

RÓŻNE OBLICZA „WITAMINY SŁOŃCA”

Double faces of vitamin D₃

Magdalena Regulska (Kraków)

Streszczenie

Witamina D₃ jest jednym z organicznych związków chemicznych niezwykle cennych dla zdrowia. Jest syntetyzowana przez ludzki organizm, gdzie pod wpływem promieni słonecznych cholesterol w kilkuetapowym procesie jest przekształcany w aktywną biologicznie formę witaminy D₃ zwaną kalcytriolem.

Witamina D₃ wpływa na utrzymanie homeostazy wapniowo-fosforanowej i układ kostny, a dodatkowo badania ostatnich lat pokazują, że jest ona konieczna do prawidłowego funkcjonowania skóry, układu krwionośnego, gonad, gruczołu piersiowego i krokowego oraz układu nerwowego i immunologicznego. Kalcytriol działając poprzez jądrowe receptory witaminy D₃ (VDR), zwiększa różnicowanie nie tylko komórek prawidłowych, lecz również nowotworowych. Potencjalne korzystne efekty może wywoływać witamina D₃ w chorobie Alzheimera i Parkinsona, a także w chorobach będących następstwem niedokrwienia i urazów mechanicznych ośrodkowego układu nerwowego.

Abstract

Vitamin D₃ is one of the substances that are particularly valuable for health. It is synthesized by the human body, where under the influence of sunlight, cholesterol is transformed in several stages into a biologically active form of vitamin D₃ called calcitriol.

Vitamin D₃ affects the maintenance of calcium and phosphate homeostasis and the skeletal system, and in addition recent studies show that it is necessary for the proper functioning of the skin, circulatory system, gonads, mammary glands and prostate as well as the nervous and immune systems. Calcitriol, acting through nuclear vitamin D₃ receptors (VDR), increases the differentiation of not only normal but also cancer cells. Vitamin D₃ may have potential beneficial effects in Alzheimer's and Parkinson's disease, as well as in diseases resulting from ischemic and mechanical injuries of the central nervous system.

Ogólna charakterystyka witamin D:

To szara eminencja wśród witamin. Najprawdopodobniej jest ona wytwarzana od ponad 750 milionów lat, bo taką zdolność posiadały już pierwsze formy życia na Ziemi. Nadal fito- i zooplankton oraz większość zwierząt i roślin pod wpływem działania promieni słonecznych posiada zdolność jej syntetyzowania. Dlatego niekiedy mówi się o niej jako o „witaminie słońca”.

Większość ludzi uważa, że wpływa ona tylko na utrzymanie homeostazy wapniowo-fosforanowej, a w rzeczywistości witamina D₃ pracuje na wielu eta-

tach. Jest ona potrzebna nie tylko kościom i zębom, ale także układowi nerwowemu, mięśniom i skórze. Dba również o szpik kostny, a także może chronić przed chorobami nowotworowymi. Nadal odkrywane są jej nowe właściwości i dlatego najwyższy czas, by witamina D₃ wyszła z cienia i zaprezentowała całe swoje oblicze.

Grupa witamin D należąca do związków chemicznych zwanych steroidami, obejmuje witaminę D₁ (kalcyferol), witaminę D₂ (ergokalcyferol) oraz witaminę D₃ (cholekalcyferol). Głównym źródłem witamin D jest pożywienie: duże ilości witaminy D₁ znajdują się w tranie, witamina D₂ jest wytwarzana

w roślinach wystawionych na działanie promieni ultrafioletowych, natomiast witamina D₃ znajduje się głównie w tranie, rybach (łosoś, tuńczyk, śledź, makrela, sardynki) oraz w mleku i przetworach mlecznych. Jednak naturalne zasoby witaminy D₃ są dość ograniczone i większość produktów spożywczych jest raczej uboga w tę witaminę.

Biosynteza, metabolizm i katabolizm witaminy D₃

W przeciwieństwie do witamin D₁ i D₂, witamina D₃ może być wytwarzana również przez organizm ludzki. Jest ona syntetyzowana w skórze z metabolitu cholesterolu – 7-dehydrocholesterolu podczas ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe (UV) emitowane przez słońce. W reakcji tej dochodzi do rozszczepienia pierścienia B 7-dehydrocholesterolu, z którego powstaje prowitamina D₃, która następnie samorzutnie izomeryzuje do witaminy D₃ (cholekalcyferolu). Witamina D₃ przekształcana jest w biologicznie aktywną formę - 1α,25-dihydroksycholekalcyferol [1α,25-(OH)₂D₃], nazywaną także kalcytriolem [28].

Proces aktywacji witaminy D₃ odbywa się dwustopniowo (Ryc. 1):

- w wątrobie: poprzez hydroksylację witaminy D₃ w pozycji C-25 przez 25-hydroksylazę, co prowadzi do wytworzenia kalcydiolu (25-hydroksycholekalcyferolu: 25-OH-D₃), głównej formy witaminy D₃ występującej w układzie krążenia;
- w nerkach: gdzie kalcydiol ulega hydroksylacji w pozycji C-1 pod wpływem 1α-hydroksylazy kalcydiolowej, co ostatecznie prowadzi do otrzymania kalcytriolu (1α,25-dihydroksywitamina D₃, 1α,25(OH)₂D₃), związku bardziej polarnego niż 25-OH-D₃ [17].

Pora roku, pora dnia, pigmentacja skóry, wiek i inne czynniki mają wpływ na ilość skórnej produkcji witaminy D₃. Zapotrzebowanie na witaminę D₃ uzależnione jest od wieku, np. dzieci potrzebują więcej witaminy niż dorośli. Zwiększonych dawek witaminy D₃ potrzebują również osoby starsze, którym w okresie przekwitania z powodu zmian hormonalnych zagraża osteoporoza, a ponadto z wiekiem zmniejsza się zdolność organizmu do wytwarzania tej witaminy pod wpływem promieni ultrafioletowych. Również osoby przebywające w zanieczyszczonym środowisku mają mniejsze szanse na posiadanie odpowiedniej ilości witaminy D₃ w organizmie.

Zgodnie z aktualnymi rekomendacjami wobec suplementacji i leczenia witaminą D₃ (nowelizacja 2018) przyjęto potrzebę wdrożenia regularnej suple-

mentacji w populacji polskiej według następujących wskazań oraz dawek:

Noworodki donoszone i niemowlęta:

- 0–6 miesięcy: 400 IU na dobę od pierwszych dni życia niezależnie od sposobu karmienia;
- 6–12 miesięcy: 400–600 IU na dobę zależnie od dobowej ilości witaminy D₃ przyjętej z pokarmem;

Dzieci (1–10 lat), młodzież (11–18 lat) i dorośli (19–65 lat):

- dzieci zdrowe, przebywające na słońcu z odkrytymi przedramionami i podudziami przez min. 15 minut od 10.00 do 15.00 bez kremów z filtrem w okresie od maja do września nie wymagają suplementacji, choć dalej jest ona zalecana i bezpieczna;
- jeśli powyższe warunki nie mogą zostać spełnione, zaleca się suplementację witaminy w dawce 600–1000 IU na dobę (u dzieci) oraz 800–2000 IU na dobę dla młodzieży i dorosłych, w zależności od masy ciała i podaży witaminy D₃ w diecie, przez cały rok.

Seniorzy (>65–75 lat, >75 lat) oraz osoby z ciemną karnacją skóry:

- W tej grupie skuteczność syntezy skórnej, a także absorpcja z przewodu pokarmowego i zmieniony metabolizm witaminy D₃ mogą ulec zmniejszeniu, dlatego rekomenduje się suplementację przez cały rok. Jest to 800–2000 IU na dobę dla grupy >65–75 i osób z ciemną karnacją oraz 2000–4000 IU na dobę dla grupy >75 lat, w zależności od masy ciała i podaży witaminy D₃ w diecie.

Kobiety w czasie ciąży i laktacji:

- W tej grupie zaleca się suplementację pod kontrolą 25(OH)D₃ w surowicy, celem utrzymania optymalnego stężenia w granicach >30–50 ng/ml. Jeśli nie jest możliwe oznaczenie, wówczas rekomenduje się suplementację witaminą w dawce 2000 IU na dobę, przez cały okres ciąży i laktacji.

Wędrówka witaminy D₃ w organizmie odbywa się dzięki wiążącemu ją białku transportowemu VDBP (*vitamin D binding protein*). Białko to należy do białek transporterowych frakcji γ-globulin osocza [2].

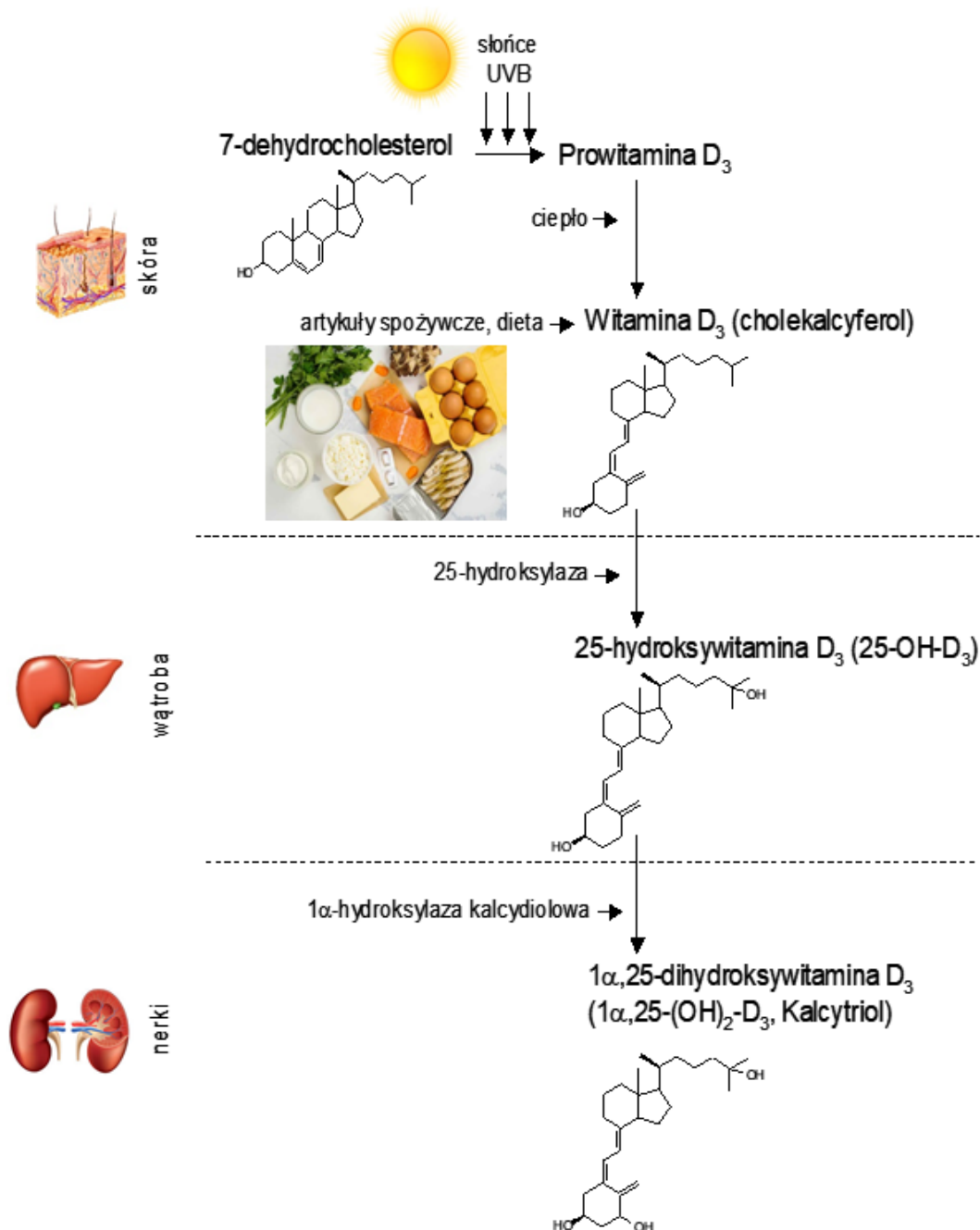
Witamina D₃ metabolizowana jest głównie przez hydroksylację w pozycjach C-24, C-23 i C-26 do produktów o niewielkim powinowactwie do receptora dla witaminy D₃ (VDR, *vitamin D receptor*). Głównym enzymem kontrolującym poziom aktywnej formy witaminy D₃ jest 24-hydroksylaza (mitochondrialny enzym P450), pod wpływem której boczny

łańcuch kalcytriolu i jego prekursora, 25-hydroksywitaminy D₃, ulega hydroksylacji w pozycji 24 [38]. Kalcytriol nasila aktywność 24-hydroksylazy tym samym ograniczając swoje działanie na tkanki docelowe (hamujące sprzężenie zwrotne). Również niektóre leki (fenytoina, karbamazepina, fenobarbital) nasilają metabolizm aktywnej formy witaminy D₃. Zarówno enzymy syntetyzujące aktywną formę witaminy D₃ (25-hydroksylaza i 1 α -hydroksylaza), jak

w sposób autokryny (działając na komórkę, która ją wytwarza) i parakryny (poprzez wpływ na sąsiednie komórki) wpływać na funkcję OUN [8].

Działanie kalcytriolu. Klasyczne działanie

W latach osiemdziesiątych XX wieku nastąpił wzrost zainteresowania badaczy grupą związków sekosteroidowych, wśród których znalazła się grupa



Ryc. 1. Synteza witaminy D₃ [11, 24].

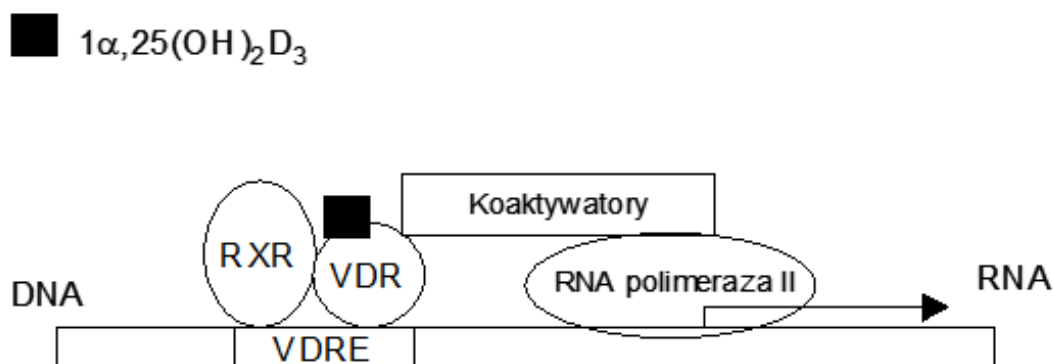
i enzym inaktywujący ją (24-hydroksylaza) występują w mózgu, uważa się więc że witamina D₃ może

witamin D, a w szczególności 1 α ,25-dihydroksywitamina D₃ (kalcytriol). Identyfikacji jej dokonał Holick

już w 1971 roku. Początkowo wykazano, że aktywna hormonalnie postać witaminy D₃ – kalcytriol, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy wapniowo-fosforanowej w organizmie [17]. Odpowiednie stężenie jonów wapnia i fosforu w płynie pozakomórkowym i tkance kostnej jest niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji kości i zębów. Regulacja tych procesów przez kalcytriol polega głównie na intensyfikacji wchłaniania wapnia w jelicie, uwalnianiu Ca²⁺ z kości oraz absorpcji wapnia w nerkach. Za podstawowe narządy docelowe działania kalcytriolu uważa się jelito, nerki i kości [28].

Witamina D₃ zwiększa wchłanianie wapnia i fosforu w jelitach, nasilając syntezę białka wiążącego wapń. Wraz z parathormonem wytwarzanym przez gruczoły przytarczyc i kalcytoniną zapewnia utrzy-

neralizacji powoduje nadmierne pogrubienie chrząstki nasadowej, w rezultacie czego dochodzi do deformacji kończyn dolnych. Natomiast u dorosłych głównym objawem jest ból, mogą też występować częściowe złamania kości, tworząc tzw. strefy rozrzedzenia (*looser zone*) lub rzekome złamania (*pseudofracture*). W osteomalacji kości mają zmniejszoną gęstość, ale ponieważ ich nasady są zamknięte, nie występują objawy charakterystyczne dla krzywicy. Głównym zastosowaniem kalcytriolu jest leczenie i zapobieganie krzywicy u dzieci lub osteomalacji u dorosłych. Przy niedoborze witaminy D₃ stężenie wapnia w surowicy może być niskie. W konsekwencji grozi tężyczka i wzrost aktywności przytarczyc [4].



Ryc. 2. Model działania witaminy D₃ przez swój receptor (VDR).

Kompleks 1α,25(OH)₂D₃-VDR heterodimeryzuje z receptorem retinoidów (RXR) i heterodimer VDR/RXR wiąże się do specyficznych sekwencji (VDRE) w promotorach genów docelowych.

manie określonego stężenia jonów wapnia w osoczu krwi [2]. Wzrost stężenia wapnia we krwi hamuje wydzielanie parathormonu, a nasila sekrecję kalcytoniny. Kalcytonina syntetyzowana w komórkach okołopęcherzykowych tarczycy zmniejsza uwalnianie wapnia z kości do krwi, zmniejsza jego wchłanianie w jelicie cienkim, a zwiększa wydalanie wapnia i fosforu przez nerki, co prowadzi do obniżenia poziomu wapnia we krwi. Parathormon zwiększa uwalnianie wapnia z magazynów kostnych do krwi, nasila wchłanianie zwrotne wapnia, zmniejsza wchłanianie zwrotne fosforu w nerkach oraz nasila wytwarzanie w nerkach aktywnej postaci witaminy D₃.

Niedobór witaminy D₃ u dzieci powoduje wystąpienie krzywicy (*rhachitis*), u dorosłych mówi się wówczas o osteomalacji. Oba stany charakteryzuje zaburzenie uwapnienia osteoidu, będącego macierzą kostną, a objawy kliniczne zależą od tego, czy kości są jeszcze w fazie wzrostu, czy już nie. U dzieci dochodzi do zaburzenia przebudowy kości, następuje rozdzęcie rosnących nasad, a brak śródchrzęstnej mi-

Receptorowe mechanizmy działania witaminy D₃

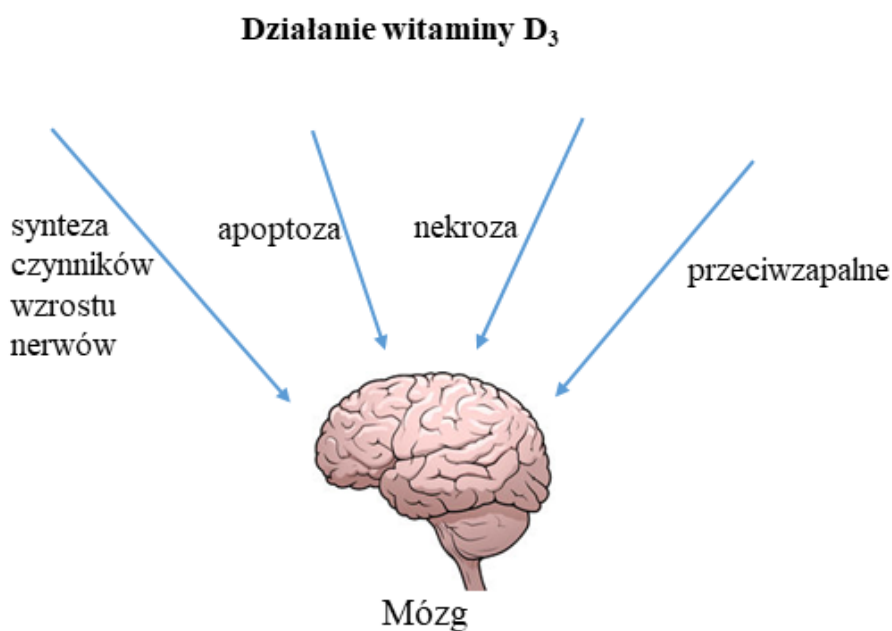
Witamina D₃ działa poprzez specyficzne receptory jądrowe (nVDR). Jądrowy receptor dla witaminy D₃ jest zależnym od liganda czynnikiem transkrypcyjnym, wiążącym się do specyficznych sekwencji (VDRE, *vitamin D response element*) w rejonie promotora genów docelowych. nVDR reguluje transkrypcję genów docelowych działając głównie jako heterodimer z receptorem kwasu retinowego (RXR), lecz może działać również jako heterodimer z receptorami hormonów tarczycy, czy jako homodimer. W ten sposób witamina D₃ działa na geny kodujące białka związane z transportem wapnia i fosforu, np. geny kodujące osteokalcynę, osteopontynę, enzym 24-hydroksylazę czy kalbindynę oraz geny związane z proliferacją i różnicowaniem komórek, na przykład gen kodujący białko p21, białko bcl-2 oraz białko p53 (Ryc. 2).

Wpływ kalcytriolu na proliferację i różnicowanie komórek

W ostatnich latach zaobserwowano, iż kalcytriol wpływa również na tkanki niezwiązane z homeostazą wapniowo-fosforanową, między innymi na tkankę skórną, komórki krwi, gonad i gruczołu piersiowego. Kalcytriol nasila proces różnicowania komórek, co prowadzi do obniżenia ich zdolności do proliferacji. Ponieważ kalcytriol zwiększa różnicowanie nie tylko komórek prawidłowych, lecz również nowotworowych, prowadzone są badania oceniające jego przydatność w niektórych chorobach nowotworowych, m.in. czerniaku, białaczkach, nowotworach gruczołu piersiowego i krokowego [2, 17, 24].

obszarach mózgu, m.in. w hipokampie, korze, ciele migdałowatym i wzgórzu. [11]. Rozmieszczenie receptorów nVDR w mózgu człowieka i gryzoni jest bardzo podobne. W neuronach i komórkach glejowych wykazano obecność 1α -hydroksylazy, enzymu limitującego syntezę aktywnej formy witaminy D_3 . Największe stężenie zarówno 1α -hydroksylazy, jak i receptorów nVDR występuje w podwzgórzu oraz substancji czarnej [9].

Dokładny mechanizm działania kalcytriolu w OUN nie jest jednak do końca wyjaśniony. Wiadomo, że oprócz działania genomowego przez receptory nVDR, kalcytriol działa także w sposób nie-genomowy. Część badań wskazuje na istnienie również błonowego receptora dla witaminy D_3 (mVDR). Po-



Ryc. 3. Schemat działania witaminy D_3 w obrębie centralnego układu nerwowego.

Działanie na układ nerwowy

Coraz więcej danych literaturowych świadczy o wpływie kalcytriolu na funkcję ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Wykazano, że witamina D_3 może być syntetyzowana i metabolizowana również w OUN. Procesy te odbywają się najczęściej w komórkach glejowych, w różnych obszarach mózgu, gdzie znajdują się dwa enzymy: 25-hydroksylaza witaminy D_3 i 1α -hydroksylaza-25-hydroksywitaminy D_3 , niezbędne do przekształcenia prohormonu witaminy D_3 do jej biologicznie aktywnej formy – kalcytriolu [11, 27].

Obecność specyficznych receptorów jądrowych (nVDR) dla witaminy D_3 wykryto zarówno w neuronach jak i w komórkach glejowych w różnych

łączenie $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminy D_3 z receptorem błonowym powoduje uruchomienie wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału (wpływa głównie na aktywność kinaz białkowych aktywowanych mitogenem: MAPKs) [7].

W ostatnich latach pojawiły się dane sugerujące, że witamina D_3 wpływając na syntezę neuroprzekazników, czynników wzrostu i cytokin, moduluje wiele funkcji ośrodkowego układu nerwowego zarówno w okresie rozwojowym, jak i u osobników dorosłych [11] (Ryc. 3). Dane epidemiologiczne oraz doświadczenia prowadzone na zwierzętach wskazują, że niedobory witaminy D_3 mogą być czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia stwardnienia rozsianego, cukrzycy, zwłaszcza typu I, schizofrenii oraz niektórych chorób nowotworowych [23]. Co ważne,

witamina D₃ przenika przez barierę krew – mózg, tak więc podana obwodowo hamuje również, związane z jej niedoborem, zaburzenia funkcji OUN.

Potencjalne, neuroprotektoryjne działanie kalcytriolu

Zapobieganie uszkodzeniom komórek nerwowych w chorobach neurodegeneracyjnych o różnej etiologii, a w szczególności w chorobie Parkinsona, chorobie Alzheimerza, stwardnieniu rozsianym oraz chorobach demencyjnych, a także w chorobach będących następstwem niedokrwienia, urazów mechanicznych ośrodkowego układu nerwowego, hipoglikemii czy też stanów padaczkowych stanowi niezwykle ważny i wciąż nierozwiązalny problem współczesnej medycyny. Pomimo wieloletnich badań i ogromnego zapotrzebowania nie znaleziono dotychczas leku, który mógłby skutecznie spowolnić lub zahamować procesy neurodegeneracyjne. Niepowodzenia na tym polu można tłumaczyć niedostatecznym jeszcze zrozumieniem procesów obumierania komórek nerwowych oraz mechanizmów aktywacji endogennych czynników neuroprotektoryjnych. Zaczyna przeważać opinia, że leku neuroprotektoryjnego należy poszukiwać wśród substancji, które działają jednocześnie na kilka mechanizmów decydujących o przeżywalności komórek nerwowych. Witamina D₃ reguluje procesy proliferacji i różnicowania komórek oraz chroni neurony w procesie starzenia i zmniejsza wywoływane różnymi czynnikami (kwas glutaminowy, niedokrwienie) uszkodzenie komórek nerwowych u zwierząt doświadczalnych [20]. Witamina D₃ zapobiega pogorszeniu funkcji poznawczych i poprawia funkcję synaptyczną hipokampa u starzejących się szczurów. Coraz więcej dowodów sugeruje, że niedobór kalcytriolu może przyspieszyć związany z wiekiem spadek funkcji poznawczych. Dlatego może właśnie to jej analogi mogą w przyszłości stać się lekami neuroprotektoryjnymi.

Jednym z przypuszczalnych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania witaminy D₃ jest stymulacja syntezy czynników wzrostu. Wykazano, że kalcytriol nasila syntezę czynnika wzrostu nerwów (NGF; *nerve growth factor*) w hipokampie i korze mózgowej szczura *in vivo* oraz *in vitro* w wielu rodzajach komórek, w tym również w komórkach glejowych [13]. Mechanizm działania witaminy D₃ na syntezę czynników wzrostu jest słabo poznany. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że stymuluje ona syntezę NGF, zwiększając aktywność promotora genu kodującego NGF przez nasilenie wiązania czynników transkrypcyjnych do sekwencji AP-1 [36].

Oprócz wpływu na NGF, witamina D₃ nasila syntezę *in vitro* i *in vivo* także innych czynników wzrostu, tj. neurotroficznego czynnika pochodzenia glejowego (GDNF, *glia-derived neurotrophic factor*) oraz neurotrofyny 3 i 4 (NT-3, NT-4), zwiększając żywotność komórek nerwowych [27].

Neuroprotektoryjne działanie witaminy D₃ może także wynikać z ograniczania napływu wapnia do komórki przez zależne od potencjału kanały wapniowe typu L. Wykazano bowiem, że niskie (1-100 nM) stężenia kalcytriolu chronią komórki hipokampalne przed toksycznym działaniem kwasu glutaminowego, a efekty te korelują z obniżeniem ekspresji podjednostek zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu L. Należy jednak zaznaczyć, że wyższe, niefizjologiczne (500-1000 nM) stężenia witaminy D₃ nie wykazały w tych badaniach efektów neuroprotektoryjnych [3]. Inne prace wskazują, że kalcytriol zwiększa poziom glutationu w komórce i zapobiega indukowanemu stresem oksydacyjnym lub kwasem glutaminowym uszkodzeniom neuronów dopaminergicznych [16].

Potencjalne korzystne efekty może wywoływać witamina D₃ w chorobie Alzheimerza i Parkinsona. Wykazano bowiem, że witamina D₃ zwiększa aktywność acetylotransferazy cholinowej, a właśnie nasilenie przekazywania w synapsach cholinergicznym jest głównym celem interwencji farmakologicznej w tej chorobie. Z kolei u pacjentów z chorobą Parkinsona wykazano obniżone stężenie witaminy D₃ w surowicy, a jej podawanie łagodziło kliniczne objawy chorobowe. W zwierzęcym modelu choroby Parkinsona stwierdzono, że witamina D₃ zmniejsza utratę (uszkodzenia) neuronów istoty czarnej, zwiększając ekspresję glejowego czynnika neurotroficznego (GDNF) i nasilając ekspresję hydroksylazy tyrozynowej [32].

Wpływ kalcytriolu na proces apoptozy

Według współczesnych poglądów śmierć komórki nerwowej, w zależności od towarzyszących jej zjawisk biochemicznych i morfologicznych, może zachodzić na drodze apoptozy lub nekrozy. Programowana śmierć komórki, jak określa się apoptozę, jest uporządkowanym, czynnym procesem zależnym od aktywacji genów, w wyniku którego komórka popełnia samobójstwo. Proces ten jest niezbędny podczas rozwoju embrionalnego, a u osobników dorosłych odgrywa istotną rolę w zachowaniu homeostazy, a także w eliminacji komórek starych, zmutowanych i autoreaktywnych. Każdego dnia osoba dorosła wytwarza i traci 50–70 bilionów komórek, co odpowiada prawie 1 milionowi komórek na sekundę.

W warunkach prawidłowych procesy wytwarzania i utraty komórek są ściśle ze sobą związane, a ich liczba jest stała. Występujący niekiedy ich wzrost ma charakter przejściowy i jest odpowiedzią na bodźce środowiskowe. Nadmierna odporność komórek na apoptozę ma wpływ na rozwój nowotworów i autoimmunizacji. Natomiast zbyt rozległa śmierć komórek wskutek apoptozy może być przyczyną niewydolności narządów lub rozwoju niektórych przewlekłych chorób zwyrodnieniowych [31]. W przeciwieństwie do tkanek obwodowych, w centralnym systemie nerwowym neurony, zróżnicowane nie dzielące się komórki, ulegają apoptozie w okresie rozwojowym, natomiast u osób dorosłych, jeżeli komórki są bardzo podatne na apoptozę i w konsekwencji eliminowanych jest wiele komórek, to taki niekontrolowany proces może doprowadzić do rozwoju niektórych chorób degeneracyjnych.

Programowana śmierć komórki ma charakter kaskady procesów biochemicznych i w zależności od jej typu może trwać od kilku do kilkunastu godzin, a nawet kilku dni. Procesy te obejmują trzy fazy: inicjacji, czyli wzbudzenia, fazę wykonawczą i fazę zniszczenia. Komórka wchodząca na drogę apoptozy zwykle oddziela się od pozostałych komórek. Istotne zmiany morfologiczne w pierwszej kolejności obejmują jądro komórkowe, które obkurcza się, a chromatyna ulega zagęszczeniu. Dochodzi do postępującej degradacji i fragmentacji DNA na odcinki o wielkości około 200 par zasad. Fragmentacja ta odbywa się przy udziale endonukleazy zależnej od wapnia i magnezu CAD (ang. *caspase activated deoxyribonuclease* - deoksyrybonukleaza aktywowana przez kaspazę). Komórki apoptotyczne tracą znaczne ilości wody, a wraz z nią elektrolitów, co prowadzi do kondensacji materiału genetycznego, zmniejszenia się obszaru cytoplazmy, obkurczania się komórki i powstania tzw. ciałek apoptotycznych [18]. Są to otoczone błoną fragmenty komórki zawierające resztki cytoplazmy, organelle komórkowe oraz fragmenty chromatyny. Dochodzi również do powstania w błonie mitochondrialnej kanałów, które umożliwiają wpływ cytochromu c, wchodzącego w skład kompleksu aktywującego kaspazę-9 [31].

Apoptozie komórek nerwowych sprzyja powstawanie wolnych rodników, przed którymi chroni komórkę m.in. prawidłowa aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, ważnego enzymu antyoksydacyjnego, przyspieszającego rozkład toksycznych rodników tlenowych.

Przekazywanie sygnału apoptozy przebiega różnorodnymi, niezależnymi szlakami, które są pobudzane zarówno przez procesy zachodzące wewnątrz

komórek (mitochondrialny szlak apoptozy), jak i przez zjawiska zachodzące w środowisku zewnętrznym, np. związanie ligandu z tzw. receptorem śmierci (zwnętrzkomórkowy szlak apoptozy). Receptory śmierci należą do nadrodziny receptorów dla czynnika martwicy nowotworów (TNF, *tumor necrosis factor*) [25]. W komórkach inicjacja apoptozy odbywa się przez receptory śmierci (DR, *death receptors*) zlokalizowane w błonach komórkowych lub przez mitochondria. Obecnie znanych jest pięć funkcjonalnych receptorów śmierci: TNF-receptor 1, CD95/Fas/Apo1R, TRAIL R1, TRAIL R2 i Apo3R. Związanie receptora z ligandem, najczęściej Fas-L lub TNF, prowadzi do rekrutacji białek adaptorowych do domeny śmierci i oligomeryzacji, czyli utworzenia kompleksów białkowych, wewnątrz których dochodzi do aktywacji kaspazy 8. Zaktywowana kaspaza 8 aktywuje kaspazy wykonawcze, a także może, poprzez aktywację pro-apoptotycznego białka Bid, które przemieszcza się do mitochondriów, aktywować również mitochondrialną ścieżkę apoptozy.

Wśród czynników uruchamiających mitochondrialny szlak apoptozy wymienia się m.in. wzrost stężenia reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*), tlenku azotu, jonów wapnia, szok termiczny i toksyny. Następuje otwarcie porów mitochondrialnych, tzw. megakanałów, co prowadzi do obniżenia potencjału transbłonowego, ograniczenia produkcji adenozyntrifosforanu (ATP) i wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórce do wartości milimolarnych. Zmianom tym towarzyszy wpływ z przestrzeni międzłonowej mitochondriów do cytozolu białek promujących śmierć komórkową, tj. cytochromu c, czynnika indukującego apoptozę (AIF, *apoptosis inducing factor*), prokaspaz-2, -3 i -9.

W regulację przekazu sygnałów apoptotycznych zaangażowane są liczne białka, które albo promują albo hamują śmierć komórkową. Kluczową rolę w regulacji apoptozy odgrywają białka z rodziny Bcl-2, które mają wpływ na hamowanie (Bcl-2/Bcl-X_L) lub indukowanie (Bax) uwalniania z mitochondriów czynników apoptotycznych.

W roku 2000 wykryto również nowy wewnętrzny szlak apoptotyczny, niezależny od sygnalizacji receptorowej czy mitochondriów. Zostaje on zapoczątkowany w siateczce śródplazmatycznej jako wynik stresu spowodowanego zniszczeniem homeostazy jonów Ca^{2+} i nagromadzeniem się nadmiaru białek.

Uruchomienie programu apoptozy w poznanych ścieżkach programowanej śmierci prowadzi zwykle do aktywacji i zniszczenia wielu białek komórkowych. Głównymi białkami odpowiedzialnymi za realizację nieodwracalnej fazy wykonawczej apoptozy

są proteazy cysteinowe – kaspazy. Są one syntetyzowane w formie prokaspaz, które podczas programowanej śmierci ulegają aktywacji do czynnych enzymów. Kaspazy można podzielić na trzy grupy: aktywatory cytokin związane ze stanami zapalnymi (kaspazy-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14), inicjatory (kaspazy-8, -9, -10) oraz efekторы fazy wykonawczej apoptozy (kaspazy-3, -6, -7) [18].

Wśród kierunków badawczych pojawiają się próby zastosowania zdobytej wiedzy o programowanej śmierci komórkowej do pobudzania tego procesu w przypadku chorych z osłabioną podatnością na sygnały śmierci (np. w wielu chorobach nowotworowych) lub zmniejszenia wrażliwości na apoptozę w komórkach zbyt łatwo umierających (np. w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych).

Witamina D₃ ma szerokie działanie obwodowe, jeśli chodzi o proces apoptozy. Wykazano, że po podaniu kalcytriolu (100 nM, 96 h) w komórkach nowotworowych piersi dochodzi do przemieszczania się proapoptotycznego białka Bax z cytozolu do mitochondrium, po czym następuje wypływ cytochromu c (co ciekawe dystrybucja cytochromu c z mitochondrium do cytozolu była obserwowana już po 48 h, gdy jeszcze nie zaszły zmiany morfologiczne). Obserwowano również jednoczesną translokację białka Bax i down-regulację (obniżenie stężenia) antyapoptotycznego białka Bcl-2 [26].

W przypadku komórek trzustki (komórki β wysepek Langerhansa) witamina D₃ hamuje zmiany wywołane prozapalnymi cytokinami IL-1β, interferonem IFN-γ i TNF-α, które stymulują syntezę syntazy tlenu azotu i tlenu azotu oraz zmniejszają potencjał błonowy mitochondrium. Stwierdzono, że kalcytriol indukuje wzrost antyapoptotycznego białka A20 [30].

Wykazano również, że kalcytriol może zwiększać przeżywalność ludzkich osteoblastów formujących kości poprzez zatrzymanie procesu apoptozy indukowanej staurosporyną. Jednak kalcytriol w sposób zależny od stężenia i czasu inkubacji może także indukować proces programowanej śmierci komórek – osteoblastów ludzkich, a także osteoblastów szczurzych [37].

Inni autorzy sugerują, że witamina D₃ i jej analogi mogą być skuteczne w profilaktyce raka jelita grubego, ponieważ w modelach zwierzęcych, wpływając na syntezę i działanie czynników wzrostu i cytokin, regulują cykl komórkowy, apoptozę i różnicowanie komórek nabłonka okrężnicy [14].

Opublikowane prace mówiące o roli witaminy D₃ w apoptozie w centralnym układzie nerwowym, wskazują, że kalcytriol może mieć działanie antyapoptotyczne, ponieważ:

- w przypadku apoptozy indukowanej jonami że-

laza (stres oksydacyjny) w komórkach noradrenergicznych miejsca sinawego (*locus coeruleus*) redukuje on poziom cytoplazmatycznego cytochromu c [6];

- w przypadku apoptozy indukowanej jonami cynku w substancji czarnej również redukuje on poziom cytoplazmatycznego cytochromu c oraz obniża peroksydację lipidów [22];
- w przypadku stwardnienia rozsianego ma działanie przeciwwzapalne [15].

Witamina D₃ w niektórych modelach wykazuje również działanie proapoptotyczne, które głównie związane jest z jej przeciwnowotworowymi efektami. Na przykład w linii komórkowej glejaka po 24-godzinnej inkubacji z 100 nM witaminą D₃, po 6 kolejnych dniach zaobserwowano apoptozę. W tym przypadku kalcytriol zwiększa ekspresję genów: c-myc, p53 oraz gadd 45, powoduje fragmentację DNA i kondensację chromatyny. Proces ten jest hamowany przez forskolinę – związek, który zwiększa poziom cAMP lub też genisteinę, która jest inhibitorem kinazy tyrozynowej [1].

Zgodnie z powyższymi danymi literaturowymi, opartymi na doświadczeniach *in vitro* oraz *in vivo*, witamina D₃, podobnie jak wiele innych, różnorodnych czynników, tak endogennych, jak i egzogennych, może indukować lub zapobiegać programowanej śmierci komórki. Podobnie te same związki zależnie od stężenia i czasu działania mogą wywoływać proces apoptozy lub proces nekrozy, a często te dwa procesy zachodzą na siebie i wyraźne ich rozdzielenie nie jest możliwe.

Wpływ kalcytriolu na proces nekrozy

Proces nekrozy, uznawany za przypadkowy, bierny, trwa kilka minut i dotyczy często dużych, zwartych grup komórek. Związany jest z zaburzeniem transportu jonowego poprzez błonę komórkową, spadkiem energii mitochondriów, uszkodzeniem błony komórkowej, obrzękiem i lizą komórek, której towarzyszy odczyn zapalny prowadzący do uszkodzenia otaczających tkanek. Proces ten przeważnie obejmuje zespoły komórek i nie wymaga energii. Zmiany w komórkach nekrotycznych dotyczą w pierwszej kolejności błony cytoplazmatycznej i utraty kontroli ciśnienia osmotycznego. Rozpad komórek poprzedzają zmiany morfologiczne, tj. rozszerzenie siateczki śródplazmatycznej, pęcznienie cytoplazmy. Utrata selektywnej przepuszczalności błony komórkowej powoduje napływ do wnętrza wody, jonów Ca²⁺ oraz Na⁺. Zwiększony poziom Ca²⁺ aktywuje nukleazy, które dokonują chaotycznego

cięcia DNA [18]. Destrukcja chromatyny przebiega w końcowym stadium zmian związanych z nekrozą. Powstałe produkty rozpadu komórki wywołują odpowiedź komórek należących do układu odpornościowego, tj. leukocytów, limfocytów, makrofagów oraz nasilają fagocytozę prowadzącą do usuwania pozostałości martwych komórek i tkanek.

Główną rolę w doprowadzeniu do śmierci neuronu na drodze nekrozy odgrywa wywołana różnymi czynnikami ekscytotoksyczność. Czynnikiem prowadzącym do niej jest nadmierna aktywacja receptorów glutaminianergicznych, szczególnie NMDA, indukująca wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Aktywacja zależnych od jonów wapnia wewnątrzkomórkowych lipaz, proteaz, lipidowych peroksydaz, endonukleaz, syntazy tlenu azotu, przy udziale wolnych rodników wywołuje zniszczenie białek strukturalnych, DNA i błony komórkowej neuronu. Zaburzenia mitochondrialnego metabolizmu komórkowego upośledzają funkcję błonowej Na^+/K^+ ATP-azy, prowadząc do usunięcia bloku magnezowego i wzmożonej wrażliwości receptorów NMDA na działanie agonistów [21].

W nawiązaniu do powyższych obserwacji, w licznych doświadczeniach *in vivo* oraz *in vitro* wykazano neuroprotektoryjny wpływ witaminy D_3 . Niskie (nanomolarne) stężenia tej witaminy chronią komórki hipokampalne przed toksycznymi efektami kwasu glutaminowego, a efekty te korelują z obniżeniem ekspresji podjednostek zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu L [3]. Inne prace wskazują, że witamina D_3 zwiększa poziom glutationu w komórce i zapobiega indukowanemu stresem oksydacyjnym lub kwasem glutaminowym uszkodzeniom neuronów dopaminergicznych [4, 16]. W przeciwieństwie do neuroprotektoryjnego działania w komórkach OUN, witamina D_3 nasila wywoływane nadtlaniem wodoru uszkodzenia monocytów [19], natomiast przy dłuższej inkubacji z nadtlaniem wodoru powoduje ona przyspieszenie śmierci keratynocytów [29].

Wpływ witaminy D_3 na układ immunologiczny

W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano działanie witaminy D_3 na układ odpornościowy. Wskazano na jej udział w różnicowaniu i dojrzewaniu komórek dendrytycznych, monocytów i makrofagów. Wykazano, iż u zwierząt doświadczalnych z niedoborem witaminy D_3 występuje większe ryzyko zachorowania na choroby infekcyjne [2, 12].

W limfocytach T stwierdzono obecność receptora nVDR i zaobserwowano zwiększoną ekspresję tego receptora w limfocytach poddawanych działaniu kal-

cytriolu. Natomiast w badaniach limfocytów krwi obwodowej wykazano hamujący wpływ witaminy D_3 na syntezę prozapalnych cytokin (IL-2 i interferon- γ) oraz stymulujący wpływ na produkcję cytokin przeciwzapalnych (IL-4 i TGF- β 1) [17].

Wykazano również, że witamina D_3 obniża syntezę indukowalnej syntazy tlenu azotu, co prowadzi do hamowania stanów zapalnych mózgu o podłożu autoimmunologicznym [10, 15].

Leczenie witaminą D_3 niesie ze sobą ryzyko niepożądanych efektów, np. hiperkalcemii. W badaniach prowadzonych przez nasz zespół witamina D_3 była zamknięta w nanocząsteczki i dodawana do hipokampalnych hodowli organotypowych w warunkach podstawowych i po traktowaniu lipopolisacharydem (LPS). Wykazano, że w skrawkach hipokampa traktowanych LPS nanocząsteczki zawierające witaminę D_3 mają zdolności ochronne. Nasze odkrycia podkreśliły, że neuroprotektoryjne działanie witaminy D_3 , zarówno w postaci wolnej, jak i nanocząsteczkowej, wydaje się być związane z hamowaniem uwalniania tlenu azotu indukowanego przez LPS [33].

Działanie niepożądane witaminy D_3

Zastosowanie aktywnej biologicznie formy witaminy D_3 – kalcytriolu jako substancji neuroprotektoryjnej wiąże się z podwyższeniem jej stężenia w organizmie powyżej poziomu fizjologicznego. Prowadzi to do występowania wielu istotnych działań niepożądanych, tj. hiperkalcemia oraz hiperkalcuria, powstawania zwapnień w narządach miękkich, co w skrajnych przypadkach może prowadzić do niedoczynności nerek. Konieczne jest więc monitorowanie leczenia, aby zapobiec przedawkowaniu [4].

Jedną z metod przeciwdziałania hiperkalcemii jest jednoczesne stosowanie z kalcytriolem leków z grupy bisfosfonianów (np. kłodronian, pamidronian, zoledromian), które zapobiegają demineralizacji kości oraz wiążą wapń w osoczu i w ten sposób ograniczają stężenie wapnia w narządach. [28].

Poważne działania niepożądane kalcytriolu były bodźcem do syntezy nowych analogów witaminy D_3 , które przy zachowaniu właściwości antyproliferacyjnych i różnicujących, a także neuroprotektoryjnych, nie będą wpływać lub wywierać słabe efekty na gospodarkę wapniową i nie powodować zwapnień w narządach miękkich.

Analogi witaminy D_3 i ich zastosowanie

Projektując i syntetyzując analogi naturalnego, aktywnego metabolitu witaminy D_3 – kalcytriolu,

dokonano subtelnych modyfikacji w jego budowie chemicznej, starając się zróżnicować profil jego aktywności biologicznej.

Analogi wykazują różne właściwości farmakokinetyczne, tj. powinowactwo do receptora nVDR, powinowactwo do białka transportowego VDBP (*vitamin D binding protein*) oraz szybkość metabolizowania przez enzymy cytochromu P450 [5].

Obecnie istnieje wiele analogów o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, które już zostały wprowadzone do leczenia lub znajdują się w fazie badań klinicznych i przedklinicznych. Większość z nich stosuje się w leczeniu chorób skórnych (łuszczyca), krzywicy, nadczynności przytarczyc, osteoporozy, natomiast bada się również skuteczność terapeutyczną analogów witaminy D₃ w przypadku nowotworów i chorób ośrodkowego układu nerwowego.

Zaprojektowano i zsyntetyzowano nowe analogi o strukturze chemicznej niezwykle zbliżonej do witaminy D₃ i będące jej izomerami geometrycznymi lub diastereoizomerami. Wszystkie te analogi zostały otrzymane na drodze syntezy konwergentnej, polegającej na otrzymaniu związków o bardzo podobnej budowie chemicznej do witaminy D₃, ale o innych właściwościach biologicznych. Na podstawie dotychczas poznanych zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną można oczekiwać, że nowe związki zachowają właściwości neuroprotektoryjne aktywnej formy witaminy D₃ oraz wykażą korzystnie obniżoną aktywność wapniową. Stworzy to podstawy do ich potencjalnego zastosowania klinicznego. Wykazano, że w centralnym układzie nerwowym witamina D₃ i jej niektóre analogi aktywują receptor nVDR. Jednak stwierdzono, że analogi kalcytriolu stymulują syntezę NGF niezależnie od ich powinowactwa do receptorów dla witaminy D (nVDR), co stwarza możliwość uzyskania substancji działającej neuroprotektoryjnie [28].

Podsumowanie

Witamina D₃ cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem wśród naukowców. Obecnie wiadomo, że kalcytriol należy raczej do hormonów niż do witamin. Odkrycie jego działania na gospodarkę wapniowo-fosforanową było pierwszym krokiem do poznania jego wpływu na komórki i tkanki ustroju. Witamina D₃ uczestniczy w procesach nadzorujących proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek organizmu. Obecnie ma zastosowanie w leczeniu krzywicy, chorób skóry (pewnych odmian łuszczyca), osteoporozy oraz nerkopochodnej osteodystrofii. Ma również wpływ na tkanki niezwiązane z homeostazą wapi-

wo-fosforanową, tj. komórki krwi, gonad i gruczołu piersiowego oraz komórki Malpighiego skóry.

Znalezienie substancji o silnym ochronnym działaniu na komórki nerwowe, a pozbawionej istotnych działań niepożądanych, jest ważnym zadaniem współczesnej medycyny. W związku ze zwiększającą się długością życia ludzkiego choroby o podłożu neurodegeneracyjnym występują z coraz większym nasileniem, a obecnie używane leki mogą łagodzić objawy chorobowe, natomiast nie ma leku skutecznie zatrzymującego procesy zwyrodnieniowe neuronów, a więc działającego przyczynowo. Z dotychczasowych danych literaturowych wiadomo, że aktywna forma witaminy D₃ – kalcytriol, wykazuje działanie neuroprotektoryjne w układach *in vivo* i *in vitro*, jednak ze względu na jej wpływ na gospodarkę wapniową nie może być brana pod uwagę jako potencjalny lek neuroprotektoryjny.

Dotychczasowe dane literaturowe oparte na wieloletnich badaniach prowadzonych w modelach *in vitro* oraz *in vivo* sugerują, że pochodne aktywnej formy witaminy D₃ – kalcytriolu, o minimalnym wpływie na gospodarkę wapniowo-fosforanową w organizmie, mogłyby również stać się nową grupą potencjalnych leków neuroprotektoryjnych, zapobiegających uszkodzeniom komórek nerwowych w chorobach neurodegeneracyjnych o różnej etiologii lub będących następstwem niedokrwienia, urazów mechanicznych, hipoglikemii lub stanów padaczkowych, ponieważ:

- Hamują *in vitro* uszkodzenia komórek nerwowych indukowane różnymi czynnikami toksycznymi [35];
- Chronią neurony i zmniejszają deficyt neurologiczny w doświadczalnym udarze mózgu u zwierząt;
- Zwiększają aktywność acetylotransferazy cholinowej;
- Podane obwodowo, przenikają przez barierę krew-mózg i stymulują syntezę, zwiększających przeżywalność komórek nerwowych oraz czynników troficznych takich jak NGF, GDNF czy neurotrofina 3 i 4 [34];
- Stymulują syntezę glutationu;
- Obniżają syntezę cytokin prozapalnych i indukują syntezę tlenu azotu;
- Obniżają syntezę napięciowo-zależnych kanałów wapniowych typu L.

Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na szeroki zakres działania „witaminy słońca” na ludzki organizm. Jest to działanie neuroprotektoryjne, antyproliferacyjne i immunomodulujące. Przez to tak ważna jest odpowiednia suplementacja witaminy D₃,

która może skutecznie obniżać ryzyko zachorowań na cukrzycę typu I, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory i choroby zwyrodnieniowe OUN.

Bibliografia

1. Baudet C., Perret E., Delpech B., Kaghad M., Brachet P., Wion D., Caput D. (1998) Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program. *Cell Death and Differentiation*, 5: 116-125.
2. Bouillon R., Okumara W.H., Norman A.W. (1995) Structure-function relationship in the vitamin D endocrine system. *Endocrine Reviews*, 16: 200-257.
3. Brewer L.D., Thibault V., Chen K.C., Langub M.C., Landfield P.W., Porter N.M. (2001) Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *Journal of Neurosciences*, 21: 98-108.
4. Brook C., Marshall N. (2000) Regulacja metabolizmu wapnia. [w] *Podstawy endokrynologii*. E. Otto Buczkowska (red.) Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław: 119-136.
5. Brown A.J. (2001) Therapeutic uses of vitamin D analogues. *American Journal of Kidney Diseases*, 38: 3-19.
6. Chen K.B., Lin A.M., Chiu T.H. (2003) Systemic vitamin D₃ attenuated oxidative injuries in the locus coeruleus of rat brain. *Annals New York Academy of Sciences*, 993, 313-324.
7. Cui X., Gooch H., Petty A., McGrath J.J., Eyles D. (2017) Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Molecular Cell Endocrinology*, 453: 131-143.
8. Eyles D., Brown J., Mackay-Sim A., McGrath J., Feron F. (2003) Vitamin D₃ and brain development. *Neuroscience*, 118: 641-653.
9. Eyles D.W., Smith S., Kinobe R., Hewison M., McGrath J.J. (2005) Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29: 21-30.
10. Garcion E., Nataf S., Berod A., Darcy F., Brachet P. (1997) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Molecular Brain Research*, 45: 255-267.
11. Garcioni E., Wion-Barbot N., Montero-Menei C.N., Berger F., Wion D. (2002) New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13: 100-105.
12. Gurlek A., Pittelkow M.R., Kumar R. (2002) Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: Implications in cell growth and differentiation. *Endocrine Reviews*, 23: 763-786.
13. Hahn M., Lorez H., Fischer G. (1997) Effect of calcitriol in combination with corticosterone, interleukin-1 β , and transforming growth factor- β 1 on nerve growth factor secretion in an astroglial cell line. *Journal of Neurochemistry*, 69: 102-109.
14. Harris D.M., Go V.L. (2004) Vitamin D and colon carcinogenesis. *Journal of Nutrition*, 134: 3463-3471.
15. Hayes C.E. (2000) Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59: 531-535.
16. Ibi M., Sawada H., Nakanishi M., Kume T., Hatsuki H., Kaneko S., Shimohama S., Akaike A. (2001) Protective effects of 1 α ,25-(OH)₂D₃ against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology*, 40: 761-771.
17. Jorgesen H.L., Scholler J., Sand J.C., Bjuring M., Hassager C., Christiansen C. (1996) Relation of common allelic variation at vitamin D receptor locus to bone mineral density and postmenopausal bone mass: Cross sectional and longitudinal population study. *BMJ*, 313: 586-590.
18. Kłyszczko-Stefanowicz L. (2002) Apoptoza organizmów zwierzęcych. [w] *Cytobiochemia: Biochemia niektórych struktur komórkowych*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa: 772-814.
19. Krane S.M., Polla B.S., Bonventre J.V. (1990) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the toxicity of hydrogen peroxide: the role of calcium and heat shock. *Experimental Gerontology*, 25: 239-245.
20. Landfield P.W., Cadwallader-Neal L. (1998) Long-term treatment with calcitriol (1,25(OH)₂ vitD₃) retards a biomarker of hippocampal aging in rats. *Neurobiology Aging*, 19: 469-477.
21. Lasoń W. (2003) Endogenne substancje neuroprotektoryjne o budowie steroidowej. *Neuroprotekcja*, XX Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany, Śmiałowska M. (red.), 188-195.

22. Lin A.M., Chen K.B., Chao P.L. (2005) Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Annals New York Academy of Sciences*, 1053: 319-329.
23. McGrath J.J., Feron F.P., Burne T.H., Mackay-Sim A., Eyles D.W. (2004) Vitamin D3-implications for brain development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89-90: 557-560.
24. Mehta R.G., Mehta R.R. (2002) Vitamin D and cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 252-264.
25. Mróz P., Młynarczuk I. (2003) Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Postępy Biologii Komórki*, 30, 1: 113-128.
26. Narvaez C.J., Welsh J. (2001) Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Biology and Chemistry*, 276: 9101-9107.
27. Neveu I., Neveilhan P., Baudet C., Brachet P., Metsis M. (1994) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport*, 6: 124-126.
28. Pełczyńska M., Jaroszewicz I., Świtalska M., Opolski A. (2005) Właściwości biologiczne kalcytriolu i jego nowych analogów – potencjalne zastosowania terapeutyczne. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 59: 129-139.
29. Piotrowska A., Wierzbicka J., Ślebioda T., Woźniak M., Tuckey R.C., Słominski A.T., Żmijewski M.A. (2016) Vitamin D derivatives enhance cytotoxic effects of H₂O₂ or cisplatin on human keratinocytes. *Steroids*, 110: 49-61.
30. Riacy R., Vandewalle B., Conte J., Moermann E., Sacchetti P., Lukowiak B., Gmyr V., Bouckennooghe T., Dubois M., Pattou F. (2002) 1,25 – dihydroxyvitamin D₃ protects RINm5F and human islet cells against cytokine-induced apoptosis: implication of the antiapoptotic protein A20. *Endocrinology*, 143: 4809-4819.
31. Rupniewska Z., Bojarska-Junak A. (2004) Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 58: 538-547.
32. Sanchez B., Relova J.L., Gallego R., Ben-Batalla I., Perez-Fernandez R. (2009) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. *Journal of Neuroscience Research*, 87: 723-732.
33. Ślusarczyk J., Piotrowski M., Szczepanowicz K., Regulska M., Leśkiewicz M., Warszyński P., Budziszewska B., Lasoń W., Basta-Kaim A. (2016) Nanocapsules with polyelectrolyte shell as a platform for 1,25-dihydroxyvitamin D3 neuroprotection: Study in organotypic hippocampal slices. *Neurotoxicity Research*, 30: 581-592.
34. Tetich M., Dziedzicka-Wasylewska M., Kuśmider M., Kutner A., Leśkiewicz M., Jaworska-Feil L., Budziszewska B., Kubera M., Myint A.M., Basta-Kaim A., Skowroński M., Lasoń W. (2005) Effects of PRI-2191--a low-calcemic analog of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the seizure-induced changes in brain gene expression and immune system activity in the rat. *Brain Research*, 1039: 1-13.
35. Tetich M., Kutner A., Leskiewicz M., Budziszewska B., Lasoń W. (2004) Neuroprotective effects of (24R)-1,24-dihydroxycholecalciferol in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89-90: 365-370.
36. Veenstra T.D., Fahnenstock M., Kumar R. (1998) An AP-1 site in the Nerve Growth Factor promoter is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ –mediated Nerve Growth Factor expression in osteoblast. *Biochemistry*, 37: 5988-5994.
37. Witasp E., Gustafsson A.C., Cotgreave I., Lind M., Fadeel B. (2005) Vitamin D fails to prevent serum starvation – or staurosporine – induced apoptosis in human and rat osteosarcoma – derved cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 891-897.
38. Xu Y., Hashizume T., Shuhart M.C., Davis C.L., Nelson W.L., Sakaki T., Kalhorn T.F., Watkins P.B., Schuetz E.G., Thummel K.E. (2006) Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications for drug-induced osteomalacia. *Molecularr Pharmacology*, 69: 56-65.