1} a T_{H17} obecně působí vznik autoimunitních zánětlivých či přecitlivělých reakcí, zatímco T_{H2} a T_{REG} jejich nežádoucí útlum (Roncarolo *et Battaglia*, 2007).

5.1 Běžná onemocnění spojená s deficitem vitamínu D

Mezi klasické účinky vitamínu D patří jeho již zmiňovaný vliv na homeostázu Ca^{2+} a fosfátů, z čehož vyplývají konkrétní problémy vznikající při jeho nedostatku. Jedná se zejména o rachitis, osteoporózu (ztráta Ca^{2+} a křehnutí kostí), osteoartrózu (úbytek kloubní chrupavky) (McAlindon *et al.*, 1996) či vyšší riziko vzniku zlomenin (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2005). Dále byl nedostatek $1,25(OH)_2D_3$ detekován až u 93 % pacientů hospitalizovaných pro myopatii neboli svalovou slabost, bolest kostí a svalů s doprovodnou fibromyálií (chronická bolest svalů, šlach, kloubů bez známé etiologie), chronickým únavovým syndromem či depresí (Plotnikoff *et Quigley*, 2003). Myopatie, působící vyšší tendenci pádů, přímo souvisí s deficitem $1,25(OH)_2D_3$ také na základě jiných studií (Bischoff *et al.*, 2003). Úbytek kostní hmoty neboli osteomalacie způsobená deficitem $1,25(OH)_2D_3$ (Eastwood *et al.*, 1977) je často dáována do souvislosti s dalším závažným onemocněním vznikajícím při nízké hladině tohoto vitamínu, a to chronickým selháním ledvin (CKD, *chronic kidney disease*) (Rouached *et al.*, 2008). S tímto jevem souvisí rovněž poklesem $1,25(OH)_2D_3$ indukovaná hypertenze (Lind *et al.*, 1988).

5.1.1 Hyperparathyreóza

Jednu z nejčastějších komplikací objevující se u pacientů s CKD představuje sekundární hyperparathyreóza. Jedná se v podstatě o hyperaktivitu příštítných tělísek, která na podnět snížení hladiny Ca^{2+} v počátku onemocnění syntetizují a uvolňují do krve nadměrné množství PTH, což stimuluje mechanismy zvyšující hladiny Ca^{2+} v krevní plasmě a následně tak vede k rozvoji hyperkalcémie (Slatopolsky *et al.*, 1995). Ve snaze o zlepšení pacientova stavu pravidelnou hemodialýzou pak následně narůstá hladina fosfátů v krvi až ke stavům hyperfosfatémie. Pro redukci těchto iontů v krevní plasmě se při dialýze obecně využívá CaCO_3 , který však způsobuje přídatný nárůst Ca^{2+} a již stimulací sekrece PTH vzniklou hyperkalcémií tak ještě podporuje. Vedle toho zároveň postupně nastává stav narušení syntézy $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v organismu vedoucí k udržování jeho hladin na příliš nízkých hodnotách (Delmez *et al.*, 1992). Vzhledem ke své schopnosti potlačovat expresi pre-pro-PTH by se $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nabízel jako vhodné řešení těchto nepříznivých efektů na funkci příštítných tělísek a představoval tak účinnou látku pro léčbu sekundární hyperparathyreózy, jakožto zmírnění vedlejších důsledků CKD, nicméně $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sám o sobě přirozeně hladiny Ca^{2+} v krevní plasmě navyšuje a neřeší tak riziko vzniku hyperkalcémie. Použití analogů vitamínu D, vyznačujících se zejména nižší nebo zanedbatelnou tendencí vyvolávat hyperkalcémii a naopak snižovat fosfatémii, však řešení nejenže nabízí (Slatopolsky *et al.*, 1995), ale v posledních letech také realizuje.

5.2 Autoimunitní onemocnění spojená s deficitem vitamínu D

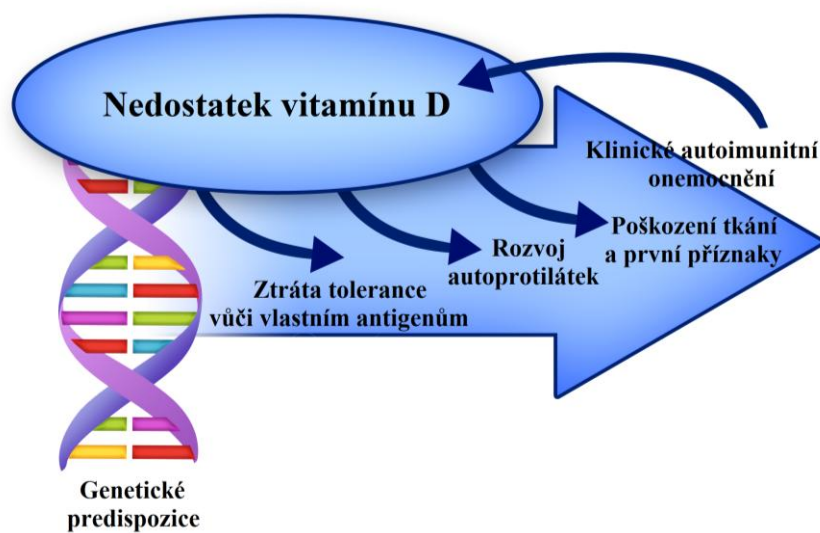
V experimentálních studiích na různých živočišných modelech bylo potvrzeno, že suplementace $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prokazatelně snižuje riziko rozvoje nejčastějších autoimunitních onemocnění jako diabetes mellitus I. typu (Zella *et al.*, 2003), revmatoidní artritidy (Cantorna *et al.*, 1998), autoimunitní tyreoditidy neboli zánětu štítné žlázy (Fournier *et al.*, 1990) a roztroušené sklerózy (Cantorna *et al.*, 1996). Významná je rovněž role $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v rozvoji kardiovaskulárních onemocněních (Zittermann *et al.*, 2008).

5.2.1 Vznik a průběh autoimunitních onemocnění

Přesná etiologie autoimunitních onemocnění zůstává stále neznámá, neboť se jedná dlouhodobý proces ovlivněný řadou faktorů, jako jsou genetické predispozice, infekční onemocnění, apoptické podněty a vnější prostředí. V principu dochází k narušení centrální tolerance vlastních antigenů a s tím související klonální expanzi autoreaktivních T-lymfocytů a B-lymfocytů, stejně jako periferní tolerance zajišťované T_{REG}. Mírně autoreaktivní buňky se v organismu vyskytují fyziologicky jakožto produkt zracích kontrolních procesů v brzlíku. Jejich afinita k vlastním antigenům (autoantigenům) se nachází pod hranicí, která by indukovala apoptózu, takže jsou tyto B-lymfocyty a T-lymfocyty uvolňovány do krve, nicméně jistou míru autoreaktivity si zachovávají. Nicméně v případě zesílené exprese MHC v rámci APC, popřípadě při navýšené signalizaci kostimulačními molekulami jako jsou cytokiny, u nich po setkání s autoantigeny nastává aktivace a následná klonální expanze (Delves *et al.*, 2011). Jak již bylo uvedeno výše, za zesílenou imunitní odpověď a reaktivitu zodpovídá konkrétně nárůst populací TH₁ a TH₁₇. Autoimunitní onemocnění, které většinou bývá systémově zahájeno masivní imunitní odpovědí T_{H1} autoreaktivních buněk, doprovází přetrvávající zánět způsobený právě T_{H17} (Simons *et al.*, 2013). Tyto autoreaktivní T-lymfocyty migrují do tkání, kde způsobují masivní zánětlivé reakce. Výsledkem je pak systémový či orgánový zánět poškozující tkáň (Delves *et al.*, 2011).

Velmi významnou roli zde však hrají také APC, které intenzitou prezentace svých antigenů modulují míru aktivace naivních T-lymfocytů. Jedná se zejména o DC a B-lymfocyty. DC, vyskytující se ve všech tkáních, se jednak po setkání s antigenem mění na zralé formy, schopné aktivovat naivní T-lymfocyty a posilovat tak imunitní reakce. Nicméně nezralé DC, které se sice setkaly s antigenem, fagocytovaly jej a prezentovaly ve vazbě na MHC molekulu v rámci své membrány, ale nenastal u nich proces zrání z důvodu chybějící exprese kostimulačních molekul či nepřítomnosti cytokinů, nejsou schopny T-lymfocyty aktivovat. Naopak v tomto případě dochází k protichůdné odezvě, spočívající buďto v supresi aktivity T-lymfocytů snížením jejich citlivosti na různé podněty, nebo indukci jejich diferenciaci na T_{REG}. Právě na prezentaci antigenu nezralými DC je založena tolerance určitých antigenů. Tyto nezralé DC se označují jako tolerogenní DC a vyskytují se zejména v periférii (Maldonado *et von Andrian*, 2010). Přírozenou prevalencí k chybějící signalizační komponentě u těchto buněk zprostředkovávají cytokininové

signály, a to zejména TNF, GM-CSF, granulocytární kolonie stimulující faktor (G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*), makrofágový kolonie stimulující faktor (M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*) a IL-10 v kombinaci s TGF- β nebo sám o sobě. V klinické praxi se k navození tvorby a udržování hladiny tolerogenních DC využívá léčiv s obsahem glukokortikoidů, prostaglandinem E2, vitamínu D, popřípadě obecně imunosupresiv jako je cyklosporin, rapamycin, mofetil a další. V neposlední řadě se k tomuto účelu používá genový transfer. Kromě efektu všech těchto látek a signálních molekul na DC je zde ještě důležitý jejich účinek na IL-12, jehož sekreci inhibují a podporují tak sníženou schopnost DC aktivovat T-lymfocyty (Amodio *et* Gregori, 2012). Naproti tomu IL-10 představuje klíčový cytokin v antigen prezentujícím procesu, neboť zabraňuje prezentaci MHC na povrchu DC, stejně jako expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 (Zheng *et al.*, 2004) a prozánětlivých cytokinů IL-12, IL-1 β , IL-6 či TNF- α . Ačkoli IL-10 inhibuje schopnost DC aktivovat naivní T-lymfocyty, zvyšuje podíl tolerogenních buněk a celkově tak přispívá k navození tolerance (Amodio *et* Gregori, 2012). Celkové jednoduché schéma vzniku autoimunitní reakce v souvislosti s deficitem vitamínu D je zaznačeno na Obr. 9.



Obr. 9. Vztah mezi deficitem 1,25(OH) $_2$ D $_3$ a vznikem autoimunitních onemocnění. Nedostatek vitamínu D způsobený genetickou predispozicí či jeho nedostatečným příjmem v potravě a nízkou expozicí slunečnímu záření vede k celé řadě chorob. Z hlediska narušení funkce imunitního systému může jeho deficit přispívat zejména ke vzniku autoimunitních onemocnění. U jedinců s různými odchylkami od normální imunitní reakce

byla v četných studiích rovněž zpětně potvrzena velmi nízká hladina vitamínu D v organismu.

5.2.2 Diabetes mellitus I. typu

Onemocnění diabetes mellitus I. typu je vyvoláno masivní zánětlivou reakcí imunitních buněk linií T_{H1} a T_{H17} vůči vlastním β -buňkám Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, které následkem toho nejsou schopny vytvářet hormon insulin a regulovat tak hladinu krevní glukosy. V tomto případě byla navýšená hladina $1,25(OH)_2D_3$ u neobéznic diabetických myší v raných fázích rozvoje nemoci provázena expresí příslušných protizánětlivých cytokinů a chemokinů, což vedlo k útlumu až vymizení diabetu (Gysemans *et al.*, 2005). Epidemiologické studie navíc zaznamenaly souvislost mezi nízkou hladinou $1,25(OH)_2D_3$ u dětí v prvních měsících po narození a vyšší pravděpodobností pozdějšího rozvoje diabetu I. typu. Množství $1,25(OH)_2D_3$ u novorozenců je přitom ovlivněno nejen jeho pobytem na slunci a orálním příjmem doplňků s obsahem vitamínu D, ale rovněž rodinnou anamnézou, zaměstnáním rodičů či dobou kojení, která by v tomto případě neměla být kratší než 6 měsíců (Bener *et al.*, 2009). Přítomnost autoprotilátek u potomka navíc koreluje s množstvím vitamínu D přijímaným matkou během těhotenství. Tyto autoprotilátky vytvářené proti autoantigenům β -buněk Langerhansových ostrůvků signalizují počátek zánětlivého narušení a destrukce tkáně slinivky břišní, tedy preklinické fáze diabetu I. typu, známé také pod názvem autoimunitní insulitida. Na základě míry exprese prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a faktorů vnějšího prostředí, mezi které patří také hladina $1,25(OH)_2D_3$, pak může autoimunitní insulitida vykazovat perzistenci až po dobu několika let, nebo přejít k plnému rozvoji diabetu I. typu, popřípadě zcela vymizet. Obecně se diabetes mellitus I. typu vyskytuje ve značně nižší míře u dospělých, kteří v dětství přijímali vitamín D v potravě nebo jako doplněk stravy a u dětí, jejichž matky v průběhu těhotenství navyšovaly svou hladinu $1,25(OH)_2D_3$ pobytem na slunci či orálními dávkami vitamínu D (Fronczak *et al.*, 2003).

5.2.3 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza představuje onemocnění centrální nervové soustavy. Toto onemocnění je běžně zkoumáno v laboratorních podmínkách na modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) z důvodu jejich velmi blízkého chronického průběhu. Roztroušená skleróza představuje chronické autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy, způsobené poškozením neuronů centrální nervové soustavy prostřednictvím zánětlivých reakcí buněk imunitního systému. Jedná se konkrétně o demyelinizaci těchto neuronů, tedy rozpad myelinových pochev obalujících axony i rozpad samotných axonů, což má za následek jednak sníženou schopnost neuronů vést nervový vzruch, jednak přeskokování signálu na okolní struktury. Etiologie tohoto onemocnění je charakterizována záněty zejména buněk bílé hmoty mozkové, způsobené přítomností T_{H1} , T_{H17} , T_C , makrofágů a v menší míře rovněž B-lymfocytů. Periferní makrofágy zde reprezentují APC, aktivující T-lymfocyty, které následně procházejí přes hematoencefalickou bariéru a následně spouští zánětlivou reakci (Smolders *et al.*, 2008).

Experimenty na myších, kterým byl ještě před indukcí EAE podáván vitamín D, prokázaly, že vyšší hladina $1,25(OH)_2D_3$ zabraňuje vzniku a rozvoji této choroby. Naproti tomu myši, kterým byl vitamín D podáván až při probíhajícímu onemocnění EAE, sice nevykazovaly úplné vymizení choroby, ale vymizení všech příznaků; při odebrání dávek vitamínu D se naopak veškeré příznaky EAE navrátily (Cantorna *et al.*, 1996). $1,25(OH)_2D_3$ navíc v případě EAE *in vivo* u myši neindukuje pouze nárůst protizánětlivých cytokinů a pokles cytokinů prozánětlivých, ale rovněž zvýšení exprese proapoptických genů, mezi jejichž translační produkty patří proteiny zapojené do apoptické dráhy, jako je calpain-2 či protein asociovaný s kaspasou 8. Na druhou stranu mohou být tyto experimentální studie zavádějící, neboť EAE se od roztroušené sklerózy histologicky mírně odlišuje (Spach *et al.*, 2004).

Epidemiologické studie roztroušené sklerózy jsou minimální, ale ukazuje se, že pacienti s tímto onemocněním mají oproti kontrolním subjektům nízkou hladinu $1,25(OH)_2D_3$ (Munger *et al.*, 2004). Studie provedená na bělošské populaci ukázala, že $1,25(OH)_2D_3$ výrazně snižuje riziko rozvoje roztroušené sklerózy u rizikové populace, popřípadě působí pokles rizika relapsů u nemocných (Munger *et al.*, 2006). U pacientů s roztroušenou sklerózou není vzácný ani výskyt polymorfismů VDR, což může být jedním z důvodů

nízkého metabolického využití tohoto hormonu (Niino *et al.*, 2000). V současné době je roztroušená skleróza, stejně jako celá řada dalších autoimunitních nemocnění, léčena vysokými dávkami kortikoidů zacilujících na prozánětlivé cytokiny. Tato terapie však zahrnuje velké množství vážných nežádoucích účinků včetně zvýšeného rizika rozvoje diabetu a osteoporózy, přírůstku tělesné hmotnosti či vzniku šedého zákalu (Xing *et al.*, 2002).

5.2.4 Idiopatická střevní onemocnění

Nízká hladina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se rovněž často vyskytuje u pacientů s idiopatickými střevními záněty, tedy Crohnovou chorobou (Wang *et al.*, 2010) a ulcerózní kolitidou (Daniel *et al.*, 2006). Jedná se o příbuzná autoimunitní zánětlivá onemocnění trávicího traktu nepříliš jasné etiologie, vyznačující se $\text{T}_{\text{H}1}$ zprostředkovanou masivní reakcí vůči vlastním buňkám tenkého či tlustého střeva v případě Crohnovy choroby (Wang *et al.*, 2010) a konečnicku v rámci ulcerózní kolitidy, popřípadě rovněž tlustého střeva (Daniel *et al.*, 2006).

5.2.5 Infekční onemocnění

Celá řada nejčastěji randomizovaných studií potvrzuje významný vliv deficitu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na vznik a průběh akutních infekcí dýchacího traktu (Ginde *et al.*, 2009; Laaksi *et al.*, 2010), a to i v případě novorozeneckých akutních infekcí dolních cest dýchacích u dětí, jejichž matky měly v průběhu těhotenství nízké plasmatické hladiny $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Karatekin *et al.*, 2009). Tento deficit stojí také za vyšší mortalitou pacientů s HIV a navíc zvyšuje pravděpodobnost rozvoje AIDS (Viard *et al.*, 2011). Množství $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je rovněž spojováno s častějším výskytem doprovodných chronických onemocnění u HIV pozitivních pacientů (Dao *et al.*, 2011).

5.2.6 Transplantace orgánů

Nedostatek vitamínu D je spojen s horší prognózou u osob trpících chronickou lymfatickou leukémií, přičemž až 90 % těchto pacientů, kteří často podstupují alogenní transplantaci kmenových buněk, vykazují významný deficit vitamínu D (Sproat *et al.*, 2011). Obecně je

odmítnutí transplantátu, stejně jako řada autoimunitních onemocnění, zapříčiněno působením aloreaktivních T-lymfocytů dárce, které způsobují GVHD. Díky svým imunomodulačním vlastnostem by tak 1,25(OH)₂D₃ vyvolával supresi aktivity APC a indukci vzniku tolerogenních DC, což by vedlo k inhibici tvorby zánětlivých T-lymfocytů a naopak stimulaci produkci T_{REG}. Prostřednictvím těchto účinků 1,25(OH)₂D₃ by následně docházelo k velmi efektivní prevenci GVHD, a to ať už akutní, nebo chronické formy. Tento imunosupresivní efekt 1,25(OH)₂D₃ na aloreaktivní T-lymfocyty byl zatím prokázán pouze ve studii *in vitro* a ve studiích na zvířatech, nicméně i tak by hladina vitamínu D v krevní plasmě u pacientů podstupujících alogenní transplantaci mohla představovat biomarker rizika vzniku GVHD, stejně jako nárůst množství VDR ve zmíněných imunitních buňkách způsobená dostatečně navýšenou hladinou 1,25(OH)₂D₃ (Joseph *et al.*, 2012).

5.2.7 Lupénka (psoriáza)

Lupénka představuje komplexní chronické zánětlivé onemocnění zejména kůže, ale také nehtů a kloubů. Projevuje se vznikem ložisek s odlupujícími se bílými šupinkami na jinak zarudlé kůži. Významnou roli v rozvoji této choroby kromě dědičných predispozic hrají autoimunitní faktory, zejména T-lymfocyty indukované TNF- α (Chiricozzi *et al.*, 2011).

K pochopení rozvoje tohoto onemocnění je nutné základní pochopení imunitních reakce, odehrávajících se v kůži. Místní nezralé DC, známé jako Langerhansovy buňky, jsou lokalizovány v hlubokých vrstvách epidermis. Jejich úkol, jakožto obecně úloha buněk nespecifické imunity, spočívá v zajištění bariéry proti vzniku infekce. Antigeny zachycených patogenů a jiných cizorodých částic jsou Langerhansovými buňkami prezentovány na jejich cytoplasmatické membráně ve vazbě na MHC I. nebo II. třídy. Po kontaktu s antigenem Langerhansovy buňky stejně jako ostatní DC migrují do lymfatických uzlin náležící k dané části kůže, kde nastává imunitní reakce. Prostřednictvím prezentace antigenu T-lymfocytům dochází ke vzniku prozánětlivých cytokinů, chemokinů, zánětlivých linií T_{H1} a T_{H17} a dále T_C, stejně jako paměťových buněk, migrujících z lymfatických uzlin zpět do kůže. V kůži se dále přirozeně nacházejí T-lymfocyty, zejména populace CD8⁺, a rovněž velmi nízké procento B-lymfocytů. Díky přítomnosti kapilární sítě v dermis jsou zde lokalizovány také ostatní buňky imunitního

systému, tedy neutrofilní a eosinofilní granulocyty, makrofágy a mastocyty (Krejsek *et Kopecký*, 2004).

Zejména prozánětlivý IL-17 produkovaný T_{H17} společně s TNF- α následně stimuluje produkci keratinocytů z kmenových buněk (Chiricozzi *et al.*, 2011). Keratinocyty představují nejzastoupenější kožní buněčný typ, obsahující látky keratin a melanin, a jejich indukce vzrůstá rovněž v procesu hojení ran či jako reakce na poškození kůže UV zářením. Keratinocyty svou aktivací produkují prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-6, dále chemokiny, interferony a opět TNF- α . Konkrétně prostřednictvím tvorby IL-12 keratinocyty modulují diferenciaci linie T_{H1} , zatímco současně indukovaný IL-3 stimuluje krvetvorbu (Delves *et al.*, 2011).

Narušením rovnováhy mezi T_{H1} a T_{H2} a odklon k T_{H1} buněčné linii nastává iniciace rozvoje psoriázy nebo atopické dermatitidy. Ke vzniku této nerovnováhy přispívá jednak infiltrace patogenů, jednak aktivace koagulační kaskády po narušení kůže, přičemž oba tyto procesy způsobují lokální zánětlivou reakci. Degranulace mastocytů prostupujících endotelem cév navíc uvolňuje látky jako histamin či heparin, které umožňují lokální prosakování krevních složek do tkáně. Následně je spuštěna aktivace komplementu, což ještě potencuje rozvoj zánětu (Delves *et al.*, 2011).

Studie efektu vitamínu D na léčbu lupénky mají své kořeny již v roce 1985, kdy byl pozorován ústup lupénky u japonského pacienta léčeného 1,25(OH) $_2$ D $_3$ pro osteoporózu (Morimoto *et al.*, 1987). Stejně jako TGF- β a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ inhibují proliferaci buněk *in vitro* a *in vivo*, dochází ke stejnému efektu těchto dvou látek na normální lidské keratinocyty, přičemž jejich antiproliferační účinek je synergický. Současná přítomnost TGF- β v kultuře keratinocytů s 1,25(OH) $_2$ D $_3$ zvyšuje účinek vitamínu D minimálně 10 \times , přičemž dochází k nárůstu hladiny zejména TGF- β 1 a méně pak TGF- β 2 (Kim *et al.*, 1992). Analogy vitamínu D se využívají k léčbě psoriázy již několik desítek let a jejich srovnání bude uvedeno dále.

5.3 Imunopatologická onemocnění a hypersenzitivita

5.3.1 Bronchiální astma a alergické projevy

Bronchiální astma je široce rozšířeným chronickým onemocněním dýchací soustavy, způsobené zúžením dýchacích cest v oblasti průdušinek. Příčiny jeho vzniku nejsou zcela jasné, svou roli však hrají jak genetické faktory, tak faktory prostředí. Ve většině případů astma doprovází alergie, představující také spouštěče záchvatů. Mezi rizikové faktory rozvoje tohoto onemocnění dále patří tmavší pigmentace kůže, obezita, životní styl a rovněž koncentrace obyvatelstva ve velkých městech (Lange *et al.*, 2009). Rizikové pro rozvoj astmatu, stejně jako alergických onemocnění v dětském věku, jsou navíc některé virové infekce dýchacích cest u kojenců (Jackson *et al.*, 2008). V patogenezi obou těchto chorob hraje významnou roli zejména vysoká kapacita T_{H2} buněk v indukci tvorby IgE B-lymfocyty a následně cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13 (Cohn *et al.*, 2004). Z tohoto důvodu byl zkoumán možný vliv nedostatku vitamínu D na patogenezi astmatu i alergií (Lange *et al.*, 2009).

1,25(OH)₂D₃ svým pleiotropním působením ovlivňuje více než 400 genů, a to včetně genů podílejících se na vzniku a rozvoji astmatu, ve kterých byla objevena vazebná místa pro VDR-RXR. Konkrétně se jedná například o geny regulující konstrikci hladké svaloviny průdušinek, kde se VDR-RXR aktivně váže a silně tak ovlivňuje aktivitu svalových buněk (Bossé *et al.*, 2007). Řada epidemiologických studií pak potvrdila přímou korelaci mezi sníženou hladinou vitamínu D a závažností tohoto onemocnění, včetně množství hospitalizací a užívání standardní léčebných prostředků. Stejně tak je již dlouhá léta znám zvýšený předpoklad rozvoje infekce dýchacích cest u dětí s křivicí. Tento vztah mezi jasným vnějším projevem nedostatku vitamínu D a vyšší senzitivitou k infekci zapříčiňuje snížená schopnost produkce cathelicidinu makrofágy u dětí i dospělých, a to nejen v případě infekce *Mycobacterium tuberculosis*. Přesné mechanismy interakce 1,25(OH)₂D₃ s buňkami iniciující a udržující astmatická a alergická onemocnění, kromě již známých vztahů k buňkám a signálním molekulám imunitního systému, však zatím zůstávají nejasné (Lange *et al.*, 2009).

5.3.2 Rakovina

Spojitosť medzi imunitným systémom a rozvojom nádorového ochorenia spočíva vo ztráte imunitného pohľadu a supresi imunitnej reakcie, kedy imunitné bunky nie sú schopné rozpoznať a efektívne zlikvidovať proliferujúce klonové nádorové bunky či ich metabolity. Účinek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na supresi tvorby nádoru bol objavený už v roku 1981 na myeloidných leukemických bunkách (Abe *et al.*, 1981). V súčasnosti hovoríme celkom o troch protinádorových (antineoplastických) efektoch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zahŕňujúcich inhibíciu rastu a proliferácie nádorových buniek, indukciu bunčnej diferenciácie a rovněž stimuláciu apoptózy (Moreno *et al.*, 1995). Na základe experimentálnych štúdií s ľudskými bunčnými nádorovými líniami karcinomu prsu MCF-7 a BT-20 bola potvrdená $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indukovaná supresi proliferácie buniek prejavujúca sa inhibíciou rastu týchto dvoch bunčných línii v závislosti na dávke (Chouvet *et al.*, 1986). Stimulácia diferenciácie celej rady buniek prostredníctvom $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, v súvislosti s nádorovou aktivitou však zejména buniek leukemických, bola zistená na ľudskej bunčnej línii promyelocytárnych leukemických buniek HL-60. V tejto štúdii $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* zvyšoval diferenciáciu blastov získaných z krvi pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou a navyše pôsobil pozitívne na krvetvorbu pacientov s diagnostikovaným myelodysplastickým syndromom *in vivo*, ktorý lze považovať za preleukemický syndrom (Koeffler *et al.*, 1985). Po diferenciácii buniek línie HL-60 do monocytov indukované prostredníctvom $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pak za určitých podmienok následuje jejich normálna proliferácia (Wang *et al.*, 1996).

Léčba rakoviny tlustého čreva, prsu, prostaty a pľúc podávaním $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, respektive jeho analogov zabraňujúcich riziku hyperkalcémie, sa javí ako veľmi nadějná, nicméně molekulárny mechanizmus inhibície proliferácie, stimulácie diferenciácie buniek ani proapoptický efekt vyvolaný týmito látkami nie je v súčasnej dobe stále podrobne známy. Přesto však víme, že aktivita $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v závislosti na dávke spôsobuje zástavu bunčného cyklu v pozdnej G_1 fázi (Rigby *et al.*, 1985), tedy v klidovom úseku interfázy, kedy v bunke jednak probíhá kontrola genetické informácie a její případná reparace, jednak procesy transkripce a translace vedoucí k syntéze dalšího bunčného obsahu a zvětšování buňky samotné. Při absenci signálů k průchodu tímto kontrolním uzlem buňky přecházejí do fáze G_0 , typické pro zejména vysoce diferencované nedělicí se buňky. Buňky zablokované v této fázi nemohou dále pokračovat v přirozeném cyklu do následujících fází až k cílové mitóze, což brání jejich proliferaci, nicméně probíhá u nich intenzivní

metabolismus. V přítomnosti specifických signálů se pak vrací do pozdní G_1 fáze a pokračují dále v buněčném cyklu (Bartek *et al.*, 2001).

Regulaci buněčného cyklu zprostředkovávají regulační proteiny zvané cykliny. Jejich vazbou na enzymy cyklin dependentní kinasy (CDK) za současné přítomnosti CDK aktivujících kinas dochází k aktivaci daného CDK a následně fosforylaci proteinového (enzymatického) substrátu. To ve výsledku vede k aktivaci či naopak inhibici konkrétní enzymatické reakce.

Akumulace buněk v pozdní G_1 fázi je způsobena velmi rychlým poklesem cyklinů D_1 a E , jakožto klíčových molekul v progresi celé této kontrolní fáze a zároveň v iniciaci přechodu do následné S fáze buněčného cyklu, a to nejen v reakci na $1,25(OH)_2D_3$. Naopak vysoké hladiny těchto dvou cyklinů v buňce bývají charakteristické pro některá maligní nádorová onemocnění (Wang *et al.*, 1996). Obecně dochází k supresi důležitých cyklinů z důvodu aktivace inhibitorů CDK (CKI, *cyclin-dependent kinase inhibitor*), které působí jako negativní regulátory růstu buněk (Rots *et al.*, 1999). V tomto případě se konkrétně jedná o dva typy CKI, $p21^{Cip1/Waf1}$ a $p27^{Kip1}$ (Wang *et al.*, 1996). V rámci studia účinku $1,25(OH)_2D_3$ na linii monocytárních leukemických buněk U937 bylo zjištěno, že aktivace VDR po navázání ligandu přímo indukuje cílový gen pro tvorbu CKI $p21^{Cip1/Waf1}$, a to díky přítomnosti VDRE na promotoru tohoto cílovém genu (Liu *et al.*, 1996). K nástupu diferenciace buněk linie U937 tedy dochází v reakci na zvýšenou expresi těchto dvou inhibitorů v přítomnosti $1,25(OH)_2D_3$, což naznačuje přímou souvislost mezi zástavou buněčného cyklu a tedy proliferace nádorových buněk a iniciací diferenciace. V těchto experimentech byla totiž v reakci na $1,25(OH)_2D_3$ zaznamenána nejprve časná, krátkodobá proliferace buněk linie U937, následně inhibice růstu a nakonec nástup diferenciace. Úvodní proliferaci buněk provázelo snížení hladiny cyklinů E , D_1 a A , řídicího průchod S fází, stejně jako nárůst koncentrace $p21$ a $p27$. Inhibice růstu se pak vyznačovala již pouze zvýšenými hladinami $p21$ a $p27$, které následovně indukovaly diferenciace buněk linie U937 do monocytární či makrofágní linie, což bylo provázeno expresí typických povrchových CD molekul na těchto krevních buňkách. K popsanému efektu však nedochází v případě nádorových buněk, u kterých po inhibici proliferace nenásleduje fáze diferenciace, jako je tomu například u buněčné linie MCF-7, kde dochází pouze k navýšení CKI, nikoli k současnému snížení cyklinů E , D_1 a A (Rots *et al.*, 1999).

Nezávislá studie na buněčné linii karcinomu prsu BT-20 navíc zaregistrovala zvýšenou hladinu mRNA TGF- β 1 v přítomnosti 1,25(OH) $_2$ D $_3$ v závislosti na dávce, stejně jako jeho nadměrnou aktivitu. Proteinová rodina TGF- β obecně hraje významnou roli v buněčném cyklu jakožto negativní regulátor buněčného růstu a diferenciaci zdravých i nádorových buněk, a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Koli *et Jorma*, 1995). Nicméně TGF- β 1, stejně jako další členové této proteinové rodiny růstových faktorů TGF- β 2 a TGF- β 3, hrají v celkové inhibici buněčného růstu oproti nárůstu p21 a p27 v buněčné linii či oproti současnému poklesu cyklinu D $_1$ téměř zanedbatelnou roli. Aplikace specifických protilátek proti těmto třem typům TGF- β spolu s 1,25(OH) $_2$ D $_3$ do experimentální buněčné linie MCF-7 totiž snížila výsledný inhibiční efekt růstu pouze minimálně. Na druhou stranu přítomnost stejných protilátek rušila nejen účinek TGF- β , ale rovněž důležitou upregulaci exprese p21, která by mohla představovat důsledek zamezení aktivace signální kaskády odstartované přítomností TGF- β (Verlinden *et al.*, 1998).

Kromě antiproliferativních účinků 1,25(OH) $_2$ D $_3$ na buněčnou linii MCF-7 *in vitro* a *in vivo* byl zaznamenán jeho proapoptický efekt v případě těchto nádorových buněk, a to hned na několika stupních. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ totiž způsobuje významnou indukci proapoptických biochemických i morfologických markerů vyvolávajících charakteristické znaky apoptózy buněk, mezi které patří kondenzace chromatinu a cytoplasmy či pyknóza, neboli postupná degenerace buněčného jádra doprovázená rozpadem DNA. Zároveň 1,25(OH) $_2$ D $_3$ v buňkách lidského karcinomu prsu snižuje hladinu antiapoptického proteinu Bcl-2. Apoptickou reakci navíc podporuje poškození estrogenové signalizace způsobené masivním snížením exprese estrogenového receptoru (Simboli-Campbell *et al.*, 1997).

Vedle těchto účinků se rovněž objevují zprávy o 1,25(OH) $_2$ D $_3$ zprostředkovaném útlumu invazivity nádorových buněk a tvorby metastáz *in vitro* a *in vivo* u celé řady typů rakovin (Beer *et Myrthue*, 2004). Inhibice tvorby metastáz spočívá zejména v zabránění angiogenezi, tedy procesu vytváření kapilár zásobujících nádor krví, jakožto zdrojem kyslíku a živin. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ zde účinně zabraňuje proliferaci a prodlužování z nádoru odvozených endoteliálních buněk, které ložiskem doslova prorůstají a zajišťují tak jeho bohaté prokrvení (Mantell *et al.*, 2000).

V těchto studiích popsany protinádorový účinek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro* a *in vivo* se netýká pouze karcinomu prsu a leukemických buněk, ale rovněž již zmíněného karcinomu plic, prostaty, kolorektálního karcinomu (rakovina tlustého střeva), stejně jako nádorů hlavy a krku, mnohočetného myelomu, lymfomů (Trump *et al.*, 2004) a v rámci antiproliferativních účinků rovněž melanomu (Field *et Newton-Bishop*, 2011). K umocnění antineoplastického efektu a zabránění hyperkalcémie jsou využívány glukokortikoidy jako dexametazon (Trump *et al.*, 2004), chemoterapie, ligandy RXR, protinádorové léčivo tamoxifen, inhibitor P450 ketokonazol či radioterapie (Beer *et Myrthue*, 2004). Taktéž byla již v celé řadě experimentálních studií prokázána zvýšená prevalence vzniku rakoviny a zvýšené riziko úmrtnosti u osob, trpících nedostatkem vitamínu D, popřípadě výrazně lepší prognóza a nižší riziko relapsu v případě optimálních či vyšších hladin $25(\text{OH})\text{D}_3$. Svou roli do určité míry hrají také polymorfismy VDR, snižující riziko nedostatečných plasmatických koncentrací $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Buttiglierio *et al.*, 2011).

6 IMUNOMODULAČNÍ ÚČINKY ANALOGŮ VITAMÍNU D

Pro léčbu autoimunitních onemocnění se již dlouhá léta běžně používají kortikoidy, tedy syntetické analogy přírodních hormonů kůry nadledvinek, kortikosteroidů. Nicméně jinak extrémně účinná supresivní terapie kortikoidy s sebou nese řadu vážných zdravotních rizik, mezi která patří zejména atrofie (úbytek buněk daného orgánu a zmenšení jeho velikosti), rozšíření cév vedoucí ke vzniku erytémů či potlačení normální funkce hormonálního systému, konkrétně hypothalamo-hypofyzární-nadledvinové osy. To dále vede ke zvýšenému riziku vzniku obezity, diabetes mellitus II. typu, poškození kůže, žaludečních vředů, aterosklerózy, osteoporózy či dokonce ztrátě vlastní přirozené produkce kortikosteroidů nadledvinkami. Při lokální aplikaci kortikoidů ve formě mastí například při léčbě lupénky pak atrofie kůže způsobuje její ztenčení úbytkem jednotlivých vrstev či podkožního vaziva. Dlouhodobé podávání těchto látek navíc vede ke snížení účinků kortikoidů u daného pacienta (Kim, 2010). Právě z těchto důvodů byly hledány látky nové, jež by byly potenciálně schopny nahradit léčbu samotnými kortikoidy nebo alespoň zmírnit jejich vedlejší účinky. Mezi takovýto preparát patří i vitamín D, který s sebou však také nese určitá omezení.

6.1 Vitamín D a hyperkalcémie

K hyperkalcémii, vzniklé vlivem působení $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na hladiny uvolňovaného PTH, dochází z důvodu přítomnosti VDR v cytoplasmě buněk příštítných tělísek, které představují důležité cíle působení vitamínu D a které se vyznačují svou vysokou afinitou k ligandu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Kumar *et* Thompson, 2011). Biosyntéza PTH v hlavních buňkách příštítných tělísek zahrnuje ribozomální tvorbu translačního produktu pre-pro-PTH, ze kterého následnými posttranslačními úpravami v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu vzniká samotný PTH (Morrissey *et* Cohn, 1979). Tento hormon je poté skladován uvnitř cytoplasmatických granulí hlavních buněk příštítných tělísek, odkud se uvolňuje do krve na základě několika různých podnětů. Konkrétně při stavech hypokalcémie dochází k sekreci PTH z granulí do krevního oběhu v reakci na vazbu Ca^{2+} na kalciový receptor (CaSR, *calcium sensing receptor*) (Kumar *et* Thompson, 2011), který je vysoce

citlivý na odchylky v koncentraci plasmatického Ca^{2+} oproti normálu (Brennan *et al.*, 2012). Tato reakce zároveň zpomaluje přirozenou proteolytickou degradaci PTH uvnitř příštítných tělísek a zvyšuje tak jeho množství pro sekreci (Morrissey *et Cohn*, 1979). Pokles hladiny Ca^{2+} navíc vyvolává vazbou ligandu na CaSR proliferaci buněk příštítných tělísek (Brennan *et al.*, 2012) a dále indukcí samotné syntézy pre-pro-PTH pro opětovné vyrovnání plasmatických koncentrací Ca^{2+} nárůstem hladiny mRNA PTH, na čemž se také podílí fosfáty (Naveh-Many *et al.*, 1989).

Aktivace VDR příštítných tělísek navázáním $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na rozdíl od Ca^{2+} signalizace vyvolává snížení hladiny pre-pro-mRNA pro tvorbu PTH *in vitro*, a to až o 50 % oproti normálnímu stavu. Tento jev nastává v důsledku přímé inhibice transkripce genu pro pre-pro-PTH při plasmatických koncentracích $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vyšších než jsou jeho fyziologické hladiny (Kawahara *et al.*, 2010), což bylo také prokázáno v experimentech *in vivo* (Silver *et al.*, 1986). Až donedávna se předpokládalo, že represi transkripce genu pro pre-pro-PTH v buňkách příštítných tělísek způsobuje vazba heterodimeru VDR-RXR na VDRE promotorové oblasti tohoto genu, jako je tomu u jiných buněk. Buňky příštítných tělísek v rámci promotoru genu pro pre-pro-PTH obsahují motiv DR-3-like, nicméně delece tohoto motivu nezpůsobuje významný pokles účinku $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Bienaimé *et al.*, 2011). Promotor genu pro pre-pro-PTH totiž obsahuje konzervativní sekvenci zvanou E-box (*enhancer box*) zodpovědný za vazbu transkripčních faktorů umožňujících represi transkripce působením $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Heterodimer VDR-RXR se na DNA tohoto E-boxu neváže přímo, nýbrž přes protein VDIR (*VDR interacting repressor*). Jak je znázorněno na Obr. 3, přímá vazba VDIR na sekvenci E-boxu promotoru tohoto genu následně vyvolává rekrutaci represorů, zejména histonové deacetylasy 2 (HDAC-2, *histone deacetylase 2*) a proteinu p300 (Murayama *et al.*, 2004).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dále nepřímo ovlivňuje množství uvolňovaného PTH příštítnými tělísky prostřednictvím stimulačního vlivu na expresi CaSR. Tento receptor se kromě příštítných tělísek nachází v řadě jiných tkání, zejména v C-buňkách štítné žlázy a buňkách ledvinových tubulů, kde jeho exprese po podání $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rovněž narůstá. Stimulační vliv zvýšených plasmatických hladin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na expresi CaSR je dán přítomností VDRE v transkripčních počátcích dvou promotorů genu pro CaSR, P1 a P2. Vazbou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ do VDR buněk, obsahujících ve své cytoplasmatické membráně současně CaSR, tak dochází k posílení exprese CaSR (Canaff *et Hendy*, 2002).

Vzhledem k tomu, že zvýšenou hladinu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ doprovází současný růst množství Ca^{2+} v krevní plasmě, způsobuje nadbytek těchto iontů inhibici syntézy a sekrece PTH příštítnými tělisky potlačením transkripce genu pro tvorbu pre-pro-PTH a zároveň stimulaci degradace již vytvořené mRNA. Na základě posledních studií k tomuto efektu dochází dvěma mechanismy (Kawahara *et al.*, 2010). V prvním z nich zvýšená extracelulární koncentrace Ca^{2+} zapříčiňuje navýšení množství redoxního proteinového faktoru 1 (REF-1, *redox factor protein 1*), vyznačujícího se schopností specifické vazby na negativní Ca^{2+} responzivní elementy (nCaREs, *negative Ca^{2+} responsive elements*) lidského genu pro PTH, což následně vede k represi transkripce tohoto genu (Okazaki *et al.*, 1994). Nárůst kalcémie vedle toho destabilizuje mRNA PTH, a to prostřednictvím vazby proteinu na specifické místo 3' nepřekládané oblasti (3'-UTR) mRNA PTH, klíčové pro stabilitu této genetické informace (Kilav *et al.*, 2004). Výsledný efekt nadměrných hladin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tedy ve výsledku představuje inhibici produkce PTH, který by za normálních okolností vyrovnal hladinu Ca^{2+} v krevní plasmě, přičemž takto vyvolaná hyperkalcémie ještě více utlumuje expresi tohoto hormonu a blokuje tak jeho stabilizační efekt (Kawahara *et al.*, 2010).

K narušení činnosti příštítných tělísek zejména změnou v expresi PTH dochází v důsledku řady patologických stavů, a to včetně autoimunitních onemocnění, či v přítomnosti nadměrného množství prozánětlivých cytokinů (Kawahara *et al.*, 2010). Zajímavá je rovněž zjištěná exprese CaSR v buňkách imunitního systému, zahrnující monocyty, ale zejména T-lymfocyty, které se prostřednictvím produkce cytokinů podílejí na imunoregulaci a vzniku i rozvoji zánětu. Ligandem zprostředkovaná aktivace CaSR na povrchu T-lymfocytů pak pravděpodobně stimuluje sekreci IL-6 a TNF- β , které významně podporují zánětlivé procesy (Li *et al.*, 2013).

6.2 Charakteristika analogů vitamínu D

Vývoj syntetických analogů vitamínu D byl zahájen z důvodu vysokého rizika vzniku hyperkalcémie při nadměrné hladině $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, způsobující kalcifikaci cév a měkkých tkání. K jejich rozvoji přispěl zejména objev krystalické struktury VDR s navázaným

přírodním ligandem v roce 2000, který vedl k bližšímu pochopení vazebných interakcí analogů vitamínu D s receptorem (Rochel *et al.*, 2000) a umožnil tak zvýšení účinnosti, tkáňové specifity a celkové selektivity nově vytvářených syntetických analogů (Adorini *et al.*, 2004). V současné době existuje celá řada analogů vitamínu D využívaných v klinické praxi, ať už v monoterapii, nebo častěji jako součást kombinované léčby. Účinnost analogů, využívaných v současné terapii mimo již dlouho známé aplikace vitamínu D zejména v léčbě lupénky, vykazuje srovnatelnost se střední potencí lokálních kortikosteroidů (Kim, 2010). Tato práce je zaměřena na analogy alfacalcidol, calcipotriol (calcipotriene), tacalcitol, inecalcitol a maxacalcitol. Zdaleka ne všechny informace o jejich působení na buňky imunitního systému, farmakokinetice, odlišnostech oproti $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a mechanismu snižování rizika vzniku hyperkalcémie jsou však známy a publikovány. Dostupné a v této kapitole uvedené informace jsou shrnuty v Příloze 1.

6.2.1 Variabilita mezi jednotlivými analogy

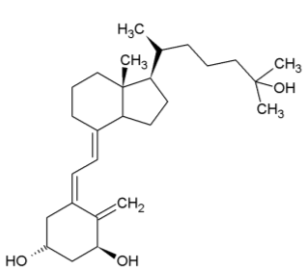
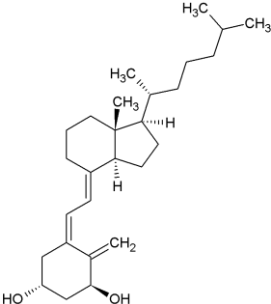
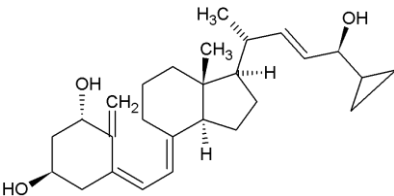
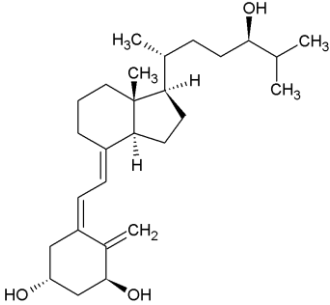
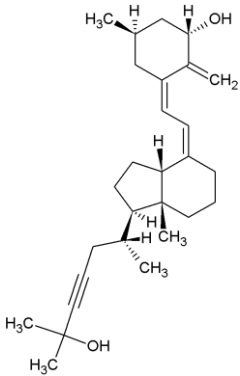
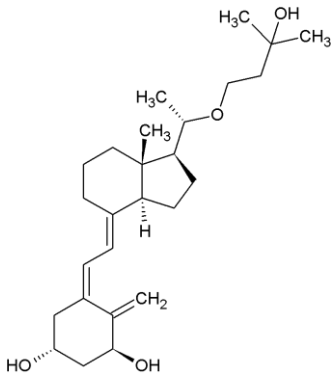
Analogy vitamínu D se vyznačují nejen výrazně nižší tendencí způsobovat hyperkalcémii než $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ samotný, ale také svým větším terapeutickým záběrem (Mathieu *et Adorini*, 2002). Významný regulační vliv analogů vitamínu D se uplatňuje zejména prostřednictvím receptorů imunitních buněk, cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a neurohormonů (Griffin *et al.*, 2004). Vyšší potenciál analogů vitamínu D a jejich tkáňová specifita spočívá zejména v odlišné afinitě analogů k DBP, která je často extrémně nízká, a interakci s lipoproteiny v krevním séru oproti $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, dále v pozměněném buněčném vychytávání dané látky a její akumulace v buňce. Rozdílná bývá taktéž aktivace jaderných VDR zprostředkovávající iniciaci rozdílných signálních drah či vazba na cytoplasmatické VDR vedoucí k odlišné heterodimerizaci VDR-RXR a následné vazbě na DNA, včetně specifické tvorby preiniciačního komplexu. Rovněž katabolická inaktivace daného analogu se liší od $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Ačkoli se ve všech případech jedná se o ligandy VDR, liší se jednotlivé analogy vitamínu D afinitou k tomuto receptoru, stejně jako svou afinitou k DBP, dimerizací s RXR a tím pak také selektivitou a afinitou k VDRE (Steddon *et al.*, 2001). Vzhledem k tomu, že samotná aktivace VDR po navázání ligandu představuje značně složitý proces, způsobuje rozdílná rekrutace různých koaktivátorů a korepresorů prostřednictvím odlišných analogů

aktivaci jiných genových expresních profilů vedoucích ke specifickým terapeutickým účinkům na různé tkáně, protože i samotná distribuce koaktivátorů je tkáňově specifická (Takeyama *et al.*, 1999). I díky tomuto efektu se mezi sebou 1,25(OH)₂D₃ a jeho analogy liší zejména mechanismu působením na hladinu PTH, Ca²⁺ či fosfátu, a tím potom na stupeň kalcifikace cév (Steddon *et al.*, 2001). Přehled chemických vzorců zde srovnávaných analogů v porovnání s 1,25(OH)₂D₃ poskytuje Tab. 3.

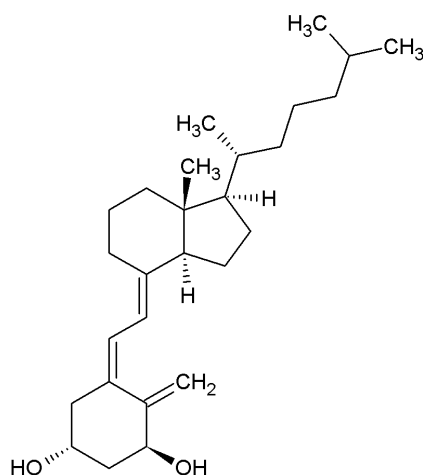
Většina synteticky vytvořených analogů vitamínu D zahrnuje superagonisty VDR s více než 10× vyšším antiproliferativním účinkem (Bouillon *et al.*, 2005) na leukemické buňky, buňky karcinomu prsu, fibroblasty a keratinocyty (Slatopolsky *et al.*, 2002), a pouze menší část analogů je vůči VDR antagonistická nebo parciálně antagonistická. Společným rysem bývá také nízká afinita k DBP, takže hladina analogů velmi rychle naroste do maximální plasmatické koncentrace v porovnání s 1,25(OH)₂D₃ (Bouillon *et al.*, 2005).

Tab. 3. Chemická struktura 1,25(OH)₂D₃ a jeho analogů.

	Aktivní forma vitamínu D		Analogy vitamínu D	
Název	Kalcitriol	Alfacalcidol	Calcipotriol (calcipotriene)	
Stechiometrický vzorec	1 α ,25(OH) ₂ D ₃	1 α (OH)D ₃	1,24(OH) ₂ -22-ene-24-cyclopropyl-D ₃	
Strukturní vzorec				
Analogy vitamínu D				
Název	Tacalcitol	Inecalcitol	Maxacalcitol	
Stechiometrický vzorec	1,24(OH) ₂ D ₃	19-nor-14-epi-23-yne-1,25(OH) ₂ D ₃	22-oxa-1,25(OH) ₂ D ₃	
Strukturní vzorec				

6.3 Alfalcidol

Alfalcidol neboli $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, jehož strukturní vzorec je zaznamenán na Obr. 10, byl poprvé syntetizován z cholesterolu v roce 1973 jako analog vitamínu D využitelný pro zvýšené vstřebávání Ca^{2+} u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Teprve později došlo k objevení jeho inhibičního efektu na produkci PTH (Hansen, 2012). Původně levný analog nenáročný na chemickou syntézu se tak brzy stal lékem první volby pro léčbu osteoporózy v Japonsku. Nicméně u obyvatel jiných, západnějších zemí je obecně hladina Ca^{2+} vyšší, proto zde terapeutické dávky alfalcidolu vyvolávají spíše hyperkalcémii než terapeutickou tvorbu kostí (Kubodera, 2009). Mechanismy ovlivnění imunitního systému alfalcidolem zatím nebyly publikovány.



Obr. 10. Strukturní vzorec alfalcidolu. Od aktivního metabolitu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se alfalcidol odlišuje pouze absencí hydroxylové funkční skupiny v poloze 25. Hydroxylace v této pozici nastává až v organismu pacienta, a to zejména v játrech.

6.3.1 Odlišnost oproti $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Na rozdíl od alfalcidolu se vitamín D přijímaný v potravě přirozeně ukládá v tukové tkáni ve formě $25(\text{OH})\text{D}_3$ a jeho přeměna na aktivní formu v játrech nastává teprve při poklesu hladiny tohoto hormonu v krevním séru nebo u pacientů s nedostatečnou hladinou vitamínu D. U ostatních jedinců bez deficiencí vitamínu D, popřípadě u pacientů s narušenou funkcí ledvin, se tedy podání $25(\text{OH})\text{D}_3$ mívá okamžitým účinkem. Naproti tomu z alfalcidolu se aktivní forma vitamínu D $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vytváří nejen v játrech, ale

částečně také v osteoblastech kostí druhou hydroxylací v poloze 25, a to bez ohledu na aktuální sérovou hladinu 25(OH)D₃ (Ringe *et Schacht*, 2007).

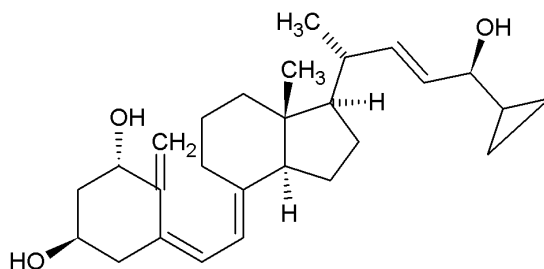
6.3.2 Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie

Alfacalcidol se svými farmakokinetickými parametry v krevní plasmě po orálním i intravenózním podání od 1,25(OH)₂D₃ poměrně významně odlišuje, a to zejména svým více než 3× delším biologickým poločasem (T_{1/2}, *half-life*) při perorálním podání a více než 2× delším T_{1/2} při intravenózní aplikaci, dále výrazně nižší maximální koncentrací léčiva v krvi (C_{max}, *maximum concentration*) a plochou pod křivkou (AUC, *area under the curve*) (Kawase, 2000).

Dávka alfacalcidolu potřebná k supresi syntézy a uvolňování PTH příštítnými tělísky a k současné inhibici kostní resorpce Ca²⁺ se pohybuje mezi 0,75 – 1 µg denně. Nepříznivé vedlejší účinky suplementace alfacalcidolem nastávají při dávce vyšší než je 1,5 µg, nicméně právě toto množství představuje minimální hodnotu nutnou pro zahájení kostní resorpce (Kubodera, 2009). Podání alfacalcidolu navíc na rozdíl od novějších analogů vitamínu D vede ke zvýšenému vstřebávání Ca²⁺ a fosfátu v tenkém střevě (Brancaccio *et al.*, 2007).

6.4 Calcipotriol (calcipotriene)

Calcipotriol (1,24(OH)₂-22-ene-24-cyclopropyl-D₃) představuje další syntetický analog vitamínu D, který byl poprvé schválen roku 1990 v Evropě jako lék ve formě masti pro léčbu psoriázy (Kim, 2010). Jak lze vidět na Obr. 11, obsahuje tento analog dvojnou vazbu mezi C22 a C23, hydroxylovou funkční skupinu v 34. pozici a C24, C25 a C26 začleněné do cyklopropanu (Masuda *et al.*, 1993).



Obr. 11. Strukturní vzorec calcipotriolu. Calcipotriol se od aktivního metabolitu 1,25(OH)₂D₃ liší přítomností dvojně vazby mezi C22 a C23, hydroxylové funkční skupiny na C34 a začleněním uhlíků C24, C25 a C26 do struktury cyklopropanu.

6.4.1 Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie

Při lokální aplikaci na kůži dochází k metabolizaci calcipotriolu z velké části dříve, než dojde k jeho transdermální absorpci a případné absorbované množství pak podléhá metabolizaci játry (Veien *et al.*, 1997). V kůži se calcipotriol rozkládá činností keratinocytů na metabolity, které jsou méně aktivní než on sám, což je pravděpodobně důvod, proč calcipotriol vyvolává hyperkalcémii jen velmi vzácně. Ještě před aktivací cílových genů vazbou na VDR aktivuje calcipotriol katabolické enzymy, které jsou zčásti společné s 1,25(OH)₂D₃ (Masuda, 1994). Afinita calcipotriolu k VDR je srovnatelná s 1,25(OH)₂D₃, stejně jako i míra účinku obou látek na diferenciaci buněk (Masuda *et al.*, 1993). Calcipotriol má však oproti 1,25(OH)₂D₃ méně než 1% vliv na regulaci Ca²⁺ (Singh *et al.*, 2011).

Mezi nežádoucí účinky calcipotriolu patří vznik kožní vyrážky po aplikaci zejména na obličej a intertriginózní oblasti, tedy místa, kde dochází k výraznému tření kůže, a to přibližně u 20 % pacientů. Léčba calcipotriolem v těchto oblastech se proto nedoporučuje (Veien *et al.*, 1997).

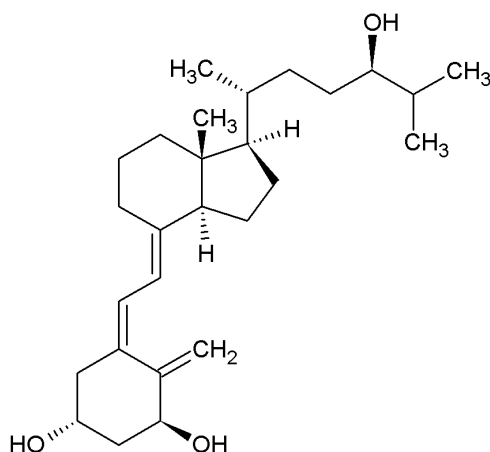
6.4.2 Imunomodulační účinky

Imunomodulační účinky calcipotriolu spočívají ve specifické inhibici proliferace keratinocytů, regulaci diferenciaci keratinocytů a supresi produkce zánětlivých cytokinů *in vivo* (McCormack, 2011). Konkrétně exprese cytokinů IL-6 a IL-8 IL-6 a IL-8 je zde

snížována prostřednictvím suprese aktivity TNF- α produkovaného fibroblasty (Rostkowska-Nadolska *et al.*, 2010). Calcipotriol představuje lék první volby při terapii lupénky, ačkoli je na trhu již přes dvacet let. Dlouhá léta byl vyráběn ve formě 0,005% masti, v současné době se však volí spíše kombinovaná léčba s betametasonem dipropionátem dostupná ve formě krému, podávaná jednou denně (Ortonne *et al.*, 2004).

6.5 Tacalcitol

Tacalcitol (1,24-(OH) $_2$ D $_3$) se od 1,25(OH) $_2$ D $_3$ chemicky liší pouze hydroxylací v poloze 24 namísto 25 (viz Obr. 12). Spolu s calcipotriolem je předepisován jako lék první volby při léčbě lupénky (Nagpal *et al.*, 2001).



Obr. 12. Strukturní vzorec tacalcitolu. Chemická struktura tacalcitolu téměř zcela odpovídá 1,25(OH) $_2$ D $_3$, odlišná je pouze poloha hydroxylové skupiny, která se v tomto případě nachází na C24.

6.5.1 Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie

Tacalcitol vykazuje oproti 1,25(OH) $_2$ D $_3$ až 10 \times nižší aktivitu. Afinita tohoto analogu k VDR je však silná (Yamanaka *et al.*, 2010), a to stejně velká nebo dokonce vyšší než je tomu v případě 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *In vitro* sice dochází k vazbě tacalcitolu na plasmatické bílkoviny, nicméně tento analog má velmi krátký plasmatický biologický poločas (Wietrzyk *et al.*, 2004). Indukce kalcémie je zde rovněž výrazně slabší, stejně jako toxicita

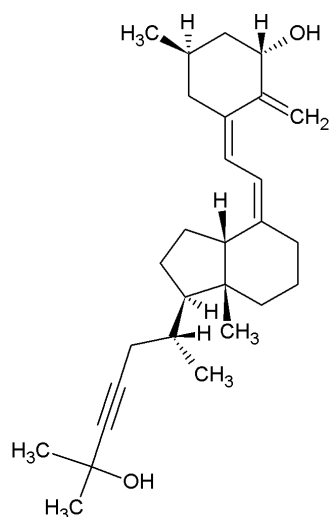
ve srovnání s $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kdy polovina letální dávky (LD_{50} , *lethal dose 50 %*) tacalcitolu dosahuje více než $8\times$ vyšších hodnot při perorálním podání a $3\times$ vyšších v případě intravenózní aplikace (Wietrzyk *et al.*, 2004). Nežádoucí účinky zahrnují mírné podráždění kůže po aplikaci, vyskytující se u 4,8 % pacientů (Bruner *et al.*, 2003).

6.5.2 Imunomodulační účinky

Zkoumání tacalcitolu spočívá zejména ve sledování jeho schopnosti inhibovat nadměrnou proliferaci a zrání keratinocytů a naopak indukovat jejich diferenciaci (Yamanaka *et al.*, 2010). Navíc byla potvrzena schopnost tacalcitolu tlumit produkci IL-6 a IL-8 prostřednictvím suprese aktivity TNF- α produkovaného fibroblasty (Rostkowska-Nadolska *et al.*, 2010) a IL-1 produkovaného mononukleárními krevními buňkami, stejně jako sekreci IL-3 prostřednictvím snížení produkce IL-1 endoteliárními buňkami *in vitro* (Leone *et Pacifico*, 2005).

6.6 Inecalcitol

Inecalcitol (19-nor-14-epi-23-yne- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) se chemicky od $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liší zejména odstraněním methylové skupiny na C19, což zvyšuje stabilitu tohoto analogu. Další rozdíl spočívá v typu epimeru vodíku na C14, který se v inecalcitolu nachází v konformaci cis namísto trans. Tato konformační změna sice na jednu stranu způsobuje nižší afinitu tohoto analogu k VDR i DBP, nicméně na druhou stranu stojí za jeho nižší tendencí navyšovat kalcémii. Menší afinita k VDR je sice vyvážena druhou modifikací zahrnující trojnou vazbu na C23 v postranním řetězci, avšak na úkor opěvné deprese schopnosti vazby inecalcitolu k DBP (Verlinden *et al.*, 2000). Pro srovnání struktury s ostatními analogy je strukturní vzorec zachycen na Obr. 13. Tento analog se v současnosti využívá v kombinované chemoterapii (Verlinden *et al.*, 2000).



Obr. 13. Strukturní vzorec inecalcitolu. Inecalcitol vzniká odebráním methylové skupiny z C19 1,25(OH)₂D₃, záměnou konformace trans epimeru vodíku umístěného na C14 za konformaci cis a dále umístěním trojné vazby na C23 postranního řetězce.

6.6.1 Odlišnost oproti 1,25(OH)₂D₃

První chemická syntéza inecalcitolu proběhla za účelem získat lék s protinádorovým efektem fungujícím na různých typech tumorů a se současným minimálním kalcemickým účinkem, který by byl zároveň i superagonistickým ligandem VDR (Ma *et al.*, 2013). Tento analog vitamínu D se vyznačuje 10× silnějšími antiproliferačními účinky *in vitro* v porovnání s 1,25(OH)₂D₃, což bylo prokázáno v experimentální studii inhibice růstu nádorové buněčné linie MCF-7 (Verlinden *et al.*, 2000), stejně jako ve studii proliferace normálních buněk, konkrétně keratinocytů (Verlinden *et al.*, 2001). Obecně je však kapacita inhibice proliferace a stimulace diferenciací buněk inecalcitolem až 17× vyšší (Verlinden *et al.*, 2000). Suprese růstu nádorových buněk v závislosti na dávce byla dále zkoumána na buněčné linii spinocelulárního karcinomu neboli karcinomu dlaždicového epitelu (SCC, *squamous cell carcinoma*), ve kterém hodnoty 50% inhibiční koncentrace (IC₅₀, *inhibitory concentration 50*) inecalcitolu testovaného na SCC dosahovaly 30× nižších hodnot než hodnoty IC₅₀ 1,25(OH)₂D₃ na téže buněčné linii. Vedle buněčné proliferace ovlivňuje inecalcitol *in vivo* také buněčný cyklus, a to akumulací buněk v G₁ fázi, nicméně v intenzitě stejné, jako je tomu v případě indukce intenzivní apoptózy dané buňky prostřednictvím 1,25(OH)₂D₃. Mezi další výrazné původce protinádorové aktivity inecalcitolu řadíme jeho vyšší proapoptický efekt ve srovnání

s aktivním metabolitem vitamínu D, který se zdá být specifický vůči danému tumoru a buněčnému typu (Ma *et al.*, 2013).

Inecalcitol představuje superagonistu VDR. Stále zde platí, že v selektivní aktivaci jednotlivých genů inecalcitolem a jeho následném působení na cílovou buňku, které obecně vede ke konečnému biologickému účinku, mají rozhodující vliv koaktivátory a transkripční faktory. Nicméně inecalcitol v porovnání s 1,25(OH)₂D₃ vykazuje silnější tendenci vazby komplexu VDR-RXR na VDRE a tedy vyšší schopnost transaktivace cílových genů *in vitro* (Verlinden *et al.*, 2001). V případě inecalcitolu dále dochází k pevnější vazbě koaktivátorů na LBP receptoru VDR a jejich silnější interakci s touto doménou, což vede k mohutnější a efektivnější iniciaci transkripce cílových genů. Přesný původ a vysvětlení superagonistických vlastností inecalcitolu však nejsou stále známy (Eelen *et al.*, 2005). *In vitro* zde také dochází k navýšení transkripce mRNA VDR a tedy k nárůstu tohoto kódovaného proteinu (Verlinden *et al.*, 2000). Inecalcitol navíc disponuje chemickou strukturou odolnější vůči degradaci 24-hydroxylasou, a to díky přítomnosti trojné vazby mezi C23 a C24 v molekule, která nemůže být hydroxylována (Uskokovic *et al.*, 2001). Všechny tyto výhodnější funkční mechanismy inecalcitolu zvyšují aktivitu tohoto analogu *in vitro* porovnání s 1,25(OH)₂D₃ (Ma *et al.*, 2013).

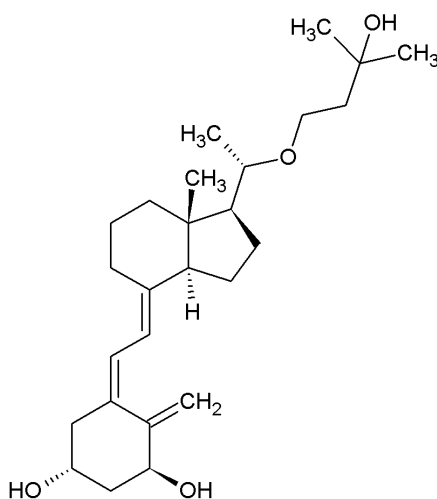
6.6.3 Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie

Maximální tolerovaná dávka (MTD, *maximum tolerated dose*) inecalcitolu *in vivo* při intraperitoneálním podání u myši činí 1,300 µg/1 kg tělesné hmotnosti bez rizika navýšení hladiny Ca²⁺ v krevní plasmě či dokonce vzniku hyperkalcémie, a to při podání až 3× týdně. MTD inecalcitolu je tedy až 480× vyšší než v případě 1,25(OH)₂D₃, nicméně příčina a mechanismus vzniku tohoto efektu nejsou stále zcela známy. Při tomto dávkování dochází k dosažení C_{max} 5 min po aplikaci inecalcitolu, přičemž návrat do původní hladiny nastává do 60 min. T_{1/2} v případě tohoto analogu tedy činí 18,3 min a clearance 53,3 ml/hod (Okamoto *et al.*, 2012), zatímco v případě 1,25(OH)₂D₃ T_{1/2} dosahuje až 4,4 hod a clearance 192 ml/hod (Muindi *et al.*, 2004). Právě díky kratšímu T_{1/2} inecalcitolu je časový limit pro vstřebávání Ca²⁺ z tenkého střeva značně omezen, což může být jedna z příčin nižšího nárůstu kalcémie. Vrchol exprese mRNA CYP24A1 v jaterních buňkách byl zaznamenán po 4 hod od podání inecalcitolu (Okamoto *et al.*, 2012). Inecalcitol se tedy

vyznačuje zejména velmi nízkým rizikem vzniku hyperkalcémie, a to 50 – 400× nižším než je tomu v případě 1,25(OH)₂D₃. Taktéž nebyla pozorována změna hmotnosti pokusných objektů (Verlinden *et al.*, 2000). V rámci I. fáze klinických testů inecalciferol při jednorázovém perorálním podání 320 μg nevyvolával u zdravých jedinců hyperkalcémii ani toxicitu, nicméně dobře snášena je i dávka 4 mg denně při perorálním podání (Ma *et al.*, 2013).

6.7 Maxacalcitol

Maxacalcitol (1,25-(OH)₂-22-(O)D₃), známý také pod názvem 22-oxacalcitriol (OCT), představuje syntetický analog vitamínu D s atomem kyslíku připojeným na 22. pozici v postranním řetězci (Kobayashi *et al.*, 1994). Strukturu maxacalcitolu zachycuje Obr. 14.



Obr. 14. Strukturní vzorec maxacalcitol. Struktura tohoto analogu 1,25(OH)₂D₃ se vyznačuje přítomností atomu kyslíku na C22, jinak je molekula totožná s aktivním metabolitem vitamínu D.

6.7.1 Odlišnost oproti 1,25(OH)₂D₃

Jedná se o selektivní VDR ligand, jehož afinita k VDR je 8× vyšší než je tomu v případě 1,25(OH)₂D₃ (Brown *et Slatopolsky*, 1999). Ve srovnání s 1,25(OH)₂D₃ rovněž 10× silněji indukuje diferenciaci a zároveň se vyznačuje svými výraznějšími antiproliferativními

a imunomodulačními účinky (Brown *et al.*, 1989). Významnou vlastností je také schopnost maxacalcitolu vyvolávat kalcémii v mnohem menší míře ve srovnání s jinými analogy vitamínu D, a to prostřednictvím přímé selektivní downregulace exprese PTH v příštítných těliscích *in vitro* a *in vivo* (Hirata *et al.*, 2002) v kombinaci se sníženou tendencí navyšovat plasmatické koncentrace Ca^{2+} jeho mobilizací ze starších částí kostí *in vitro* (Brown *et al.*, 1989). Maxacalcitol byl sice v experimentech *in vivo* méně aktivní než $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ při snižování exprese PTH, nicméně terapeuticky významnější je jeho výrazně menší kalcemická aktivita (Brown *et Slatopolsky*, 1999). Vstřebávání Ca^{2+} ve střevě po orálním podání maxacalcitolu dosahuje 3× nižších hodnot než při stejné dávce $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a vrací se do normálu již po 16 h, zatímco v případě $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ trvá návrat k původním hodnotám vstřebávání 48 h. Expres mRNA calbindinu se zvyšuje ve stejné míře po podání maxacalcitolu i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ale opět se navrácí k původním hodnotám rychleji v případě maxacalcitolu (Brown *et al.*, 1993). Vedle toho maxacalcitol působí *in vivo* redukcí tělesné hmotnosti (Hirata *et al.*, 2002).

6.7.2 Farmakokinetika a riziko hyperkalcémie

Maxacalcitol a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se výrazně odlišují svými farmakokinetickými parametry, které jsou pravděpodobně zodpovědné za nízkou tendenci maxacalcitolu vyvolávat hyperkalcémii. Díky své asi 500× nižší afinitě k DBP (Brown *et Slatopolsky*, 1999) se maxacalcitol v krvi nachází ve větším množství volně, pouze v nespecifické vazbě na lipoproteiny, což umožňuje jeho rychlejší clearenci a pravděpodobně také rychlejší nástup účinku i eliminaci a vyloučení žlučí ještě před vznikem vedlejších účinků (Kobayashi *et al.*, 1994), stejně jako vyšší tkáňovou dostupnost (Holliday *et al.*, 2000). Maxacalcitol dosahuje maximální plasmatické koncentrace pomaleji, je-li podáván intraperitoneálně. Jeho maximální hladina ve střevě a příštítných těliscích je sice vyšší než v případě $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, nicméně po vymizení této látky z oběhu hladiny ihned klesají na původní mez. Zvýšená absorpce Ca^{2+} ve střevě a jeho mobilizace z kostí je tedy pouze přechodná, zatímco efekt na supresi PTH trvá (Brown *et Slatopolsky*, 1999).

7 ZÁVĚR

Klasické účinky vitamínu D, známého také pod pojmem antirachitický vitamín, zahrnující jeho zásadní vliv na kalciový a fosfátový metabolismus, jsou známy již velmi dlouhou dobu. Teprve po objevení interakce mezi vitamínem D a imunitním systémem v polovině 19. století začala být pozornost postupně zaměřována také na jeho další možné nekalcemické účinky. V posledních desetiletích pak identifikace VDR v téměř všech tkáních vyústila v narůstající snahu o nalezení jakékoli možné alternativní léčby řady onemocnění, zahrnujících nejen dosavadní rachitis a osteomalacii, ale rovněž mnoho dalších chorobných stavů, zejména rakoviny a autoimunitních onemocnění. Vzhledem ke značným hyperkalcemickým a hyperfosfatemickým účinkům vitamínu D, představujícím závažnou komplikaci jinak efektivní léčby, došlo k zahájení úsilí o syntézu vhodného analogu vitamínu D, který by nejenže potlačoval nárůst hladiny Ca^{2+} a fosfátů v krvi, ale také vykazoval další přednosti a výhody oproti samotnému vitamínu D. Přibližně během posledních čtyřiceti let bylo vyvíjeno obrovské množství analogů s různými vlastnostmi a efektivitou při léčbě mnohých onemocnění. Jejich odlišnost spočívá zejména v intracelulárním metabolismu, farmakokinetice, rozdílné interakci s VDR a genomických i nengenomických účincích. Z toho pak vyplývá jejich tkáňová specifita.

V rámci této práce bylo porovnáváno celkem pět analogů vitamínu D s $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, tedy aktivním metabolitem, který v lidském těle umožňuje chod procesů vyvolaných vitamínem D na úrovni buněk. Toto srovnání lze pojmut z několika hledisek, a to z hlediska efektivity využití analogů při léčbě konkrétních onemocnění pomocí znalostí získaných z klinických studií či publikovaných pozorování. Mezi další úhly pohledu srovnání můžeme zařadit hodnocení odlišností těchto pěti analogů mezi sebou. Pozornost je přitom věnována jak nárůstu hladiny PTH po podání léčiva, tak nežádoucím účinkům, mezi kterými dominuje zejména kožní vyrážka, podráždění, zarudnutí kůže, pálení či svědění. Vzhledem k cílům této práce se hodnocení týká zejména srovnání vybraných analogů mezi sebou, které je z hlediska jednotlivých vlastností přehledně zaznamenáno v Příloze 1. V rámci klinických studií nejsou příliš jasné rozdíly mezi calcipotriolem a tacalcitolem, analogů vitamínu D, které se zdají být nejvýhodnější. Na druhou stranu velice rozsáhlé teoretické znalosti farmakologického působení maxacalcitolu a jím dlouho využívaná léčba

v Japonsku jasně přináší výborné výsledky, které však postrádají klinické srovnávací studie.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxyvitamín D ₃ (kalcitriol)
25(OH)D ₃	25-hydroxyvitamín D ₃ (kalcidiol)
AF	<i>activation function</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	antigen prezentující buňka (<i>antigen-presenting cell</i>)
ARD	ankyrinová repetiční doména (<i>ankyrin repeat domain</i>)
ATPasa	adenosin trifosfatasa (<i>adenosin triphosphatase</i>)
AUC	plocha pod křivkou (<i>area under the curve</i>)
BCR	B-buněčný receptor (<i>B-cell receptor</i>)
CaBP	Ca ²⁺ vazebný protein, calbindin (<i>calcium-binding protein</i>)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CAR	konstitutivní androstanový receptor (<i>constitutive androstane receptor</i>)
CaSR	kalciový receptor (<i>calcium sensing receptor</i>)
CD	diferenciační skupina (<i>cluster of differentiation</i>)
CDK	cyklin dependentní kinasa (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
C/EBP	vazebné proteiny pro enhancer CCAAT (<i>CCAAT / enhancer-binding proteins</i>)
CKD	chronické onemocnění ledvin (<i>chronic kidney disease</i>)
CKI	inhibitor cyklin dependentních kinas (<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>)
C _{max}	maximální koncentrace léčiva v krvi (<i>maximum concentration</i>)
CREB	protein vázající responzivní element pro cyklický adenosin monofosfát (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
CTLA4	antigen 4 asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty (<i>cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4</i>)
CYP27B1	1 α -hydroxylasa
DBD	DNA vazebná doména (<i>DNA-binding domain</i>)
DBP	vitamín D vazebný protein (<i>vitamin D-binding protein</i>)
DC	dendritická buňka (<i>dendritic cell</i>)
DNMT	DNA-methyltransferasa (<i>DNA methyltransferase</i>)
DR-3	přímé opakování sekvencí typu 3 (<i>direct repeats-3</i>)
DRIP	<i>vitamin D receptor interacting protein</i>

EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida (<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
E-box	<i>enhancer box</i>
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FGF-23	fibroblastový růstový faktor 23 (<i>fibroblast growth factor 23</i>)
Fox3P	<i>forkhead box 3P</i>
G-CSF	granulocytární kolonie stimulující faktor (<i>granulocyte colony stimulating factor</i>)
GM-CSF	granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor (<i>granulocyte / macrophage colony stimulating factor</i>)
GVHD	nemoc štěpu proti hostiteli (<i>graft versus host disease</i>)
H12	helix 12 (<i>helix 12</i>)
HAT	histonová acetyltransferasa (<i>histone acetyl transferase</i>)
HDAC-2	histonová deacetylasa 2 (<i>histone deacetylase 2</i>)
Hr	<i>hairless corepressor</i>
IC50	50% inhibiční koncentrace (<i>inhibitory concentration 50</i>)
IFN- γ	interferon γ (<i>interferon γ</i>)
Ig	imunoglobulin (<i>immunoglobulin</i>)
IGF-1	růstový faktor podobný inzulinu (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
I κ B α	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, α</i>
IL	interleukin (<i>interleukin</i>)
ILT3	<i>immunoglobulin-like transcript</i>
iT _{REG}	indukované pomocné T-lymfocyty (<i>induced regulatory T cells</i>)
IU	mezinárodní jednotka (<i>international unit</i>)
LBD	ligand vazebná doména (<i>ligand-binding domain</i>)
LBP	ligand vazebná kapsa (<i>ligand binding pocket</i>)
LD50	polovina letální dávky (<i>lethal dose 50 %</i>)
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kinasy (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
M-CSF	makrofágový kolonie stimulující faktor (<i>macrophage colony stimulating factor</i>)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (<i>major histocompatibility komplex</i>)
MTD	maximální tolerovaná dávka (<i>maximum tolerated dose</i>)
nCaREs	negativní Ca ²⁺ responzivní elementy (<i>negative Ca²⁺ responsive elements</i>)

NCoA	<i>nuclear receptor coactivator</i>
NCoR-1, 2	<i>nuclear receptor co-repressor 1, 2</i>
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (<i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF-κB	jaderný faktor κB (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK	přírození zabíječi (<i>natural killers</i>)
nT _{REG}	přírodní regulační T-lymfocyty (<i>natural regulatory T cells</i>)
PAMP	s patogenem asociované molekulární vzory (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PKA	protein kinasa A (<i>protein kinase A</i>)
PKC	protein kinasa C (<i>protein kinase C</i>)
PLC	fosfolipasa C (<i>phospholipase C</i>)
PPR	<i>pattern recognition receptors</i>
pre-D ₃	pre-vitamín D ₃ (<i>previtamin D₃</i>)
PTH	parathormon (<i>parathormone</i>)
PXR	pregnanový X receptor (<i>pregnane X receptor</i>)
REF-1	redoxní proteinový faktor (<i>redox factor protein</i>)
RHR	Rel homologní region (<i>Rel homology region</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
RXR	retinoidní X receptor (<i>retinoid X receptor</i>)
SMRT	<i>silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor</i>
SRC	<i>steroid receptor coactivator</i>
T _{1/2}	biologický poločas léčiva (<i>half-life</i>)
TAD	transaktivační doména (<i>trans-activating domain</i>)
T _C	cytotoxické T-lymfocyty (<i>cytotoxic T cells</i>)
TCR	T-buněčný receptor (<i>T-cell receptor</i>)
TGF-α, β	transformující růstový faktor α, β (<i>transforming growth factor α, β</i>)
T _H	pomocné T-lymfocyty (<i>helper T cells</i>)
TLR	toll-like receptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	tumor nekrotizující faktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
Tr1	regulační T-lymfocyty typu 1 (<i>type 1 regulatory T-cells</i>)
T _{REG}	regulační T-lymfocyty (<i>regulatory T cells</i>)

TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid</i>
UTR	nepřekládaná oblast (<i>untranslated region</i>)
UVB	ultrafialové záření části spektra B (<i>ultraviolet B</i>)
VDIR	<i>VDR interacting repressor</i>
VDR	receptor pro vitamín D (<i>vitamin D receptor</i>)
VDRE	vitamín D responzivní element (<i>vitamin D responsive element</i>)

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., Suda, T. (1981): Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 4990-4994.
- Adorini, L., Penna, G., Giarratana, N., Roncari, A., Amuchastegui, S., Daniel, K.C., Uskokovic, M. (2004): Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 89–90: 437-441.
- Alroy, I., Towers, T.L., Freedman, L.P. (1995): Transcriptional Repression of the Interleukin-2 Gene by Vitamin D₃: Direct Inhibition of NFATp/AP-1 Complex Formation by a Nuclear Hormone Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 15: 5789-5799.
- Amodio, G., Gregori, S. (2012): Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications. *Transplantation Research* 1: 14.
- Armas, L.A.G., Hollis, B.W., Heaney, R.P. (2004): Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 5387-5391.
- Arnson, Y., Amital, H., Shoenfeld, Y. (2007): Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66: 1137-1142.
- Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., Rao, A. (2002): T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunology* 3: 643-651.
- Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Gysemans, C., Mathieu, C. (2010): Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the immune system. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 121: 221-227.
- Bartek, J., Lukas, J. (2001): Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters* 490: 117-122.
- Beer, T.M., Myrthue, A. (2004): Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 373-381.
- Bikle, D. (2009): Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94: 26-34.
- Bischoff, H.A., Stähelin, H.B., Dick, W., Akos, R., Knecht, M., Salis, C., Nebiker, M., Theiler, R., Pfeifer, M., Begerow, B., Lew, R.A., Conzelmann, M. (2003): Effects of vitamin D and calcium supplementation on falls: a randomized controlled trial. *Journal of Bone and Mineral Research* 18: 343-351.

- Bischoff-Ferrari, H.A., Willett, W.C., Wong, J.B., Giovannucci, E., Dietrich, T., Dawson-Hughes, B. (2005): Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of the American Medical Association* 293: 2257-2264.
- Bland, R., Markovic, D., Hills, C.E., Hughes, S.V., Chan, S.L., Squires, P.E., Hewison, M. (2004): Expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90: 121-125.
- Boonstra, A., Barrat, F.J., Crain, C., Heath, V.L., Savelkoul, H.F., O'Garra, A. (2001): 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *The Journal of Immunology* 167: 4974-4980.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H.F., Lieben, L., Mathieu, C., Demay, M. (2008): Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews* 29: 726-776.
- Bouillon, R., van Cromphaut, S., Carmeliet, G. (2003): Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry* 88: 332-339.
- Bouillon, R., Verlinden, L., Eelen, G., Clercq, P.D., Vandewalle, M., Mathieu, C., Verstuyf, A. (2005): Mechanisms for the selective action of Vitamin D analogs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 97: 21-30.
- Brancaccio, D., Bommer, J., Coyne, D. (2007): Vitamin D Receptor Activator Selectivity in the Treatment of Secondary Hyperparathyroidism. Understanding the Differences Among Therapies. *Drugs* 67: 1981-1998.
- Brandi, L., Egfjord, M., Olgaard, K. (2002): Pharmacokinetics of 1,25(OH)(2)D(3) and 1alpha(OH)D(3) in normal and uraemic men. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 17: 829-842.
- Brennan, S.C., Thiem, U., Roth, S., Aggarwal, A., Fetahu, I.S., Tennakoon, S., Gomes, A.R., Brandi, M.L., Bruggeman, F., Mentaverri, R., Riccardi, D., Kallay, E. (2012): Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochimica et biophysica acta* in press.
- Bruce, S., Epinette, W.W., Funicella, T., Ison, A., Jones, E.L., Loss, R. Jr., McPhee, M.E., Whitmore, C. (1994): Comparative study of calcipotriene (MC 903) ointment and fluocinonide ointment in the treatment of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 31: 755-759.
- Bruner, C.R., Feldman, S.R., Ventrapragada, M., Fleischer, A.B. Jr. (2003): A systematic review of adverse effects associated with topical treatments for psoriasis. *Dermatology Online Journal* 9: 2.
- Bener, A., Alsaied, A., Al-Ali, M., Al-Kubaisi, A., Basha, B., Abraham, A., Guiter, G., Mian, M. (2009): High prevalence of vitamin D deficiency in type 1 diabetes mellitus and healthy children. *Acta Diabetologica* 46: 183-189.

Bienaimé, F., Prié, D., Friedlander, G., Souberbielle, J.C. (2011): Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Molecular and Cellular Endocrinology* 347: 30-41.

Bossé, Y., Maghni, K., Hudson, T.J. (2007): 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. *Physiological Genomics* 29: 161-168.

Brown, A.J., Finch, J., Grieff, M., Ritter, C., Kubodera, N., Nishii Y., Slatopolsky, E. (1993): The mechanism for the disparate actions of calcitriol and 22-oxacalcitriol in the intestine. *Endocrinology* 133: 1158-1164.

Brown, A.J., Ritter, C.R., Finch, J.L., Morrissey, J., Martin, K.J., Murayama, E., Nishii, Y., Slatopolsky, E. (1989): The noncalcemic analogue of vitamin D, 22-oxacalcitriol, suppresses parathyroid hormone synthesis and secretion. *The Journal of Clinical Investigation* 84: 728-732.

Brown, A.J., Slatopolsky, E. (1999): Vitamin D Analogs: Perspectives for Treatment. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 25: 337-341.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753-758.

Buttiglierio, C., Monagheddu, C., Petroni, P., Saini, A., Dogliotti, L., Ciccone, G., Berruti, A. (2011): Prognostic role of vitamin d status and efficacy of vitamin D supplementation in cancer patients: a systematic review. *Oncologist* 16: 1215-1227.

Calzavara-Pinton, P., Rossi, M.T., Sala, R., Venturini, M. (2011): The separate daily application of tacalcitol 4 μ g/g ointment and budesonide 0.25 mg/g cream is more effective than the single daily application of a two compound ointment containing calcipotriol 50 μ g/g and betamethasone dipropionate 0.5 mg/g. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* 146: 295-299.

Canaff, L., Hendy, G.N. (2002): Human Calcium-sensing Receptor Gene. Vitamin D Response Elements in Promoters P1 and P2 Confer Transcriptional Responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *Journal of Biological Chemistry* 277: 30337-30350.

Cantorna, M.T., Hayes, C.E., DeLuca, H.F. (1996): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 93: 7861-7864.

Cantorna, M.T., Hayes, C.E., DeLuca, H.F. (1998): 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *The Journal of Nutrition* 128: 68-72.

Cappitelli, M., Santoni, A. (1998): Vitamin D₃: a transcriptional modulator of the interferon- γ gene. *European Journal of Immunology* 28: 3017-3030.

Cheng, J.B., Levine, M.A., Bell, N.H., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W. (2004): Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7711-7715.

Chouvet, C., Vicard, E., Devonec, M., Saez, S. (1986): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *Journal of Steroid Biochemistry* 24: 373-376.

Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Nogales, K.E., Tian, S., Cardinale, I., Chimenti, S., Krueger, J.G. (2011): Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology* 131: 677-687.

Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., Douvdevani, A. (2006): Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 21: 889-897.

Cohn, L., Elias, J.A., Chupp, G.L. (2004): ASTHMA: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annual Review of Immunology* 22: 789-815.

D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M.G., Mazzeo, D., Di, L.P., Lang, R. (1998): Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NFkappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *The Journal of Clinical Investigation* 101: 252-262.

Daniel, C., Radeke, H.H., Sartory, N.A., Zahn, N., Zuegel, U., Steinmeyer, A., Stein, J. (2006): The new low calcemic vitamin D analog 22-ene-25-oxa-vitamin D prominently ameliorates T helper cell type 1-mediated colitis in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319: 622-631.

Daniel, C., Sartory, N.A., Zahn, N., Radeke, H.H., Stein, J.M. (2008): Immune Modulatory Treatment of Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis with Calcitriol Is Associated with a Change of a T Helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and Regulatory T Cell Profile. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324: 23-33.

Dao, C.N., Patel, P., Overton, E.T., Rhame, F., Pals, S.L., Johnson, C., Bush, T., Brooks, J.T. (2011): Low vitamin D among HIV-infected adults: prevalence of and risk factors for low vitamin D Levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the US general population. *Clinical Infectious Diseases* 52: 396-405.

Delmez, J.A., Slatopolsky, E. (1992): Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 19: 303-317.

Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M. (2011): Roitt's essential immunology. 12th ed. Wiley-Blackwell, Chichester. ISBN 978-1-4051-9683-3.

Eastwood, J.B., Stamp, T.C., De Wardener, H.E., Bordier, P.J., Arnaud, C.D. (1977): The effect of 25-hydroxyvitamin D₃ in the osteomalacia of chronic renal failure. *Clinical Science and Molecular Medicine* 52: 499-508.

- Eelen, G., Verlinden, L., Rochel, N., Claessens, F., de Clercq, P., Vandewalle, M., Tocchini-Valentini, G., Moras, D., Bouillon, R., Verstuyf, A. (2005): Superagonistic Action of 14-epi-Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D Explained by Vitamin D Receptor-Coactivator Interaction. *Molecular Pharmacology* 67: 1566-1573.
- el-Reshaid, K., el-Reshaid, W., Sugathan, T., al-Mohannadi, S., Sivanandan R. (1997): Comparison of the efficacy of two injectable forms of vitamin D₃ and oral one-alpha in treatment of secondary hyperparathyroidism in patients on maintenance hemodialysis. *American Journal of Nephrology* 17: 505-510.
- Eyles, D.W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J.J. (2005): Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 29: 21-30.
- Field, S., Newton-Bishop, J.A. (2011): Melanoma and vitamin D. *Molecular Oncology* 5: 197-214.
- Fournier, C., Gepner, P., Sadouk, M., Charreire, J. (1990): *In vivo* beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 54: 53-63.
- Fronczak, C.M., Barón, A.E., Chase, H.P., Ross, C., Brady, H.L., Hoffman, M., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., Norris, J.M. (2003): In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care* 26: 3237-3242.
- Geldmeyer-Hilt, K., Heine, G., Hartmann, B., Baumgrass, R., Radbruch, A., Worm, M. (2001): 1,25-dihydroxyvitamin D₃ impairs NF-κB activation in human naïve B cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 407: 699-702.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S. and Bouladoux, N. (2010): Generation of pathogenic T_{H17} cells in the absence of TGF-β signalling. *Nature* 467: 967-971.
- Ginde, A.A., Mansbach, J.M., Camargo, C.A. Jr. (2009): Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of Internal Medicine* 169: 384-390.
- Golden, J.B., McCormick, T.S., Ward, N.L. (2013): IL-17 in psoriasis: Implications for therapy and cardiovascular co-morbidities. *Cytokine* in press
- Griffin, M.D., Xing, N., Kumar, R. (2004): Gene expression profiles in dendritic cells conditioned by 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ analog. *The Journal of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 89-90: 443-448.
- Gysemans, C.A., Cardozo, A.K., Callewaert, H., Giulietti, A., Hulshagen, L., Bouillon, R., Eizirik, D.L., Mathieu, C. (2005): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 146: 1956-1964.

Hai, T., Curran, T. (1991): Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3720-3724.

Hansen, D. (2012): A randomised clinical study of alfacalcidol and paricalcitol. *Danish Medical Journal* 59: B4400.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T. (2005): Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6: 1123-1132.

Haussler, M.R., Jurutka, P.W., Mizwicki, M., Norman, A.W. (2011): Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 25: 543-559.

Hirata, M., Endo, K., Katsumata, K., Ichikawa, F., Kudobera, N., Fukagawa, M. (2002): A comparison between 1,25-dihydroxy-22-oxavitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regarding suppression of parathyroid hormone secretion and calcaemic action. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17: 41-45.

Holick, M.F. (2004): Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 362-371.

Holick, M.F. (2007): Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine* 357: 266-281.

Holick, M.F., Biancuzzo, R.M., Chen, T.C., Klein, E.K., Young, A., Bibuld, D., Reitz, R., Salameh, W., Ameri, A., Tannenbaum, A.D. (2008): Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93: 677-681.

Holick, M.F., Chen, T.C., Lu, Z., Sauter, E. (2007): Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *Journal of Bone and Mineral Research* 22: V28-V33.

Huhtakangas, J.A., Olivera, C.J., Bishop, J.E., Zanello, L.P., Norman, A.W. (2004): The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Endocrinology* 18: 2660-2671.

Institute of Medicine of the National Academies (2010): Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington, DC: *The National Academies Press*.

Jackson, D.J., Gangnon, R.E., Evans, M.D., Roberg, K.A., Anderson, E.L., Pappas, T.E., Printz, M.C., Lee, W.M., Shult, P.A., Reisdorf, E., Carlson-Dakes, K.T., Salazar, L.P., DaSilva, D.F., Tisler, C.J., Gern, J.E., Lemanske, R.F. Jr. (2008): Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178: 667-672.

Jacobs, M.D., Harrison, S.C. (1998): Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell* 95: 749-758.

- Jones, G., Prosser, D.E., Kaufmann, M. (2012): 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523: 9-18.
- Joseph, R.W., Bayraktar, U.D., Kim, T.K., St. John, L.S., Popat, U., Khalili, J., Molldrem, J.J., Wieder, E.D., Komanduri, K.V. (2012): Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells. *Human Immunology* 73: 693-698.
- Jovičić, S., Ignjatović, S., Majkić-Singh, N. (2012): Biochemistry and metabolism of vitamin D. *Journal of Medical Biochemistry* 31: 309-315.
- Kamen, D.L., Tangpricha, V. (2010): Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine* 88: 441-450.
- Karatekin, G., Kaya, A., Salihoğlu, O., Balci, H., Nuhoğlu, A. (2009): Association of subclinical vitamin D deficiency in newborns with acute lower respiratory infection and their mothers. *European Journal of Clinical Nutrition* 63: 473-477.
- Kawahara, M., Iwasaki, Y., Sakaguchi, K., Taguchi, T., Nishiyama, M., Nigawara, T., Kambayashi, M., Sawada, T., Jing, X., Miyajima, M., Terada, Y., Hashimoto, K., Suda, T. (2010): Involvement of GCMB in the transcriptional regulation of the human parathyroid hormone gene in a parathyroid-derived cell line PT-r: effects of calcium and 1,25(OH)₂D₃. *Bone* 47: 534-541.
- Kawase, A., Ichikawa, F., Koike, N., Kamachi, S., Stumpf, W.E., Nishii, Y., Kudobera, N. (2000): Synthesis and Pharmacokinetics of 1 α -Hydroxyvitamin D₃ Tritiated at 22 and 23 Positions Showing High Specific Radioactivity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 48: 215-219.
- Kiattisunthorn, K., Wutyam, K., Indranoi, A., Vasuvattakul, S. (2011): Randomized trial comparing pulse calcitriol and alfacalcidol for the treatment of secondary hyperparathyroidism in haemodialysis patients. *Nephrology* 16: 277-284.
- Kilav, R., Bell, O., Le, S.Y., Silver, J., Naveh-Many, T. (2004): The parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region AU-rich element is an unstructured functional element. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 2109-2116.
- Kim, G.K. (2010): The Rationale Behind Topical Vitamin D Analogs in the Treatment of Psoriasis. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 3: 46-53.
- Kim, H.J., Abdelkader, N., Katz, M., McLane, J.A. (1992): 1,25-dihydroxy-vitamin-D₃ enhances antiproliferative effect and transcription of TGF- β 1 on human keratinocytes in culture. *Journal of Cellular Physiology* 151: 579-587.
- Kobayashi, T., Tsugawa, N., Okano, T., Masuda, S., Takeuchi, A., Kubodera, N., Nishii, Y. (1994): The binding properties, with blood proteins, and tissue distribution of 22-oxa-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, a noncalcemic analogue of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃, in rats. *Journal of Biochemistry* 115: 373-380.

Koeffler, H.P., Hirji, K., Itri, L. (1985): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃: *in vivo* and *in vitro* effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treatment Reports* 69: 1399-1407.

Koli, K., Jorma, K.O. (1995): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the expression of transforming growth factor β 1 and its latent form binding protein in cultured breast carcinoma cells. *Cancer Research* 55: 1540-1546.

Kolls, J.K., Lindén, A. (2004): Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* 21: 467-476.

Kong, J., Grando, S.A., Li, Y.C. (2006): Regulation of IL-1 Family Cytokines IL-1 α , IL-1 Receptor Antagonist, and IL-18 by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Primary Keratinocytes. *The Journal of Immunology* 176: 3780-3787.

Koren, R., Ravid, A., Rotem, C., Shohami, E., Liberman, U.A., Novogrodsky, A. (1986): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances prostaglandin E₂ production by monocytes: A mechanism which partially accounts for the antiproliferative effect of 1,25(OH)₂D₃ on lymphocytes. *FEBS Letters* 205: 113-116.

Korting, H.C., Unholzer, A., Schäfer-Korting, M., Tausch, I., Gassmueller, J., Nietsch, K.H. (2002): Different skin thinning potential of equipotent medium-strength glucocorticoids. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 15: 85-91.

Kragballe, K., Barnes, L., Hamberg, K.J., Hutchinson, P., Murphy, F., Møller, S., Ruzicka, T., Van De Kerkhof, P.C. (1998): Calcipotriol cream with or without concurrent topical corticosteroid in psoriasis: tolerability and efficacy. *The British Journal of Dermatology* 139: 649-654.

Kubodera, N. (2009): A New Look at the Most Successful Prodrugs for Active Vitamin D (D Hormone): Alfacalcidol and Doxercalciferol. *Molecules* 14: 3869-3880.

Krejsek, J., Kopecký, O. (2004): *Klinická imunologie*. 1. vyd. Nucleus HK, Hradec Králové. ISBN 80-86225-50-X.

Kumar, R., Thompson, J.R. (2011): The Regulation of Parathyroid Hormone Secretion and Synthesis. *The Journal of the American Society of Nephrology* 22: 216-224.

Laaksi, I., Ruohola, J.P., Mattila, V., Auvinen, A., Ylikomi, T., Pihlajamäki, H. (2010): Vitamin D Supplementation for the Prevention of Acute Respiratory Tract Infection: A Randomized, Double-Blinded Trial among Young Finnish Men. *The Journal of Infectious Diseases* 202: 809-814.

Lange, N.E., Litonjua, A., Hawrylowicz, C.M., Weiss, S. (2009): Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Review of Clinical Immunology* 5: 693-702.

Langley, R.G., Gupta, A., Papp, K., Wexler, D., Østerdal, M.L., Curčić, D. (2011): Calcipotriol plus betamethasone dipropionate gel compared with tacalcitol ointment and the gel vehicle alone in patients with psoriasis vulgaris: a randomized, controlled clinical trial. *Dermatology* 222: 148-156.

- Lebwohl, M., Siskin, S.B., Epinetto, W., Breneman, D., Funicella, T., Kalb, R., Moore, J. (1996): A multicenter trial of calcipotriene ointment and halobetasol ointment compared with either agent alone for the treatment of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 35: 268-269.
- Lee, Y.K., Mukasa, R., Hatton R.D., Weaver, C.T. (2009): Developmental plasticity of T_{h17} and T_{reg} cells. *Current Opinion in Immunology* 21: 274-280.
- Leone, G., Pacifico, A. (2005): Profile of clinical efficacy and safety of topical tacalcitol. *Acta Bio-medica: Atenei Parmensis* 76: 13-19.
- Lennarz, W.J., Lane, M.D., Carafoli, E., Cleveland, D.W., Dixon, J.E., Exton, J.H., Modrich, P., (2004): Encyclopedia of Biological Chemistry, Volume 4, S-Z. 1st ed. Elsevier Academic Press, Oxford. ISBN 0124437109.
- Li, T., Sun, M., Yin, X., Wu, C., Wu, Q., Feng, S., Li, H., Luan, Y., Wen, J., Yan, L., Zhao, B., Xu, C., Sun, Y. (2013): Expression of the calcium sensing receptor in human peripheral blood T lymphocyte and its contribution to cytokine secretion through MAPKs or NF- κ B pathways. *Molecular Immunology* 53: 414-420.
- Lind, L., Wengle, B., Wide, L., Sörensen, O.H., Ljunghall, S. (1988): Hypertension in primary hyperparathyroidism--reduction of blood pressure by long-term treatment with vitamin D (alphacalcidol). A double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Hypertension* 1 (4 Pt 1): 397-402.
- Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M., Freedman, L.P. (1996): Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes & Development* 10: 142-153.
- Lutz, M.B., Schuler, G. (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology* 23: 445-449.
- Lipscomb, M.F., Masten, B.J. (2002): Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiological Reviews* 82: 97-130.
- Liu, P.T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B.H., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D.L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R.L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B.W., Adams, J.S., Bloom, B.R., Modlin, R.L. (2006): Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311: 1770-1773.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.C., Rossol-Haseroth, K., Wehling, M. (2003): Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiological Reviews* 83: 965-1016.
- Ma, Y., Yu, W.D., Hidalgo, A.A., Luo, W., Delansorne, R., Johnson, C.S., Trump, D.L. (2013): Inecalcitol, an analog of 1,25D₃, displays enhanced antitumor activity through the induction of apoptosis in a squamous cell carcinoma model system. *Cell Cycle* 12: 743-752.

- Macian, F. (2005): NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews. Immunology* 5: 472-484.
- Maldonado, R.A., von Andrian, U.H. (2010): How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in Immunology* 108: 111-165.
- Mantell, D.J., Owens, P.E., Bundred, N.J., Mawer, E.B., Canfield, A.E. (2000): 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Research* 87: 214-220.
- Masuda, S., Strugnell, S., Calverley, M.J., Makin, H.L.J., Kremer, R., Jones, G. (1994): In Vitro Metabolism of the Anti-psoriatic Vitamin D Analog Calcipotriol, in Two Cultured Human Keratinocyte Models. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 4794-4803.
- Mathieu, C., Adorini, L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents (2002): *Trends in Molecular Medicine* 8: 174-179.
- McAlindon, T.E., Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Aliabadi, P., Weissman, B., Rush, D., Wilson, P.W., Jacques, P. (1996): Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Annals of Internal Medicine* 125: 353-359.
- McCormack, P.L. (2011): Calcipotriol/Betamethasone Dipropionate. A Review of its Use in the Treatment of Psoriasis Vulgaris of the Trunk, Limbs and Scalp. *Drugs* 71: 709-730
- Mellet, M., Atzei, P., Horgan, A., Hams, E., Floss, T., Wurst, W., Fallon, P.G., Moynagh, P.N. (2012): Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nature Communications* 3: 1119.
- Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K. (2009): Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *The New England Journal of Medicine* 361: 888-898.
- Moe, S., Wazny, L.D., Martin, J.E. (2008): Oral calcitriol versus oral alfacalcidol for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis: a randomized, crossover trial. *The Canadian Journal of Clinical Pharmacology* 15: e36-43.
- Moreno, J., Krishnan, A.V., Feldman, D. (2005): Molecular mechanisms mediating the anti-proliferative effects of Vitamin D in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 97: 31-36.
- Morimoto, S., Yoshikawa, K., Kozuka, T., Kitano, Y., Imanaka, S., Fukuo, K., Kohm E., Hironaka, T., Zen, A., Nabata, T. (1987): Treatment of psoriasis vulgaris with oral 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃-report of two cases. *The Journal of Dermatology* 14: 59-62.
- Morrissey, J.J., Cohn, D.V. (1979): Secretion and Degradation of Parathormone as a Function of Intracellular Maturation of Hormone Pools. Modulation by Calcium and Dibutyryl Cyclic AMP. *The Journal of Cell Biology* 83: 521-528.

- Muindi, J.R., Modzelewski, R.A., Peng, Y., Trump, D.L., Johnson, C.S. (2004): Pharmacokinetics of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in normal mice after systemic exposure to effective and safe antitumor doses. *Oncology* 66: 62-66.
- Munger, K.L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., Hernan, M.A., Olek, M.J., Willett, W.C., Ascherio, A. (2004): Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62: 60-65.
- Murayama, A., Kim, M.S., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S. (2004): Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *The EMBO Journal* 23: 1598-1608.
- Murphy, K.M., Reiner, S.L. (2002): The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews. Immunology* 2: 933-944.
- Nagpal, S., Na, S., Rathnachalam, R. (2005): Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine Reviews* 26: 662-687.
- Nagpal, S., Lu, J., Boehm, M.F. (2001): Vitamin D analogs: mechanism of action and therapeutic applications. *Current Medical Chemistry* 8: 1661-1679.
- Naveh-Many, T., Friedlaender, M.M., Mayer, H., Silver, J. (1989): Calcium Regulates Parathyroid Hormone Messenger Ribonucleic Acid (mRNA), but not Calcitonin mRNA *in Vivo* in the Rat. Dominant Role of 1,25-Dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 125: 275-280.
- Niino, M., Fukazawa, T., Yabe, I., Kikuchi, S., Sasaki, H., Tashior, K. (2000): Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *Journal of the Neurological Sciences* 177: 65-71.
- Oda, Y., Sihlbom, C., Chalkley, R.J., Huang, L., Rachez, C., Chang, C.P., Burlingame, A.L., Freedman, L.P., Bikle, D.D. (2003): Two distinct coactivators, DRIP/mediator and SRC/p160, are differentially involved in vitamin D receptor transactivation during keratinocyte differentiation. *Molecular Endocrinology* 17: 2329-2339.
- Okamoto, R., Delansorne, R., Wakimoto, N., Doan, N.B., Akagi, T., Shen, M., Ho, Q.H., Said, J.W., Koeffler, H.P. (2012): Inecalcitol, an analog of 1 α ,25(OH)₂D₃, induces growth arrest of androgen-dependent prostate cancer cells. *International Journal of Cancer* 130: 2464-2473.
- Okazaki, T., Chung, U., Nishishita, T., Ebisu, S., Usuda, S., Mishiro, S., Xanthoudakis, S., Igarashi, T., Ogata, E. (1994): A redox factor protein, ref1, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 27855-27862.
- Okubo, Y., Natsume, S., Usui, K., Muro, M., Tsuboi, R. (2012): Combination therapy using maxacalcitol and corticosteroid lotions preliminary to monotherapy with maxacalcitol lotion for scalp psoriasis. *The Journal of Dermatological Treatment* in press

- Ortonne, J.P., Kaufmann, R., Lecha, M., Goodfield, M. (2004): Efficacy of treatment with calcipotriol/betamethasone dipropionate followed by calcipotriol alone compared with tacalcitol for the treatment of psoriasis vulgaris: a randomised, double-blind trial. *Dermatology* 209: 308-313.
- Patel, V., Horn, E.J., Lobosco, S.J., Fox, K.M., Stevens, S.R., Lebwohl, M. (2008): Psoriasis treatment patterns: results of a cross-sectional survey of dermatologists. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58: 964-969.
- Plotnikoff, G.A., Quigley, J.M. (2003): Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clinic Proceedings* 78: 1463-1470.
- Queille-Roussel, C., Duteil, L., Parneix-Spake, A., Arsonnaud, S., Rizova, E. (2001): The safety of calcitriol 3 µg/g ointment. Evaluation of cutaneous contact sensitization, cumulative irritancy, photoallergic contact sensitization and phototoxicity. *European Journal of Dermatology* 11: 219-224.
- Rachez, C., Gamble, M., Chang, C.P., Atkins, G.B., Lazar, M.A., Freedman, L.P. (2000): The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Molecular and Cellular Biology* 20: 2718-2726.
- Rachez, C., Freedman, L.P. (2000): Mechanisms of gene regulation by vitamin D3 receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* 246: 9-21.
- Rass, P., Pákozdi, A., Lakatos, P., Zilahi, E., Sipka, S., Szegedi, G., Szekanecz, Z. (2006): Vitamin D receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis and associated osteoporosis. *Rheumatology International* 26: 964-971.
- Rigby, W.F.C., Noelle, R.J., Krause, K., Fanger, M.W. (1985): The Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on Human T lymphocyte Activation and Proliferation: A Cell Cycle Analysis. *The Journal of Immunology* 135: 2279-2286.
- Ringe, J.D., Schacht, E. (2007): Improving the outcome of established therapies for osteoporosis by adding the active D-hormone analog alfacalcidol. *Rheumatology International* 28: 103-111.
- Rochel, N., Wurtz, J.M., Mitschler, A., Klaholz, B., Moras, D. (2000): The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Molecular Cell* 5: 173-179.
- Rojas-Rivera, R., De La Piedra, C., Ramos, A., Ortiz, A., Egido, J. (2010): The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrology Dialysis Transplantation* 25: 2850-2865.
- Roncarolo, M.G., Battaglia, M. (2007): Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Reviews. Immunology* 7: 585-598.

Ross, A.C., Manson, J.E., Abrams, S.A., Aloia, J.F., Brannon, P.M., Clinton, S.K., Durazo-Arvizu, R.A., Gallagher, J.C., Gallo, R.L., Jones, G., Kovacs, C.S., Mayne, S.T., Rosen, C.J., Shapses, S.A. (2011): The 2011 report on Dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96: 53-58.

Rostkowska-Nadolska, B., Sliupkas-Dyrda, E., Potyka, J., Kusmierz, D., Fraczek, M., Krecicki, T., Kubik, P., Zatonski, M., Latocha, M. (2010): Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures. *Advances in Medical Sciences* 55: 86-92.

Rots, N.Y., Iavarone, A., Bromleigh, V., Freedman, L.P. (1999): Induced Differentiation of U937 Cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ Involves Cell Cycle Arrest in G₁ That Is Preceded by a Transient Proliferative Burst and an Increase in Cyclin Expression. *Blood* 93: 2721-2729.

Rouached, M., El Kadiri Boutchich, S., Al Rifai, A.M., Garabédian, M., Fournier, A. (2008): Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney International* 74: 389-390.

Segersten, U., Correa, P., Hewison, M., Hellman, P., Dralle, H., Carling, T., Akerström, G., Westin, G. (2002): 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 2967-2972.

Silver, J., Naveh-Many, T., Mayer, H., Schmelzer, H.J., Popovtzer, M.M. (1986): Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription *in vivo* in the rat. *The Journal of Clinical Investigation* 78: 1296-1301.

Singh, M., Charde, R.M., Charde, M.S. (2011): Determination of Calcipotriene and forced its degradation behavior by HPLC. *Journal of Pharmacy Research* 4: 845-847.

Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., van Weelden, K., Tenniswood, M., Welsh, J. (1997): Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 42: 31-41.

Simons, D.M., Oh, S., Kropf, E., Aitken, M., Garcia, V., Basehoar, A., Caton, A.J. (2013): Autoreactive Th1 Cells Activate Monocytes To Support Regional Th17 Responses in Inflammatory Arthritis. *Journal of Immunology* in press

Slatopolsky, E., Cozzolino, M., Finch, J.L. (2002): Differential effects of 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ and 1α-hydroxyvitamin D₂ on calcium and phosphorus in normal and uremic rats. *Kidney International* 62: 1277-1284.

Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P., Hupperts, R. (2008): Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *Journal of Neuroimmunology* 194: 7-17.

Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J.W.C., Damoiseaux, J., Hupperts, R. (2009): Vitamin D Status Is Positively Correlated with Regulatory T Cell Function in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 4: e6635.

Song, X., Qian, Y. (2013): The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* in press

Spach, K.M., Pedersen, L.B., Nashold, F.E., Kayo, T., Yandell, B.S., Prolla, T.A., Hayes, C.E. (2004): Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiological Genomics* 18: 141-151.

Sproat, L., Bolwell, B., Rybicki, L., Dean, R., Sobecks, R., Pohlman, B., Andresen, S., Sweetenham, J., Copelan, E., Kalaycio, M. (2011): Vitamin D Level after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17: 1079-1083.

Steddon, S.J., Schroeder, N.J., Cunningham, J. (2001): Vitamin D analogues: how do they differ and what is their clinical role? *Nephrology Dialysis Transplantation* 16: 1965-1967.

Sun, S.C. (2011): Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Research* 21: 71-85.

Sun, S.C. (2012): The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological Reviews* 246: 125-140.
Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S. (1999): Selective Interaction of Vitamin D Receptor with Transcriptional Coactivators by a Vitamin D Analog. *Molecular and Cellular Biology* 19: 1049-1055.

Tang, Q., Bluestone, J.A. (2008): The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulativ. *Nature Immunology* 9: 239-244.

Tangpricha, V., Koutkia, P., Rieke, S.M., Chen, T.C., Perez, A.A., Holick, M.F. (2003): Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77: 1478-1483.

Toubi, E., Shoenfeld, Y. (2010): The Role of Vitamin D in Regulating Immune Responses. *The Israel Medical Assotiation Journal* 12: 174-175.

Towers, T.L., Staeva, T.P., Freedman, L.P. (1998): Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Gene Transcription Is Directly Repressed by the Vitamin D₃Receptor. Implications for Allosteric Influences on Nuclear Receptor Structure and Function by a DNA Element. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 10338-10348.

Towers, T.L., Staeva, T.P., Freedman, L.P. (1999): A Two-Hit Mechanism for Vitamin D₃-Mediated Transcriptional Repression of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene: Vitamin D Receptor Competes for DNA Binding with NFAT1 and Stabilizes c-Jun. *Molecular and Cellular Biology* 19: 4191-4199.

Trevillyan, J.M., Chiou, X.G., Chen, Y.W., Ballaron, S.J., Sheets, M.P., Smith, M.L., Wiedeman, P.E., Warrior, U., Wilkins, J., Gubbins, E.J., Gagne, G.D., Fagerland, J., Carter, G.W., Luly, J.R., Mollison, K.W., Djuric, S.W. (2001): Potent inhibition of NFAT activation and T-cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 48118-48126.

Trump, D.L., Hershberger, P.A., Bernardi, R.J., Ahmed, S., Muindi, J., Fakih, M., Yu, W.D., Johnson, C.S. (2004): Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 89-90: 519-526.

Udalova, I.A., Knight, J.C., Vidal, V., Nedospasov, S.A., Kwiatkowski, D. (1998): Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 21178-21186.

Uskokovic, M.R., Norman, A.W., Manchand, P.S., Studzinski, G.P., Campbell, M.J., Koeffler, H.P., Takeuchi, A., Siu-Caldera, M.L., Rao, D.S., Reddy, G.S. (2001): Highly active analogs of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ that resist metabolism through C-24 oxidation and C-3 epimerization pathways. *Steroids* 66: 463-471.

Veien, N.K., Bjerke, J.R., Rossmann-Ringdahl, I., Jakobsen, H.B. (1997): Once daily treatment of psoriasis with tacalcitol compared with twice daily treatment with calcipotriol. A double-blind trial. *The British Journal of Dermatology* 137: 581-586.

Veldman, C.M., Cantorna, M.T., DeLuca, H.F. (2000): Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374: 334-338.

Verlinden, L., Verstuyf, A., Convents, R., Marcelis, M., van Camp, M., Bouillon, R. (1998): Action of 1,25(OH)₂D₃ on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 142: 57-65.

Verlinden, L., Verstuyf, A., Quack, M., van Camp, M., van Etten, E., de Clercq, P., Vandewalle, M., Carlberg, C., Bouillon, R. (2001): Interaction of Two Novel 14-Epivitamin D₃ Analogs with Vitamin D₃ Receptor-Retinoid X Receptor Heterodimers on Vitamin D₃ Responsive Elements. *Journal of Bone and Mineral Research* 16: 625-638.

Verlinden, L., Verstuyf, A., van Camp, M., Marcelis, S., Sabbe, K., Zhao, X.Y., de Clercq, P., Vandewalle, M., Bouillon, R. (2000): Two Novel 14-Epi-Analogues of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibit the Growth of Human Breast Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Research* 60: 2673-2679.

Viard, J.P., Souberbielle, J.C., Kirk, O., Reekie, J., Knysz, B., Losso, M., Gatell, J., Pedersen, C., Bogner, J.R., Lundgren, J.D., Mocroft, A.; EuroSIDA Study Group (2011): Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study. *AIDS* 25: 1305-1315.

Vieth, R. (1999): Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition* 69: 842-856.

- von Essen, M.R., Kongsbak, M., Schjerling, P., Olgaard, K., Ødum, N., Geisler, C. (2010): Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nature Immunology* 11: 344-349.
- Wall, A.R., Poyner, T.F., Menday, A.P. (1998): A comparison of treatment with dithranol and calcipotriol on the clinical severity and quality of life in patients with psoriasis. *The British Journal of Dermatology* 139: 1005-1011.
- Wang, Q.M., Jones, J.B., Studzinski, G.P. (1996): Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27 as a Mediator of the G₁-S Phase Block Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in HL60 Cell. *Cancer Research* 56: 264-267.
- Wang, T.T., Dabbas, B., Laperriere, D., Bitton, A.J., Soualhine, H., Tavera-Mendoza, L.E., Dionne, S., Servant, M.J., Bitton, A., Seidman, E.G., Mader, S., Behr, M.A., White, J.H. (2010): Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 2227-2231.
- Welsh, J. (2007): Targets of vitamin D receptor signaling in the mammary gland. *Journal of Bone and Mineral Research* 22: V86-90.
- Wietrzyk, J., Pełczyńska, M., Madej, J., Dzimira, S., Kuśnierczyk, H., Kutner, A., Szelejowski, W., Opolski, A. (2004): Toxicity and antineoplastic effect of (24R)-1,24-dihydroxyvitamin D₃ (PRI-2191). *Steroids* 69: 629-635.
- Williams, C.J.B. (1849): On the use and administration of cod-liver oil in pulmonary consumption. *London Journal of Medicine* 1: 1-18.
- Xing, N., Maldonado, M.L., Bachman, L.A., McKean, D.J., Kumar, R., Griffin, M.D. (2002): Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297: 645-652.
- Yamanaka, K.I., Kakeda, M., Kitagawa, H., Tsuda, K., Akeda, T., Kurokawa, I., Gabazza, E.C., Kupper, T.S., Mizutani, H. (2011): 1,24-Dihydroxyvitamin D₃ (tacalcitol) prevents skin T-cell infiltration. *The British Journal of Dermatology* 162: 1206-1215.
- Yamane, H., Paul, W.E. (2013): Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews* 252: 12-23.
- Zehnder, D., Bland, R., Williams, M.C., McNinch, R.W., Howie, A.J., Stewart, P.M., Hewison, M. (2001): Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1 alpha-hydroxylase. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86: 888-894.
- Zella, J.B., McCary, L.C., DeLuca, H.F. (2003): Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417: 77-80.
- Zheng, Z., Narita, M., Takahashi, M., Liu, A., Furukawa, T., Toba, K., Aizawa, Y. (2004): Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27: 93-103.

Zheng, C., Yin, Q., Wu, H. (2011): Structural studies of NF- κ B signaling. *Cell Research* 21: 183-195.

Zhou, F., Ciric, B., Zhang, G.X., Rostami, A. (2013): Immune tolerance induced by intravenous transfer of immature dendritic cells via up-regulating numbers of suppressive IL-10(+) IFN- γ (+)-producing CD4 (+) T cells. *Immunologic research* in press

Zhu, J., DeLuca, H. F. (2012): Vitamin D 25-hydroxylase – Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523: 30-36.

Zhu, S., Qian, Y. (2012): IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science* 122: 487-511.

Zittermann, A., Koerfer, R. (2008): Vitamin D in the prevention and treatment of coronary heart disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 11: 1-6.

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled dostupných informací o srovnávaných analozích vitamínu D.