

Vitamin D ve vztahu ke karcinomu hlavy a krku

David Kalfeřt¹, Marie Ludvíková², Martin Pešta², Ondřej Topolčan³

¹ Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku LF UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Viktor Chrobok, CSc., Ph.D.

² Ústav biologie LF UK Plzeň, vedoucí RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

³ Laboratoř imunochemické diagnostiky, oddělení nukleární medicíny LF UK a FN Plzeň, vedoucí prof. MUDr. Ondřej Topolčan, DrSc.

Souhrn

V poslední době bylo popsáno protinádorové působení vitaminu D a jeho možné terapeutické využití v prevenci a léčbě různých maligních nádorů. Dlaždicový karcinom hlavy a krku (HNSCC) je 6. nejčastěji se vyskytujícím nádorem na světě. Většinou se vyznačuje špatnou prognózou. Ve snaze zlepšit léčbu se současný výzkum zaměřuje zejména na rozšíření poznatků o etiologii a patobiologii nádorů hlavy a krku. Tato skutečnost nás vedla ke shrnutí současných vědeckých poznatků o etiopatogenetické a terapeutické roli vitaminu D v HNSCC a k upozornění na další možné směry výzkumu v této zajímavé a pro klinickou praxi důležité oblasti.

Klíčová slova: dlaždicový karcinom hlavy a krku – protinádorové účinky – vitamin D

Vitamin D in relation to head and neck cancer

Summary

Vitamin D was lately introduced as the important anti-cancer agent with therapeutic potential to be used in prevention and therapy of malignant tumors. Head and neck squamous cell cancer (HNSCC) is the sixth most common cancer in the world. Prognosis of this cancer is in most patients poor. In attempts to improve therapy of this cancer, contemporary research is focused on extension of the etiological and pathobiological aspects of cancerogenesis of HNSCC. This fact provoked us to summarize present scientific knowledge about etiopathological, chemopreventive and therapeutic role of vitamin D in head and neck squamous cancer and outline the direction of further research in this interesting and from clinical point of view important field.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma – anti-tumor effect – vitamin D

Úvod

Vitamin D hraje významnou roli nejen v kostním metabolismu, ale nedostatek vitaminu D se uplatňuje při vzniku a rozvoji řady chorob, zejména kardiovaskulárních, endokrinních, metabolických, imunitně podmíněných a infekčních [1]. V poslední době je v popředí zájmu vztah vitaminu D k etiopatogenezi a prognóze nádorů [2]. Cílem naší rešeršní práce je shrnout současné poznatky o roli vitaminu D při vzniku a rozvoji zhoubných nádorů hlavy a krku a o možnostech využití vitaminu D pro prevenci nádorového onemocnění a optimalizaci léčby.

Problematika nádorů hlavy a krku

Epidemiologie

Nádory hlavy a krku zahrnují tumory dutiny ústní, nosní a vedlejších nosních dutin, hltanu (nazofaryngu, orofaryngu a hypofaryngu), laryngu, ucha, štítné žlázy a slinných žláz. Většinou vyrůstají z epitelu v oblasti horní části dýchacího a trávicího traktu. Malignity uvedených lokalit představují asi 6 % všech zhoubných nádorů.

Nejčastějšími maligními nádory hlavy a krku jsou karcinomy, z nichž téměř 90 % (vyjma karcinomu štítné žlázy a slinných žláz) tvoří karcinom dlaždicový neboli spinocelulární, keratinizující i nekeratinizující (HNSCC – head and neck squamous cell carcinoma). HNSCC se nejčastěji vyskytují v dutině ústní, orofaryngu a laryngu. Podle lokalizace se mohou lišit jejich epidemiologie, demografický výskyt, patologický obraz i klinická manifestace [3,4]. Epidemiologie HNSCC výrazně závisí na geografické oblasti, na pohlaví pacienta a lokalizaci karcinomu. Nejvyšší incidence laryngeálního karcinomu je v Brazílii, Indii, Španělsku, Itálii a Francii, naopak nejnižší je v Japonsku, Švédsku, Norsku a Anglii. Karcinomy dutiny ústní a orofaryngu mají vyšší incidenci v rozvojových zemích. Výskyt HNSCC u žen je asi 3krát nižší než u mužů [4]. Zastoupení těchto nádorů v České republice odpovídá evropskému průměru. V roce 2010 byla v České republice incidence karcinomu laryngu (diagnóza MKN-10: C32) 9,4/100 000 mužů a 1,2/100 000 žen a incidence karcinomu dutiny ústní a hltanu (diagnóza MKN-10: C00-C14) 19,5/100 000 mužů a 6,7/100 000 žen. V poslední

době je v našich zeměpisných šířkách tendence k nárůstu incidence nádorů orofaryngu a hypofaryngu, zatímco u nádorů laryngu incidence stagnuje [5].

Etiologie a patogeneze

Nejznámějšími tradičními rizikovými faktory vzniku těchto nádorů ve většině lokalit jsou kouření, konzumace alkoholu a infekce lidským papilomavirem (human papillomavirus – HPV). Kouření a alkohol se uplatňují především u nádorů laryngu, virová infekce u nádorů dutiny ústní a orofaryngu [4]. Kancerogeny obsažené v cigaretovém kouři působí alterace DNA a vyvolávají zejména mutace v genu TP53. Další geny, jejichž mutace se často podílejí na patogenезi HPV-negativních HNSCC, jsou onkogeny CCND1 (kódující cyklin D1) a EGFR (kódující receptor pro epidermální růstový faktor) a tumor-supresorový gen CDKN2A (kódující inhibitor buněčného cyklu p16). Vysoce rizikové HPV podtypy 16 a 18 produkují v buňce časné virové onkoproteiny E6 a E7. Protein E6 vede k degradaci proteinu p53, a proto buňka není schopna zajišťovat opravy DNA, což vyústí v její genomickou nestabilitu. Protein E7 inaktivuje protein pRB, což vede k pokračování buněčného cyklu a vstupu do S fáze [6].

Rozvoj dlaždicových karcinomů hlavy a krku je víceúrovňový proces spočívající v narušení základních regulačních mechanismů v buňce, což má za následek její nekontrolovatelné množení a nádorovou transformaci. Invazivní HNSCC většinou vzniká na podkladě prekurzorových lézí (dysplazie dlaždicového epitelu) a následného carcinoma in situ (CIS). S uvedenými morfologickými změnami úzce korespondují změny molekulární, které jsou považovány za hlavní podstatu nádorové transformace buňky. Jsou to především genetické změny (mutace) spočívající v narušení sekvence DNA. V poslední době bylo popsáno několik dalších patobiologických fenoménů (epigenetické změny, RNA-interference, epiteliálně mezenchymální tranziční a nádorové kmenové buňky), které mohou vedle genetických změn významně přispívat k nádorové transformaci a ovlivňovat tak fenotyp nádoru, jeho chování a progresi a mohou být východiskem pro nové, personalizované směry nádorové terapie [1,7]. Vzácně může maligní transformace vznikat v morfologicky normálním epitelu [6].

Prognóza

HNSCC mají velmi variabilní, často nepříznivé chování. Navzdory pokrokům v diagnostice a léčbě dlaždicového karcinomu hlavy a krku se přežití pacientů s těmito nádory změnilo v poslední době jen nevýznamně. Ve většině studií HNSCC nejsou rozlišeny jednotlivé anatomické lokality nádorů, ačkoliv chování těchto nádorů se může značně lišit, což souvisí s nestejnou kancerogenezí a různými vlastnostmi nádorů v jednotlivých lokalitách [8]. HPV pozitivní karcinomy orofaryngu bez souvislosti s kouřením a konzumací alkoholu se jeví jako prognosticky příznivější [4]. K nepříznivé prognóze HNSCC přispívají pokročilost nádoru v době

diagnózy, časté recidivy a rozvoj druhotných primárních nádorů. Z uvedených důvodů je velice žádoucí hledat další vhodné léčebné přístupy.

Zaměření současného výzkumu

V současné době se věnuje velká pozornost studiu faktorů uplatňujících se v etiopatogenezi HNSCC s cílem jejich následného využití v rutinní klinické praxi [1]. Jedním z těchto faktorů je vitamin D, který plní důležité protinádorové funkce, pokud je jeho hladina v referenčních rozmezích. Při jeho nízkých sérových hladinách naopak dochází ke vzniku a progresi nádoru [2]. Etiopatogenetický vztah mezi vitaminem D a HNSCC byl dosud studován jen v dílčích aspektech [9,10]. Detailní znalost vlivu deficiencie vitaminu D, případně jeho abnormálního metabolismu a abnormální signalizace na vznik a rozvoj HNSCC, by mohla přispět k využití této modalitě nejen v prevenci, ale i v terapii zhoubných nádorů hlavy a krku.

Vitamin D – poznámky k vybraným fyziologickým aspektům

Variety vitaminu D a jeho zdroje

Vitamin D se vyskytuje ve 2 formách, a to vitamin D₂ (ergokalciferol) a D₃ (cholecalciferol), jejichž metabolismus i následné fyziologické účinky na lidský organizmus jsou podobné a označení vitamin D se tedy souhrnně používá pro obě formy. Zdrojem vitaminu D je jak potrava (obsahující jeho neaktivní prekurzory), tak vlastní produkce v kůži působením slunečního UV záření. Z tohoto aspektu lze na vitamin D pohlížet jednak jako na skutečný vitamin získávaný z potravy, jednak jako na endogenně produkováný hormon. Po chemické stránce patří vitamin D mezi sekosteroidy [2,11,12].

Syntéza

Většina vitaminu D je produkována neenzymovou fotolytickou reakcí v epidermis kůže vlivem slunečního záření typu UV-B z 7-dehydrocholesterolu (previtamin D), což je přirozený meziprodukt syntézy cholesterolu. Tímto vzniká nejprve previtamin D₃ a následně pomalou tepelnou přeměnou vitamin D₃ (7-dehydrocholecalciferol), který je dále transportován krví. Dlouhodobá expozice UV-B nevede k intoxikaci vitaminem D, nýbrž vlivem autoregulačních mechanismů vyvolává přeměnu previtaminu D a vitaminu D na inaktivní degradační produkty [2]. Produkce vitaminu D v kůži pod vlivem UV-B záření je výrazně snížena ve vyšším věku jednak v důsledku snížené koncentrace 7-dehydrocholesterolu v epidermis, jednak následkem nižší účinnosti syntézy previtaminu D₃ [13]. Tento zdroj vitaminu D tak ztrácí u gerontů na významu.

Metabolismus

Biologicky aktivní produkty vznikají z obou neaktivních forem vitaminu D (cholecalciferolu i ergokalciferolu) dvoukolovou hydroxylací. Místem aktivace vitaminu D jsou játra a ledviny. V játrech při prvním kroku

aktivace vzniká účinkem mikrozomálních a mitochondriálních enzymů cytochrom P450-vitamin D-25-hydroxyláz (CYP2R1, CYP27A1) produkt 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D; kalcidiol]. Předpokládá se, že jeho koncentrace v krevním séru nejlépe odráží stav metabolismu vitaminu D v těle (to znamená jak endogenní produkci, tak i příjem vitaminu D do organismu). K přeměně 25(OH)D na aktivní metabolit 1,25(OH)2D (kalcitriol) dochází především v proximálních tubulech ledvin, dále i v lymfatické tkáni, pankreatu, prostatě, mléčné žláze, placentě apod [2]. Kalcidiol je hydroxylován účinkem mitochondriálních cytochrom-P450-1- α hydroxylázy (CYP27B1).

Transport

Transport všech forem vitaminu D v krvi je zprostředkován převážně vitamin D vázajícím proteinem (vitamin D binding protein – DBP), v menší míře se na přepravě podílejí i albumin a lipoproteiny. DBP váže a transportuje v krvi vitamin D a jeho metabolity k cílovým orgánům. Tento transportní protein má vysokou afinitu k neaktivním formám vitaminu D, zatímco aktivní metabolit 1,25(OH)₂, vznikající především v cílových tkáních, je transportován v krvi minimálně a je vázán slabě, což usnadňuje jeho biologické aktivity a vazbu na receptor vitaminu D [2,14].

Metabolismus a transport vitaminu D závisí na odpovídající produkci a správné funkci enzymů a transportních proteinů, jak je uvedeno výše. Zásadní roli v metabolismu vitaminu D hrají játra, a proto jsou primární jaterní poruchy nejčastější příčinou abnormálního metabolismu vitaminu D. Polymorfizmy v genech pro metabolismus a transport vitaminu D mohou způsobovat interindividuální rozdíly ve stavu metabolismu vitaminu D [2].

Receptor VDR

Účinky kalcitriolu jsou v organismu zprostředkovány receptorem pro vitamin D (VDR), který se vyznačuje podobností s receptory pro steroidní a tyreoidální hormony. Vitamin D jako sekosteroid působí tedy intracelulárně, kde se nachází a má jaderný receptor v cílových tkáních. Receptor pro vitamin D je kódován genem VDR, který je umístěn na dlouhém raménku 12. chromozomu, má velikost kolem 75 kb a obsahuje 8 exonů (exony 2–9) kódujících protein a 3'UTR (netranslatovatelná oblast). Rozsáhlá promotorová oblast VDR genu podporuje tvorbu mnohotných tkáňově specifických transkriptů. Tento gen je exprimován v buňkách

různých lidských tkání, nejen ve tkáních souvisejících s metabolismem kostních minerálů [15].

Komplex VDR-1 a 25-hydroxyvitaminu D se váže s volným receptorem RXRa (Retinoid X Receptor α) a vytváří heterodimer, který vstupuje do jádra, v němž působí jako ligandem aktivovaný transkripční faktor. Tento komplex se váže ke specifické sekvenci promotorové DNA (tzv. vitamin D response elements – VDREs) cílových genů, čímž reguluje (zvyšuje nebo snižuje) jejich transkripci. Tímto způsobem řídí vitamin D kalciovou homeostázu a plní další důležité fyziologické nekalcemické funkce, z nichž významné jsou zejména antiproliferační a prodiferenční účinky vitaminu D [2,11,12,16–18]. V současné době je známo více než 500 genů regulovaných prostřednictvím vitaminu D a jeho VDR [15]. Kromě přímé regulace genové transkripce může vitamin D v důsledku strukturální flexibility rychle aktivovat klasické signální kaskády s receptory na plazmatické membráně, které ovlivňují buněčný růst [2]. Toto působení vitaminu D se označuje jako negenomické, neboť není realizováno přímou regulací genové transkripce.

Polymorfizmy VDR genu

V genu VDR se mohou vyskytovat variace, které zahrnují jednak mutace, jednak polymorfizmy. Mutace jsou odpovědné za vzácná dědičná onemocnění, jako je vrozená rezistence k vitaminu D, která může být jednou z příčin křivice. Polymorfizmy jsou genetické varianty (změny v sekvenci DNA) postihující nejméně 1 % populace. V populaci existuje řada polymorfizmů VDR genu, které mohou být přítomny v nekódující (promotor, introny) i kódující části VDR genu. Jejich důsledkem jsou pak většinou změny množství i struktury produkováného proteinu [15]. V současné době se zaměřuje pozornost na vztah jednotlivých polymorfizmů VDR genu k různým chorobám (osteoporóza, choroby imunitního systému, nádory apod). U nádorů se analyzují polymorfizmy z hlediska jejich vztahu k riziku nebo prognóze nádorů. Přehled vybraných nejčastější studovaných polymorfizmů VDR genu s funkčními důsledky uvádí tab. 1 [19]. Většinou se jedná o jednonukleotidové polymorfizmy [20]. Jejich názvy jsou zpravidla odvozeny od restriktačních enzymů používaných k jejich detekci metodou polymorfizmu délky restrikčních fragmentů (RFLP) [15]. Dosud bylo popsáno v lidském VDR genu více než 470 polymorfizmů, avšak pouze u malého počtu z nich byly prokázány funkční důsledky a vztah ke vzniku či rozvoji chorobných stavů [12,15].

Tab. 1. Přehled nejčastěji studovaných polymorfizmů genu VDR; upraveno podle [20]

polymorfizmus VDR genu	databáze SNP	lokalizace v genu VDR	funkční efekt
Taq1	rs731236	exon 9, kodon 352	vliv na hladinu aktivního vitaminu D
Apa1	rs7975232	intron 8	vliv na stabilitu mRNA
Bsm1	rs15444410	intron 8	vliv na stabilitu mRNA
Fok1	rs10735810	exon 2 (5' pozice)	generuje start kodon (C→T) – delší protein – nižší transkripční aktivita

Hladiny vitaminu D

Jak již bylo zmíněno výše, 25(OH)D (kalcidiol) je vhodným klinickým ukazatelem stavu vitaminu D v organismu. Sérové hladiny kalcidiolu jsou udávány v referenčním rozmezí 50–250 nmol/l (20–80 ng/ml), přičemž obecná shoda ohledně dolní hranice referenčního rozmezí prozatím neexistuje. Endocrine Society uvádí ve svých doporučeních referenční rozmezí sérových hladin 25(OH)D (vitamin D status) 75–250 nmol/l (30–80 ng/ml), zatímco další organizace Institute of Medicine (IOM), součást The National Academy of Sciences USA, za minimální normální hladiny považuje 50 nmol/l [21,22]. Hladiny nižší než 50 nmol/l (20 ng/ml) jsou označovány jako deficiencie vitaminu D, při které dochází k poruchám remodelace kosti i k poruchám ostatních pochodů, do nichž vitamin D zasahuje. Dle Endocrine Society jsou dále určeny suboptimální hladiny (insuficience) vitaminu D, a to v rozmezí 52,5–72,5 nmol/l. Insuficience vitaminu D jsou definovány jako biochemický deficit vitaminu D bez zřejmých klinických známek či symptomů jako křivice nebo osteomalacie [21]. IOM tuto kategorii nezmiňuje [22]. Srovnání hodnocení statusu vitaminu D podle Endocrine Society a IOM uvádí **tab. 2**. Nejednotný pohled na abnormální hodnoty koncentrace sérového 25(OH)D může vést k nadhodnocení výskytu deficitu vitaminu D v populaci [22]. Výskyt vitaminu D v organismu je ovlivňován výkyvy v expozici ultrafialovému (UV-B) záření, které souvisí se zeměpisnou šířkou, s ročními obdobími a s atmosférickým znečištěním [9,23]. Většina populace obyvatel středního zeměpisného pásu trpí subklinickým nedostatkem vitaminu D, a proto se stává prvořadou otázkou dostatečného přívodu vitaminu D. Doporučované udržovací denní dávky k udržení normálních hladin nebo ke zvýšení nad 75 nmol/l se pohybují v rozmezí 400–2 000 mezinárodních jednotek/den (IU/d; IU = 25 ng) v závislosti na věku, pohlaví, graviditě, laktaci, zdravotním stavu a stavu expozice slunečnímu záření [1,21]. Rovněž v otázce suplementace populace vitaminem D existuje nejednotnost mezi Endocrine Society a IOM, podle nichž jsou dávky doporučené IOM nižší a pohybují se na dolní hranici uvedeného rozmezí [22,24].

Vitamin D – vztah k etiopatogenezi, patobiologii a prognóze HNSCC

Na rozdíl od nádorů jiných lokalit byl vztah vitaminu D ke vzniku a progresi HNSCC dosud studován pouze sporadicky. V následujícím textu jsou shrnuty publikované výsledky a současné poznatky.

Sérové hladiny 25-hydroxyvitaminu D a HNSCC

Většina prací z posledních 10 let dává do souvislosti nízké sérové hladiny vitaminu D s vyšším rizikem vzniku nádorů [2]. Sérové hladiny vitaminu D byly u pacientů s nádory rovněž zkoumány ve vztahu k prognóze onemocnění. Bylo prokázáno, že vyšší sérové koncentrace vitaminu D statisticky významně souvisejí s příznivějším klinickým průběhem některých nádorů, např. prsu, střeva, prostaty, plic a jícnu, a naopak nižší hladiny vitaminu D s horší prognózou nádorů [25–29]. U nádorů hlavy a krku jsou publikované závěry poněkud nejednotné. Někteří autoři referovali o nalezení souvislosti mezi nízkými sérovými hladinami vitaminu D a vyšší incidencí a mortalitou HNSCC [10,29,30], jiní autoři žádný vztah mezi sérovou hladinou vitaminu D a rizikem vzniku nebo prognózou těchto nádorů nepotvrdili [9,31].

Velká část dlaždicových karcinomů hlavy a krku se vyskytuje u kuřáků. Epidemiologické studie, které analyzovaly sérové hladiny 25-hydroxyvitaminu D u pacientů s nádory vzniklými na podkladě kouření, prokázaly spojitost mezi nižší sérovou koncentrací vitaminu D a vyšším rizikem rozvoje těchto nádorů včetně HNSCC [32]. Předpokládá se, že zplodiny kouření vedou k redukci sérové koncentrace vitaminu D, a tím ke snížení antineoplastických aktivit, a zároveň zvyšují citlivost buněk k tabákovým kancerogenům [33]. Naopak Arem et al nepotvrdili souvislost mezi sérovými hladinami 25-hydroxyvitaminu D a rizikem vzniku rakoviny orofaryngu a laryngu u finských mužů kuřáků. Ve studii byl zjištěn nízký medián sérové hladiny D vitaminu u skupiny nemocných s nádorovým onemocněním, ale při podrobné analýze sérových hladin vitaminu D adjustovaných na věk, pohlaví a roční období, nebyly nalezeny statistické souvislosti mezi statusem vitaminu D a rizikem vzniku HNSCC [31].

Polymorfizmy v genech pro vitamin D ve vztahu k HNSCC

Polymorfizmy v genech pro metabolismus, transport a receptor vitaminu D mohou přispívat k variabilitě jeho sérových hladin, a tím modifikovat riziko vzniku nádoru nebo prognózu již stávajících nádorů [27]. Tímto je možné vysvětlit některé nejednoznačnosti a rozdílné výsledky při analýze vztahu mezi statusem vitaminu D a nádory [34,35].

Nejvýznamnější genetické sekvenční odchylky v genech odpovědných za metabolismus a transport se vyskytují v genu GC pro plazmatický transportní protein vitaminu D a v genech pro cytochrom P450 v játrech

Tab. 2. Srovnání statusu vitaminu D podle doporučení Endocrine Society a IOM [21,22]

doporučení podle	status vitaminu D nmol/l (ng/ml)		
	normální	deficience	suboptimální
Endocrine Society	75–250 nmol/l (30–80 ng/ml)	< 50 nmol/l (20 ng/ml)	52,5–72,5 nmol/l
IOM	50 nmol/l (20 ng/ml)	< 50 nmol/l (20 ng/ml)	neurčeno

(enzymy CYP27A1, CYP2R1) a v ledvinách (enzymy CYP27B1 a CYP24A1). Uvedené proteiny mají rozhodující význam pro metabolismus vitamínu D a jejich genetické odchylky mohou být významně asociované s nízkými hladinami vitamínu D. Ve studii provedené u pacientů s HNSCC bylo prokázáno, že jednonukleotidové polymorfizmy (rs4588, rs7041) v genu GC pro transportní protein a některé haplotypy jsou signifikantně spojené se sníženou sérovou koncentrací vitamínu D, zatímco různé genetické odchylky v genech pro metabolismus vitamínu D variabilně ovlivňují prognózu těchto nádorů regulací různých signálních cest a mohou též souviset se vznikem druhých primárních nádorů (zejména karcinomu plic) [14].

Effekt vitamínu D na genovou expresi cílových genů je zprostředkován VDR. U nádorových buněk je situace komplikovanější, neboť exprese VDR může být pozměněná. Jak bylo prokázáno, absence nebo nízká exprese VDR může významně korelovat s prognózou [17]. Největší pozornost je však soustředěna na polymorfizmy genu pro jaderný receptor vitamínu D (VDR) [36,37]. V populaci existuje celá řada variant (polymorfizmů) VDR genu v oblastech kódujících i nekódujících, které mohou vyústit ve změny množství i struktury proteinu [15]. V poslední době se zkoumá vliv polymorfizmů genu pro VDR na funkci vitamínu D zejména ve vztahu k nádorovým onemocněním. Je známo, že polymorfizmy VDR mohou být odpovědné za změny v aktivaci genů regulovaných tímto receptorem. Tím je ovlivněn nejen kalciový metabolismus, ale též řada signálních drah účastnících se zejména v antikancerogenním působení vitamínu D. Většina prací se dosud zaměřovala na analýzu vztahu mezi polymorfizmy genu pro VDR a rizikem vzniku a progresi nádorů prsu, prostaty a tlustého střeva. Publikované výsledky jsou však nejednotné [15]. V dlaždicových karcinomech hlavy a krku se výzkum polymorfizmu VDR genu zaměřuje na odhalení souvislosti mezi různými typy polymorfizmů a incidencí a prognózou nádorů. Polymorfizmy genu VDR jsou RFLP polymorfizmy, z nichž Fok 1 a Taq 1 jsou nejčastěji studovány ve vztahu k incidenci HNSCC. Výsledky však nejsou jednoznačné, neboť zmíněné polymorfizmy v tomto genu korelovaly v jedné studii se zvýšeným rizikem vzniku dlaždicového karcinomu dutiny ústní (heterozygotní genotyp Taq1), v jiné studii naopak byly v souladu s poklesem incidence HNSCC (homozygotní genotypy Taq1 q Fok1) [38]. Hama et al studovali 5 různých VDR polymorfizmů (Fok1, Bsm1, Apa1, Taq1 a Cdx2) a našli pouze u polymorfizmu FOK1 signifikantní kratší interval přežití, nicméně jejich práce má četné limity [36]. Jak se ukazuje, významnou úlohu ve výsledném efektu pro riziko nádoru a jeho prognózu hrají nejen jednotlivé polymorfizmy VDR genu a jejich genotypy (heterozygotní, homozygotní), ale též synergický efekt genového prostředí (VDR haplotypy, další genetické faktory), expozice UVB a primární lokalizace nádoru [19,39].

Protinádorové účinky vitamínu D

Vitamin D se prostřednictvím VDR podílí na významných procesech, které působí proti nádorové transformaci buněk a progresi již existujících nádorů [1,2,12,16]. Tyto účinky byly prokázány zejména v kulturách nádorových buněk a na zvířecích modelech. Protinádorové působení vitamínu D v jednotlivých nádorech je předmětem dalšího výzkumu. Hlavní mechanismy účinku vitamínu D brání vzniku a rozvoji nádorů zahrnují efekt antiproliferační, antiangiogenetický, protizánětlivý, proapoptotický, prodifereční a aktivaci mechanismů pro opravy DNA. Proapoptotické působení vitamínu D se uskutečňuje indukci exprese proteinů stimujících apoptózu (Bax), potlačením tvorby antiapoptotických proteinů (bcl2) nebo přímou aktivací efektorových kaspáz. Antiangiogenní účinky vitamínu D jsou zprostředkovány snížením či zvýšením exprese faktorů angiogeneze (pokles vaskulárního endoteliálního faktoru VEGF, vzestup trombospondinu 1). Prodifereční efekt vitamínu D vede ke zvýšené expresi různých diferenciací markerů [2]. Snížená aktivita nebo chybění výše uvedených protinádorových procesů podmíněná nedostatkem vitamínu D nebo poruchami jeho biologické aktivity může vyústit v nádorovou transformaci.

Vitamin D zasahuje do mnoha signálních drah, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Útlum buněčné proliferace (antiproliferační efekt) je jedním ze základních faktorů jeho protinádorového působení. Tato inhibice byla prokázána zejména ve 3 kontrolních bodech: v G1 fázi, v S fázi a G2 fázi, přičemž největší pozornost je věnována hlavnímu kontrolnímu bodu G1. Regulace buněčného cyklu v buňce v kontrolních bodech se uskutečňuje prostřednictvím aktivních komplexů cyklinu a cyklin-dependentní kinázy (CDK) a inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKIs) [2]. Vitamin D kontroluje přes signální dráhu VDR-proliferaci zejména prostřednictvím změny exprese cílových genů pro inhibitory cyklin-dependentních kináz. Prvním CDK, u jehož genu byla prokázána regulace exprese komplexem VDR1 a 25-hydroxyvitamin D, byl p21waf1/cip1v lidské buněčné linii promyelocytární HL60 leukemie a karcinomu prsu MCF7 [40,41]. Indukce exprese genů vitamínem D byla potvrzena též u dalších inhibitorů p27kip1, p15, p16 a p18 [2]. Zajímavý je vztah mezi VDR a p53, v němž dochází k vzájemnému ovlivňování jejich genové exprese. P53 může působit jako transkripční koaktivátor genu VDR a vyústit ve zvýšenou expresi VDR receptorů v buňkách [17].

Vliv vitamínu D na buněčný cyklus u nádorů hlavy a krku byl sledován jednak na buněčných liniích z dlaždicového karcinomu, jednak přímo v nádorech HNSCC. Byla prokázána zvýšená exprese inhibitorů cyklin-dependentních kináz p21, p27 u dlaždicového karcinomu hlavy a krku, p18 v SCC25 linii odvozené z dlaždicového karcinomu jazyka a p57 v buněčné linii Hep-2 lidského laryngeálního karcinomu [42–45]. Zvýšená exprese (overexprese) p16 je považována v dlaždicových

karcinomech hlavy a krku za významný prognostický marker. Jako jedna z možných příčin zvýšené exprese p16 v buňce byla prokázána infekce vysoce rizikovými typy HPV. Předpokládané interakce mezi vitaminem D a expresí p16 jsou předmětem dalšího výzkumu [8].

Celkové protinádorové působení vitaminu D je dále potencováno jeho interakcemi s dalšími signálními drahami, např. stimulací signálních cest IGFBP3 a TGF- β a inhibicí EGFR signální kaskády [2].

Imunita a vitamin D

Nádory disponují různými mechanismy, které vedou k narušení imunitní odezvy. Zvláště HNSCC se vyznačuje imunosupresivními aktivitami, které jsou odpovědné za vyšší agresivitu a recidivy těchto nádorů. Tyto aktivity spočívají jednak v nádorem indukované produkci četných cytokinů a růstových faktorů, jednak ve výskytu imunoinhibičních CD34⁺ progenitorových buněk v nádorovém stromatu i v periferní krvi. Dobrá znalost všech těchto sekrečních a regulačních mechanismů umožní zavedení imunomodulační terapie v HNSCC.

Buňky CD34⁺ infiltrují a prostřednictvím secernovaného transformujícího růstového faktoru β (TGF β) potlačují funkce T buněk, zejména jejich antitumorózní účinky [46–49]. Další důležitou funkcí vitaminu D je jeho působení jako imunomodulační agens ovlivňující jak přirozenou, tak adaptivní imunitu. Působení vitaminu D se uskutečňuje prostřednictvím receptorů VDR, které jsou lokalizovány v buňkách imunitního systému, zejména na antigen prezentujících buňkách (makrofázích a dendritických buňkách) a aktivovaných T- a B-lymfocytech. Normální lidské makrofágy mají též schopnost produkovat vitamin D. V přirozené imunitě se vitamin D podílí jednak na mechanismu vedoucím k eliminaci antigenu, jednak při preventivním zablokování přirozené imunitní odezvy. Vitamin D působí významně antibakteriálně. Nízké hladiny vitaminu D podporují vznik mykobakteriální nebo virové infekce, např. infekci HPV, která je důležitým etiologickým faktorem zejména u orofaryngeálního karcinomu. Na úrovni adaptivní imunity vitamin D moduluje efektorové i regulační T-lymfocyty a vyznačuje se imunosupresivními účinky s ochranou před autoimunitními chorobami a podílí se na blokování odhojení transplantátu [50].

Četné studie provedené u pacientů s HNSCC ukazují na významnou roli vitaminu D pro chování a integritu imunitního systému. Vitamin D intratumorózně iniciuje maturaci buněk CD34⁺ do zralých dendritických buněk, které stimulují imunitní systém zejména ve smyslu anti-HNSCC T buněčné reaktivity. Tento mechanismus je velice slibný pro terapeutické využití vitaminu D k překonání závažných imunosupresí sdružených s HNSCC [38,47,49].

Imunosupresivní a proangiogenní cytokiny a růstové faktory v nádorovém mikroprostředí HNSCC jsou dalším klíčovým elementem přispívajícím k nepříznivému chování těchto nádorů. Významnými

imunosupresivními faktory v HNSCC jsou zejména cytokiny interleukin 4 (IL4), interleukin 10 (IL10) a granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor (GM-CSF), prostaglandin E2 (PGE2) a TGF β . Za angiogenezi a metastazování jsou v HNSCC odpovědné zejména interleukin 8 (IL8) a růstové faktory jako bazický fibroblastický růstový faktor (bFGF), hepatocytární růstový faktor (HGF), destičkový růstový faktor (PDGF) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [51].

Suplementace vitaminu D – možný preventivní a terapeutický přístup k HNSCC

Celkově špatná prognóza HNSCC vyžaduje hledání nových léčebných možností. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem o účincích vitaminu D se suplementace vitaminu D nabízí jako nový přístup k prevenci vzniku a rozvoje nádorového onemocnění, pro optimalizaci a zvýšení účinnosti léčby nádorů hlavy a krku a pro předcházení synchronním nebo metachronním nádorům. Limitací léčby je dosud panující nejednotnost ohledně výše dávek vitaminu D při suplementaci [22,24].

Vitamin D je tedy intenzivně studován jako chemopreventivní agens. Chemoprevence je definována jako užití přírodních nebo syntetických agens k přerušení procesu kancerogeneze. Poprvé byla popsána Spornem et al v roce 1976 v souvislosti s vitaminem A a jeho syntetickými analogy [52]. Nedávná studie chemopreventivního účinku vitaminu D na zvířecím modelu prokázala, že dlouhodobá suplementace nízkými dávkami vitaminu D významně blokuje sled dějů od normálního epitelu po karcinom v bukalní sliznici křečků. Uvedený model úzce napodobuje proces kancerogeneze v epitelu horního dýchacího traktu u lidí. Podobný efekt byl rovněž prokázán na zvířecích modelech v tkáni prostaty a střeva [53]. Klinická aplikace vitaminu D u člověka vyžaduje nalezení vhodných dávek pro dosažení optimálního účinku [2]. Zároveň se hledají taková analoga vitaminu D, která minimálně ovlivňují metabolismus kalcia [12,53].

Dalším opodstatněním pro terapii HNSCC vitaminem 1,25(OH)₂D₃ či jeho analogy jsou jeho imunostimulační účinky. Na základě pilotních studií byl prokázán vliv vitaminu D na vyzrávání progenitorových buněk CD34⁺ do dendritických buněk, které stimulují aktivitu T buněk a zvýšení T-lymfocytů CD4⁺ a CD8⁺ v nádorovém mikroprostředí. To přispívá ke zvýšení účinnosti imunitního systému a vede k redukci počtu recidiv HNSCC. Tato problematika však vyžaduje provedení dalších rozsáhlejších studií k ověření funkční aktivity intratumorózní infiltrace imunokompetentními buňkami a význam kombinovaného podávání imunoterapie (vakcíny obsahující nádorový antigen) a vitaminu D [38,47].

Dobrá znalost všech sekrečních a regulačních mechanismů cytokinů a růstových faktorů v HNSCC rovněž přispěje k zavedení úspěšné imunomodulační terapie do klinické praxe [51].

Závěr

Vitamin D plní nepochybně významnou úlohu v etiopatogenezi nádorového onemocnění. Základním předpokladem pro potenciální účelné využití vitaminu D v prevenci a terapii zhoubných nádorů je dokonalé poznání všech jím regulovaných procesů. Účinek vitaminu D závisí na lokalizaci, histologickém typu nádoru a na řadě vnějších faktorů, zejména pak na geografických vlivech a s tím související expozicí slunečnímu záření. Protože patogenetické procesy v různých nádorech jsou odlišné, je nutné studium mechanismů účinku vitaminu D cílit nejen ke konkrétním nádorům, ale i k účelu, pro který znalosti budou využity (primární nebo sekundární prevence, adjuvantní léčba, optimalizace léčby atd). V uvedeném přehledu jsou shrnuty současné poznatky o působení vitaminu D u pacientů s dlaždicovými karcinomy hlavy a krku a o vzájemných interakcích mezi vitaminem D a HNSCC. Tyto poznatky se skládají do celkové (zatím neúplné) mozaiky patobiologického procesu v HNSCC. Jak se postupně ukazuje, vitamin D by se mohl stát důležitou modalitou v léčbě těchto z prognostického a terapeutického hlediska velmi problematických nádorů. Zároveň je možné zde uvedené patogenetické mechanismy vitaminu D vztáhnout i k jiným nádorům nebo tímto směrem zaměřit další výzkum.

Tato práce byla podpořena projektem GAUK č. 444311 a Programem rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36) a projektem Ministerstva zdravotnictví (Projekt koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00669806 – FN Plzeň).

Literatura

- Matějovská Kubešová H, Tůmová J, Polcarová V et al. Vitamin D – připomínka známých a přehled méně známých skutečností. *Vnitř Lék* 2012; 58(3): 196–201.
- Chiang KC, Chen TC. The Anti-cancer Actions of Vitamin D. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(1): 126–139.
- Bose P, Brockton NT, Dort JC. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J Cancer* 2013; 133(9): 2013–2023.
- Barnes L (eds). *Surgical pathology of the head and neck*. 3 ed. New York: Informa Healthcare 2008. ISBN 9780849390234.
- ÚZIS ČR. Novotvary 2010 ČR. Dostupné z WWW: <<http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>>.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P et al. *Pathology and genetics of head and neck tumours. WHO classification of tumours series*. IARC Press: Lyon 2005.
- Ludvíková M, Pešta M, Holubec L jr. et al. Nové aspekty patobiologie nádorů. *Česk Patol* 2009; 45(4): 94–99.
- Kalfert D, Ludvíková M. Nádorové markery u dlaždicových karcinomů hlavy a krku. *Onkologie* 2012; 6(5): 241–246.
- Meyer F, Liu G, Douville P et al. Dietary vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D level in relation to disease outcomes in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 2011; 128(7): 1741–1746.
- Orell-Kotikangas H, Schwab U, Österlund P et al. High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis. *Head Neck* 2012; 34(10): 1450–1455.
- Kulda V. Metabolizmus vitaminu D. *Vnitř Lék* 2012; 58(5): 400–404.
- Drábová K, Bienertová Vašků J, Lokaj P et al. Vitamin D – jeho fyziologie, patofyziologie a význam v etiopatogenezi nádorových onemocnění. *Čas Lék Česk* 2013; 152(1): 20–30.
- MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 1985; 76(4): 1536–1538.
- Azad AK, Bairati I, Qiu X et al. Genetic sequence variants in vitamin D metabolism pathway genes, serum vitamin D level and outcome in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 2013; 132(11): 2520–2527.
- Pešta M. Polymorfismus genu pro receptor vitaminu D. *Vnitř Lék* 2012; 58(5): 381–385.
- Chakraborti CK. Vitamin D as a promising anticancer agent. *Indian J Pharmacol* 2011; 43(2): 113–120.
- Maruyama R, Aoki F, Toyota M et al. Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer Res* 2006; 66(9): 4574–4583.
- Wagner N, Wagner KD, Schley G et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax. *Exp Eye Res* 2003; 77(1): 1–9.
- Köstner K, Denzer N, Müller CS et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009; 29: 3511–3536.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 308–311.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7): 1911–1930.
- Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL et al. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. The National Academies Press: Washington 2011.
- Pilz S, Tomaschitz A, Obermayer-Pietsch B et al. Epidemiology of vitamin D insufficiency and cancer mortality. *Anticancer Res* 2009; 29(9): 3699–3704.
- Rosen CJ, Abrams SA, Aloia JF et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(4): 1146–1152.
- Robsahm TE, Tretli S, Dahlback A et al. Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast-, colon- and prostate cancer (Norway). *Cancer Causes Control* 2004; 15(2): 149–158.
- Zhou W, Heist RS, Liu G et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels predict survival in early-stage non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2007; 25(5): 479–485.
- Buttiglieri C, Monagheddu C, Petroni P et al. Prognostic role of vitamin D status and efficacy of vitamin D supplementation in cancer patients: a systematic review. *Oncologist* 2011; 16(9): 1215–1227.
- Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI et al. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(23): 3757–3763.
- Lipworth L, Rossi M, McLaughlin JK et al. Dietary vitamin D and cancers of the oral cavity and esophagus. *Ann Oncol* 2009; 20(9): 1576–1581.
- Gugatschka M, Kiesler K, Obermayer-Pietsch B et al. Vitamin D status is associated with disease-free survival and overall survival time in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011; 268(8): 1201–1204.
- Arem H, Weinstein SJ, Horst RL et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in Finnish men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(6): 1178–1184.
- Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer. *Clin Chem* 2013; 59(5): 771–780.
- Brot C, Jorgensen NR, Sorensen OH. The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(12): 920–926.
- Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010; 19(13): 2739–2745.

35. Wang TJ, Zhang F, Richards JB et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376(9736): 180–188.
36. Hama T, Norizoe C, Suga H et al. Prognostic significance of vitamin D receptor polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011; 6(12): 29634.
37. Srinivasan M, Parwani AV, Hershberger PA et al. Nuclear vitamin D receptor expression is associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 123(1–2): 30–36.
38. Young MRI, Walker DD. Vitamin D3 and Its Role in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: Li X. *Squamous Cell Carcinoma*. Dostupné z WWW: <www.intechopen.com/books/squamous-cell-carcinoma/vitamin-d3-and-its-role-in-the-treatment-of-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma>.
39. Zamrazil V. Význam vitaminu D – nové poznatky, které svědčí o jeho úloze v medicíně. *Vnitř Lék* 2012; 58(5): 379–380.
40. Jiang H, Lin J, Su ZZ et al. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994; 9(11): 3397–3406.
41. Saramäki A, Banwell CM, Campbell MJ et al. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(2): 543–554.
42. Hager G, Formanek M, Gedlicka C et al. 1,25(OH)₂ vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 2001; 121(1): 103–109.
43. Hager G, Kornfehl J, Knerer B et al. Molecular analysis of p21 promoter activity isolated from squamous carcinoma cell lines of the head and neck under the influence of 1,25(OH)₂ vitamin D3 and its analogs. *Acta Otolaryngol* 2004; 124(1): 90–96.
44. Gedlicka C, Hager G, Weissenböck M et al. 1,25(OH)₂Vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2006; 35(8): 472–478.
45. Lu L, Qiu J, Liu S et al. Vitamin D3 analogue EB1089 inhibits the proliferation of human laryngeal squamous carcinoma cells via p57. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(5): 1268–1274.
46. Walker DD, Reeves TD, de Costa AM et al. Immunological modulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine* 2012; 58(3): 448–454.
47. Walsh JE, Clark AM, Day TA et al. Use of alpha,25-dihydroxyvitamin D3 treatment to stimulate immune infiltration into head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Immunol* 2010; 71(7): 659–665.
48. Pandit R, Lathers DM, Beal NM et al. CD34+ immune suppressive cells in the peripheral blood of patients with head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109(8): 749–754.
49. Kulbersh JS, Day TA, Gillespie MB et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3) to skew intratumoral levels of immune inhibitory CD34(+) progenitor cells into dendritic cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 140(2): 235–240.
50. Šterzl I. D vitamin a imunita. *Vnitř Lék* 2012; 58(5): 405–410.
51. Pries R, Wollenberg B. Cytokine in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(3): 141–146.
52. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35(6): 1332–1338.
53. Meier JD, Enepekides DJ, Poirier B et al. Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133(11): 1149–1152.

doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.

✉ Marie.Ludvikova@lfp.cuni.cz; ludvikova.m@email.cz

Ústav biologie LF UK, Plzeň

www.lfp.cuni.cz

Doručeno do redakce: 13. 8. 2013

Přijato po recenzi: 17. 9. 2013