

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA
HIRSZFELDA WE WROCŁAWIU

POLSKA AKADEMIA NAUK



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Aleksandra Strzykalska

**Zależny od wieku wpływ kalcytriolu i takalcytolu
na różnicowanie limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny
w mysim raku gruczołu sutkowego**

PROMOTOR:

Prof. dr hab. n. biol. Joanna Wietrzyk

PROMOTOR POMOCNICZY:

Dr inż. Mateusz Psurski

Praca zrealizowana w Laboratorium Doświadczalnej Terapii
Przeciwnowotworowej

Wrocław, 2024 rok

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

*Pani Promotor, **prof. Joannie Wietrzyk** za wsparcie, inspirację i życzliwość, które towarzyszyły mi przez cały okres realizacji mojej pracy doktorskiej. Serdecznie dziękuję za cierpliwość i zaangażowanie, którym obdarzyła mnie Pani profesor, co pomogło rozwijać mi zarówno warsztat badawczy, jak i umiejętność krytycznego myślenia.*

*Panu Promotorowi pomocniczemu, **dr inż. Mateuszowi Psurskiemu** za każdą konstruktywną uwagę, cenny czas poświęcony na konsultacje oraz za motywację, by nieustannie dążyć do doskonalenia własnych osiągnięć.*

*Podziękowania kieruję również do **Koleżanek** z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej za inspirujące rozmowy, które wzbogaciły moje spojrzenie na dziedzinę, w której pracuję.*

***Moim bliskim** za wsparcie, wyrozumiałość i wiarę we mnie.*

***Kochanemu mężowi** za cierpliwość, zrozumienie i bezwarunkowe wsparcie, które były dla mnie nieocenione, a wierne towarzyszenie w chwilach radości i trudności było ogromnym źródłem motywacji.*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki pt.
„Udział osteopontyny we wpływie kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie komórek
Th17 u młodych i starych myszy obarczonych rakiem gruczołu mlekowego”

Nr projektu: 2019/35/B/NZ5/01

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	0
STRESZCZENIE	1
SUMMARY	3
WYKAZ SKRÓTÓW	4
WSTĘP.....	7
1. Charakterystyka raków gruczołu sutkowego	8
1.1 Epidemiologia.....	8
1.2 Czynniki ryzyka w rozwoju raka gruczołu sutkowego	9
1.3 Systemy klasyfikacji raków gruczołu sutkowego	11
1.4 Proces przerzutowania nowotworów	14
1.5 Nowoczesne terapie wykorzystywane w leczeniu pacjentów chorych na raka gruczołu sutkowego.....	16
2. Mechanizm działania oraz metabolizm witaminy D.....	17
2.1 Znaczenie witaminy D w nowotworach	20
2.2 Wpływ witaminy D na raka piersi	21
2.3 Analogi witaminy D	23
3. Osteopontyna jako modulator odpowiedzi immunologicznej.....	25
4. Udział wybranych komórek układu odpornościowego w progresji nowotworów.....	29
4.1 Rola limfocytów Th17.....	31
4.1.1 Znaczenie komórek Th17 w progresji nowotworów.....	33
4.1.2 Wpływ witaminy D na limfocyty Th17	35
4.1.3 Wpływ osteopontyny na limfocyty Th17	37
4.2 Rola limfocytów Th1	38
4.3 Rola limfocytów Th2.....	39

4.4	Rola limfocytów T regulatorowych.....	40
	ZAŁOŻENIA i CELE PRACY.....	42
	MATERIAŁY i METODY	43
5.	Materiały i metody	43
5.1	Linie komórkowe	44
5.2	Zwierzęta doświadczalne	45
5.2.1	Genotypowanie.....	46
5.3	Badania in vivo	47
5.3.1	Owariektomia	47
5.3.2	Wszczepienie komórek nowotworowych.....	47
5.3.3	Ocena wzrostu guza i masy ciała	48
5.3.4	Doustne podania kalcytriolu i takalcytolu.....	49
5.3.5	Ocena perfuzji guza metodą obrazowania ultrasonograficznego	49
5.3.6	Pobranie tkanek do analiz <i>ex vivo</i>	49
5.4	Badania ex vivo.....	51
5.4.1	Analiza histopatologiczna	51
5.4.2	Preparacja komórek z krwi.....	51
5.4.3	Preparacja komórek z guza, płuc, mózgu i wątroby.....	52
5.4.4	Preparacja komórek ze śledzion i węzłów chłonnych.....	52
5.4.5	Preparacja komórek ze szpiku kostnego	53
5.4.6	Analiza parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi ..	54
5.4.7	Analiza fenotypu komórek CD4 ⁺ i T regulatorowych za pomocą cytometrii przepływowej.....	54
5.4.8	Analiza poziomu IL-17 i IFN-γ w komórkach CD4 ⁺ za pomocą cytometrii przepływowej.....	55
5.4.9	Określenie zdolności komórek do tworzenia kolonii – test klonogeny.....	56
5.4.10	Magnetyczna separacja komórek CD4 ⁺ z mysich śledzion.....	57

5.4.11 Przygotowanie lizatów komórkowych do analizy PCR i Jess Simple Western	58
5.4.11.1 Ocena ekspresji genów na poziomie mRNA za pomocą analizy real-time PCR	59
5.4.11.1.1 Izolacja RNA.....	59
5.4.11.1.2 Odwrotna transkrypcja	59
5.4.11.1.3 Real-time PCR.....	59
5.4.11.2 Ocena poziomu białek za pomocą analizy Jess Simple Western.....	61
5.4.11.2.1 Pomiar poziomu białka.....	61
5.4.11.2.2 Analiza poziomu białek z wykorzystaniem metody detekcyjnej Jess Simple Western	61
5.4.12 Różnicowanie limfocytów Th17	65
5.4.12.1 Blokowanie receptorów dla osteopontyny w warunkach <i>in vitro</i>	65
5.4.13 Ocena poziomu ekspresji wybranych czynników metodą ELISA.....	67
6. Analiza statystyczna.....	68
WYNIKI.....	68
7. Badania <i>in vivo</i>	68
7.1 Ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na wzrost guza u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR.....	68
7.2 Ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na masę ciała myszy.....	69
7.3 Ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na proces angiogenezy w guzach myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR...	71
8. Badania <i>ex vivo</i>	74
8.1 Ocena wybranych parametrów morfologicznych krwi wobec działania kalcytriolu i takalcytolu	74

8.2 Ocena wybranych parametrów biochemicznych wobec działania kalcytriolu i takalcytolu	77
8.3 Ocena aktywności przeciwrzutowej kalcytriolu i takalcytolu w modelu mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1.....	80
8.4 Ocena fenotypowa limfocytów T pomocniczych wobec działania kalcytriolu i takalcytolu	81
8.4.1 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących ze śledziony	84
8.4.2 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z guza	85
8.4.3 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z płuc	86
8.4.4 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z krwi.....	87
8.4.5 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z węzłów chłonnych dla modelu nowotworowego 4T1..	88
8.4.6 Wpływ kalcytriolu i takalcytolu na odsetek komórek IL-17 ⁺ pochodzących z śledziony, guza, płuc, krwi i węzłów chłonnych.....	89
8.5 Ocena fenotypowa limfocytów T regulatorowych wobec działania kalcytriolu i takalcytolu	91
8.6 Ocena czystości izolacji frakcji komórkowej CD4 ⁺	93
8.7 Badanie wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję genów kluczowych dla różnicowania limfocytów T metodą real-time PCR.....	96
8.8 Badanie wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję białek szlaków sygnałowych ważnych dla różnicowania komórek Th17 metodą Jess Simple Western.....	100
8.9 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom 25(OH)D ₃ w mysim osoczu	103

8.10 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom VEGF w mysim osoczu	105
8.11 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom osteopontyny w mysim osoczu	106
8.12 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom osteopontyny w supernatantach z nad stymulowanych komórek CD4 ⁺	108
8.13 Analiza wpływu kalcytriolu i takalcytolu na poziom osteopontyny w supernatantach z nad różnicowanych komórek Th17	109
8.14 Wpływ zablokowania receptorów dla osteopontyny na proces różnicowania komórek Th17 izolowanych od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 traktowanych kalcytriolem i takalcytolem	110
PODSUMOWANIE WYNIKÓW	115
DYSKUSJA	118
WNIOSKI	136
SPIS TABEL	137
SPIS RYCIN	138
BIBLIOGRAFIA	141
SUPLEMENT	168

STRESZCZENIE

Badania nad rakiem gruczołu sutkowego wskazują, iż witamina D₃ w tym typie nowotworu odgrywa istotną rolę w regulacji aktywności limfocytów Th17, lecz jej działanie w tym procesie nie jest jednoznaczne. Różnicowanie komórek Th17 może zależeć również od obecności osteopontyny (OPN). Bezpośredni efekt OPN, regulujący różnicowanie Th17 wynika z połączenia OPN z jej receptorami na komórkach T. Kalcytriol, za pośrednictwem szlaku genomowego, reguluje ekspresję OPN. Mimo to rola OPN w zależnym od wieku wpływie kalcytriolu i takalcytolu na rozwój limfocytów Th17 u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego nie została do tej pory dokładnie wyjaśniona.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu, na populację komórek Th17 oraz udział receptorów dla OPN w procesie różnicowania tych komórek u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR. Dodatkowo postanowiono określić znaczenie statusu menopauzalnego w tych procesach, włączając do eksperymentu przed- i pomenopauzalne modele mysie.

Zidentyfikowano swoiste dla OPN receptory - CD44, CD51 i CD29 jako najbardziej modulowane po zastosowaniu kalcytriolu i takalcytolu u myszy obciążonych rakiem 4T1 i 67NR. Blokowanie CD44 i CD51 prowadziło do stymulacji różnicowania limfocytów Th17 izolowanych od myszy z przedmenopauzalnego modelu 4T1, traktowanych kalcytriolem i takalcytolem. Przeciwny efekt zaobserwowano po zablokowaniu CD29. W tym samym modelu zaobserwowano również słabsze różnicowanie Th17 po zablokowaniu CD51 w komórkach z grupy kontrolnej względem komórek nieblokowanych. Odwrotny efekt obserwowany był przy zablokowaniu CD29. W przedmenopauzalnym modelu 4T1 wykazano, że takalcytol nasilał przerzutowanie oraz zwiększał odsetek limfocytów Th17 w płucach. W mysim modelu pomenopauzalnym, kalcytriol i takalcytol zmniejszały odsetek komórek Treg w węzłach chłonnych i krwi obwodowej oraz tworzenie przerzutów do wątroby i płuc, z kolei sam kalcytriol zwiększał udział limfocytów Th17 w guzie. W przedmenopauzalnym modelu raka 67NR kalcytriol i takalcytol zwiększały angiogenezę guza, co więcej takalcytol stymulował również geny kluczowe w procesie różnicowania komórek Th17. W modelu

pomenopauzalnym działaniem takalcytolu spowodowało obniżenie angiogenezy guza oraz populacji Th17.

Podsumowując, kalcytriol i takalcytol mogą wywierać u myszy zarówno efekt pro- jak i przeciwnowotworowy, który koreluje z obecnością komórek układu odpornościowego (Th17 lub Treg). Powyższe wyniki pokazują, że receptory CD51, CD29 i CD44 są kluczowymi, zaangażowanymi w zależne od traktowania kalcytriolem lub takalcytolem różnicowanie limfocytów Th17.

SUMMARY

Studies on mammary gland cancer indicate that vitamin D₃ plays an important role in regulating the activity of Th17 lymphocytes in this type of cancer, but its action in this process is not clear. Th17 cell differentiation may also depend on the presence of osteopontin (OPN). The direct effect of OPN regulating Th17 differentiation results from the connection of OPN with its receptors on T cells. Calcitriol, via the genomic pathway, regulates the expression of OPN. Nevertheless, the role of OPN in the age-dependent effect of calcitriol and tacalcitol on the development of Th17 lymphocytes in mice bearing mammary gland cancer has not been fully explained so far.

This doctoral dissertation aimed to assess the effect of calcitriol and tacalcitol on the population of Th17 cells and the participation of OPN receptors in the differentiation process of these cells in mice bearing 4T1 and 67NR mammary gland cancer. In addition, the importance of menopausal status in these processes by including pre- (young) and postmenopausal (aged, ovariectomized) mouse models in the experiment was determined.

OPN-specific receptors - CD44, CD51 and CD29 were identified as the most modulated after the use of calcitriol and tacalcitol in mice bearing 4T1 and 67NR cancer. Blocking CD44 and CD51 led to stimulation of differentiation of Th17 lymphocytes isolated from young mice bearing 4T1 cells, treated with calcitriol and tacalcitol. The opposite effect was observed after blocking CD29. In the same model, weaker Th17 differentiation was also observed after blocking CD51 in cells from the control group compared to unblocked cells. The opposite effect was observed when blocking CD29. In the premenopausal 4T1 model, tacalcitol was shown to enhance metastasis and increase the percentage of Th17 lymphocytes in the lungs. In the postmenopausal mouse model, calcitriol and tacalcitol reduced the percentage of Treg cells in lymph nodes and peripheral blood and the formation of metastases to the liver and lungs, while calcitriol alone increased the percentage of Th17 lymphocytes in the tumor. In the premenopausal 67NR cancer model, calcitriol and tacalcitol increased tumor angiogenesis, and tacalcitol also stimulated genes crucial to the differentiation of Th17 cells. In the postmenopausal model, tacalcitol reduced tumor angiogenesis and the Th17 population.

In summary, calcitriol and tacalcitol can exert both pro- and anti-tumor effects in mice, which correlate with the presence of immune cells (Th17 or Treg). The above results show that CD51, CD29 and CD44 receptors are key involved in calcitriol- or tacalcitol-dependent differentiation of Th17 lymphocytes.

WYKAZ SKRÓTÓW

TICs	(<i>ang. tumor-initiating cells</i>) - komórki inicjujące nowotwór
VDR	(<i>ang. vitamin D receptor</i>) - receptor dla witaminy D
mTOR	(<i>ang. mammalian target of rapamycin</i>) – ssaczy cel dla rapamycyny
NF-κB	(<i>ang. Nuclear factor kappa B</i>) - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
JNK	(<i>ang. c-Jun N-terminal kinase</i>) - serynowo-treoninowa kinaza białkowa JNK
ERK	(<i>ang. extracellular-signal regulated kinase</i>) - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
HRT	(<i>ang. hormone replacement therapy</i>) – hormonalna terapia zastępcza
BRCA1/2	(<i>ang. breast cancer susceptibility gene 1 and 2</i>) – gen raka piersi 1/2
EGFR	(<i>ang. epidermal growth factor receptor</i>) – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
DCIS	(<i>ang. ductal carcinoma in situ</i>) - rak przewodowy <i>in situ</i>
LCIS	(<i>ang. lobular carcinoma in situ</i>) - rak zrazikowy
IDC	(<i>ang. invasive ductal carcinomas</i>) - rak przewodowy
NST	(<i>ang. no special type</i>) – rak „bez specjalnego typu”
EMT	(<i>ang. epithelial-mesenchymal transition</i>) - przejście nabłonkowo-mezenchymalne
TNBC	(<i>ang. triple-negative breast cancer</i>) - potrójnie ujemny rak piersi
PD-1	(<i>ang. programmed death-1</i>) – receptor programowanej śmierci komórki 1
PD-L1	(<i>ang. programmed death ligand-1</i>) – ligand dla receptora programowanej śmierci komórki 1
CAR-T	(<i>ang. chimeric antigen receptor T</i>) - terapia wykorzystująca chimeryczne limfocyty T
HER-2	(<i>ang. human epidermal growth factor receptor-2</i>) - receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu-2
DBP	(<i>ang. vitamin D -binding protein</i>) - białko wiążące witaminę D
RXR	(<i>ang. retinoic acid X receptor</i>) - receptor X kwasu retinowego

VDRE	(<i>ang. vitamin D responsive element</i>) - elementy odpowiedzi na witaminę D
CDK	(<i>ang. cyclin-dependent kinases</i>) - kinazy zależne od cyklin
OPN	(<i>ang. osteopontin</i>) – osteopontyna
iOPN	(<i>ang. intracellular OPN</i>) - osteopontyna wewnątrzkomórkowa
sOPN	(<i>ang. secreted OPN</i>) - osteopontyna zewnątrzkomórkowa
Eta-1	(<i>ang. early T lymphocyte activation 1</i>) - białko wczesnej aktywacji limfocytów T-1
TME	(<i>ang. tumor microenvironment</i>) - mikrośrodowisko nowotworu
TIL	(<i>ang. tumor infiltrating lymphocytes</i>) - limfocyty naciekające nowotwór
CIA	(<i>ang. Collagen-Induced Arthritis</i>) - zapalenie stawów związane z kolagenem
EAE	(<i>ang. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>) - eksperymentalne, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego
CDK	(<i>ang. cyclin-dependent kinases</i>) - kinazy zależne od cyklin
MET	(<i>ang. mesenchymal - epithelial transition</i>) - przejście mezenchymalnie – nabłonkowe
LTi	(<i>ang. Lymphoid Tissue inducer</i>) - komórki indukujące tkankę limfatyczną
URPL	(<i>ang. unexplained recurrent pregnancy loss</i>) - niewyjaśniona nawracająca utrata ciąży
NFAT	(<i>ang. nuclear factor of activated T cells</i>) - czynnik jądrowy dla aktywowanych limfocytów T
Runx1	(<i>ang. Runt-related transcription factor</i>) - czynnik transkrypcyjny związany z Runt 1
hnRNP	(<i>ang. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>) - heterogeniczne jądrowe rybonukleoproteiny
CTLA-4	(<i>ang. cytotoxic T cell antigen 4</i>) - białka związane z cytotoksycznymi limfocytami T-4
VEGF	(<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>) - czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej

DC	(<i>ang. dendritic cells</i>) - komórki dendrytyczne
CTL	(<i>ang. cytotoxic T cells</i>) - komórki T cytotoksyczne
BMI	(<i>ang. body mass index</i>) - indeks masy ciała

WSTĘP

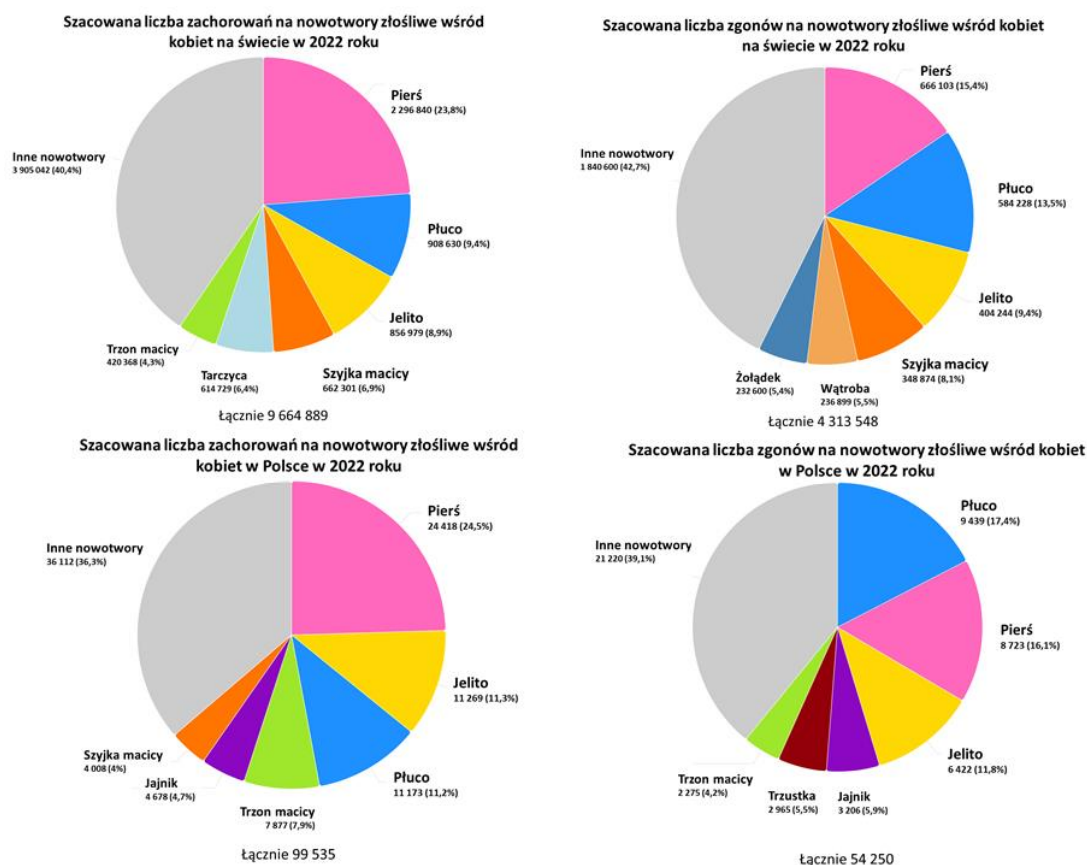
Komórki prawidłowe, posiadając zdolność do przystosowywania się do zmiennych warunków panujących w organizmie, charakteryzują się swoistym mechanizmem adaptacji oraz plastycznością umożliwiającą regenerację uszkodzeń. Wykorzystując szeroko pojętą plastyczność, szczególnie, gdy kontrola nad nią jest zaburzona, komórki mogą wchodzić na drogę transformacji nowotworowej. Zmiany genetyczne, epigenetyczne i fenotypowe zachodzące na skutek działania czynnika stresowego prowadzą do utraty zdolności komórki do regulacji reakcji na czynniki patologiczne lub przeprogramowania prawidłowej, fizjologicznej plastyczności w zmienioną nowotworowo zdolność komórek do unikania odpowiedzi na terapie przeciwnowotworowe [1]. Dzięki pogłębiającej się wiedzy na temat różnych nowotworów i towarzyszącym im zmian, z biegiem lat liczba poznanych cech charakteryzujących komórki nowotworowe stale wzrasta. Początkowo uznawano, iż komórki nowotworowe charakteryzuje sześć wspólnych, podstawowych cech [2], a z biegiem czasu tę liczbę aktualizowano [3]. Obecnie, opisując nowotwory złośliwe, dysponujemy czternastoma cechami dla nich charakterystycznymi. Utrzymywanie aktywnej sygnalizacji proliferacyjnej, utrata wrażliwości na inhibitory wzrostu, unikanie odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, nieśmiertelność replikacyjna, współtowarzyszące procesy zapalne sprzyjające nowotworowi, zdolność indukowania wzrostu naczyń krwionośnych, inwazji i przerzutów, oporność na śmierć komórkową, niestabilność genomu i obecność mutacji, deregulacja metabolizmu komórkowego, upośledzona plastyczność fenotypowa, przeprogramowanie epigenetyczne niezwiązane z mutacjami, polimorficzna zmienność mikrobiomu oraz starzenie się komórki to główne cechy, którymi określa się komórki poddane transformacji nowotworowej [4]. Wzrost komórki prawidłowej zależy od mitogennych czynników wzrostu, które wiążąc się z odpowiednimi receptorami stymulują namnażanie się komórek. W sytuacji niedoboru składników odżywczych czy czynników mitogennych, prawidłowe komórki przestają proliferować, podczas gdy komórki zmienione nowotworowo, wykazując zmniejszoną zależność od egzogennej stymulacji wzrostu oraz poprzez autostymulację, zdolne są do ciągłej proliferacji, uniezależniając się od mikrośrodowiska tkankowego. Wiadomym jest również, iż na zwiększenie potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych wpływają onkogeny naśladujące prawidłową sygnalizację zależną od mitogenów, umożliwiając komórkom nowotworowym nabycie autonomii. Równie ważnym

mechanizmem naturalnie występującym w zdrowej komórce jest reagowanie na sygnały hamujące wzrost komórki, które ma na celu zapobieganie opisanym powyżej procesom. Ligandy, działające na receptory komórkowe (np. transformujący czynnik wzrostu beta - TGF- β) regulują szlaki komórkowe, które aktywując wtórne przekaźniki sygnałów prowadzą do zmiany wzorców ekspresji genów modulując między innymi cykl komórkowy poprzez kierowanie komórki do stanu spoczynku w fazie G0. W komórkach nowotworowych dochodzi do zaburzeń w szlakach hamujących ich wzrost i często zmiany te dotyczą białek zaangażowanych w cykl komórkowy tj. cyklin oraz kinaz zależnych od cyklin (*ang. cyclin-dependent kinases - CDK*), jak również inhibitorów wspomnianych wcześniej CDK. Powyższe cechy pokazują, iż zaburzenia w mechanizmach odpowiadających za utrzymanie homeostazy w organizmie są kluczowymi procesami charakteryzującymi komórki zmienione nowotworowo [5].

1. Charakterystyka raków gruczołu sutkowego

1.1 Epidemiologia

Dane Światowej Organizacji Zdrowia (*ang. World Health Organization - WHO*) z bazy danych GLOBOCAN wskazują, iż rak gruczołu sutkowego stanowił 23,8% wszystkich raków pod względem zachorowalności wśród kobiet na świecie w 2022 roku. Pierwsze miejsce, uwzględniając liczbę zgonów wśród kobiet na świecie, także przypisuje się rakom gruczołu sutkowego (15,4% wszystkich zgonów spowodowanych występowaniem raka). Również w Polsce najwyższa zachorowalność na nowotwory złośliwe wśród kobiet dotyczy raka gruczołu sutkowego (24,5%). Światowa Organizacja zdrowia odnotowała 8 723 przypadków zgonów (co stanowi 16,1% wszystkich zgonów) wśród kobiet chorujących na nowotwory złośliwe, umieszczając złośliwy nowotwór piersi na drugim miejscu pod względem umieralności w Polsce, zaraz po raku płuc. Zwiększający się od lat 80. XX wieku dostęp do badań mammograficznych pociągnął za sobą gwałtowny wzrost wykrywalności nowotworów piersi u kobiet. Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat zapadalność na ten typ nowotworu rosła umiarkowanie, co przypisuje się większym możliwościom diagnostycznym wykorzystywanym w prewencji nowotworów piersi [6].



Rycina 1. Dane epidemiologiczne dotyczące zachorowań i zgonów na nowotwory złośliwe wśród kobiet na świecie i w Polsce w 2022 roku. Dane pochodzące z bazy danych GLOBOCAN, Światowej Organizacji Zdrowia.

1.2 Czynniki ryzyka w rozwoju raka gruczołu sutkowego

Stale rosnąca liczba zachorowań i zgonów spowodowanych rozwojem raka gruczołu sutkowego u kobiet wynika między innymi ze zmieniających się warunków środowiskowych związanych ze stylem życia, jak również genetycznymi czynnikami ryzyka predysponującymi do indukcji nowotworu. Uważa się, iż brak aktywności fizycznej może sprzyjać rozwojowi nowotworu, a jej obecność może mieć szczególne znaczenie w zapobieganiu jego powstawania oraz w procesie leczenia pacjentek chorujących na raka gruczołu sutkowego. Mechanizmy, na jakie wpływać może aktywność fizyczna, to zmniejszenie insulinooporności i obniżenie poziomu insuliny na czczo oraz zmniejszenie stanu zapalnego [7]. Nawyki żywieniowe, a w szczególności

nadmierne spożycie alkoholu, mogą zwiększać prawdopodobieństwo powstania nowotworu. Udowodniono rakotwórcze działanie aldehydu octowego, metabolitu alkoholu etylowego, którego obecność koreluje z rozwojem raka gruczołu sutkowego u zdrowych kobiet [8], między innymi za pośrednictwem gromadzenia się nadmiaru nieorganicznego fosforanu w tkankach uwolnionego na skutek obciążenia czynności nerek [9]. Nadwaga jest kolejnym czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworów. Nieprawidłowa masa ciała wiąże się nie tylko ze zwiększonym ryzykiem powstawania raka gruczołu sutkowego, ale również znacząco wpływa na rokowanie. Uważa się, że nadwaga odpowiada za powstawanie przewlekłego stanu zapalnego, wzrost poziomu czynników wzrostu, cytokin prozapalnych czy hormonów promujących wzrost nowotworu, wpływających na angiogenezę guza, inwazję i przerzutowanie [10]–[12]. Podczas ciąży dochodzi do pobudzenia proliferacji komórek, dlatego uważa się, że ciąża w wieku >35 roku życia może predysponować do rozwoju raka gruczołu sutkowego z powodu zwiększonej liczby komórek inicjujących nowotwór (*ang. tumor initiating cells – TICs*) w tkance gruczołu niż u kobiet, które zaszły w ciążę wcześniej [13], [14]. W przypadku kobiet w okresie pomenopauzalnym, znaczenie dla powstawania raka gruczołu sutkowego może mieć stosowanie hormonalnej terapii zastępczej (*ang. hormone replacement therapy – HRT*) w okresie okołomenopauzalnym. Korzyści płynące ze stosowania HRT u kobiet po menopauzie związane są z zapobieganiem i leczeniem osteoporozy oraz łagodzeniem objawów menopauzy [15]. Jednakże, już 30 lat temu zaobserwowano wzrost zachorowań na raka gruczołu sutkowego u kobiet stosujących HRT [16]. Kluczową i decydującą rolę w kontekście rozwoju raka gruczołu sutkowego przy zastosowaniu HRT odgrywają takie czynniki jak rodzaj estrogenów i progestagenu, jak również postać leku, dawki, czas trwania i rozpoczęcia terapii oraz wiek, BMI (*ang. body mass index*), styl życia czy wcześniejsze choroby pacjentki [17]. Badania dotyczące zależności pomiędzy częstością przepisywania HRT a występowaniem nowotworu piersi nie są jednoznaczne [18]–[20]. Genetycznymi czynnikami zwiększającymi ryzyko rozwoju nowotworu są mutacje genetyczne. Uważa się, że średnio 10% nowotworów ma podłoże dziedziczne i wynika ono z autosomalnego przekazania zmutowanego genu. Największe znaczenie w przypadku raka gruczołu sutkowego mają geny *BRCA1* i *BRCA2* (*ang. breast cancer susceptibility gene 1 and 2*). W prawidłowych komórkach, geny te kodują białka naprawiające uszkodzone DNA. Zmutowane wersje tych genów mogą prowadzić do nieprawidłowego wzrostu komórek i w konsekwencji rozwoju raka [21]–[23].

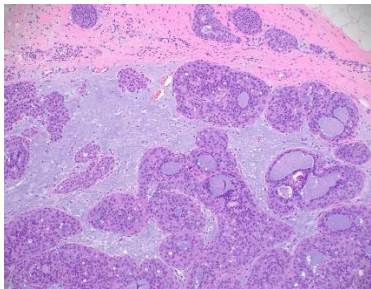
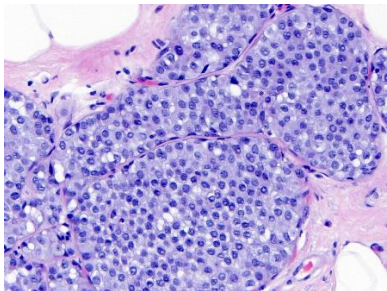
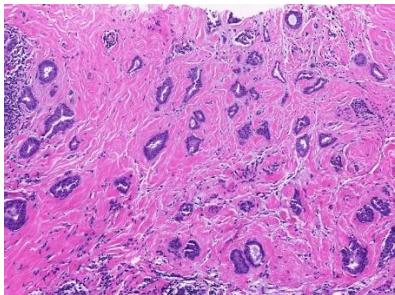
1.3 Systemy klasyfikacji raków gruczołu sutkowego

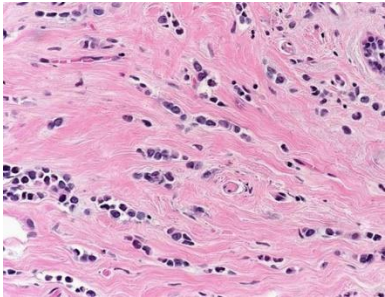
Ze względu na wysoką heterogenność i złożoną etiologię raka gruczołu sutkowego, w celu ułatwienia i zapewnienia dokładnej diagnozy choroby, wykorzystywana jest klasyfikacja nowotworów. Nowotwory gruczołu sutkowego opisywane są według klasyfikacji klinicznej (ocena stopnia zaawansowania raka – TNM (*ang. tumor, node, metastasis*)), histopatologicznej i molekularnej.

Kliniczna klasyfikacja TNM opisuje stadium nowotworu według kryterium wielkości guza (T-tumor), liczby, lokalizacji i stopnia zajęcia węzłów chłonnych (N-node) oraz obecności lub braku przerzutów odległych (M-metastasis) [24]. Jest systemem pozwalającym ocenić stopień zaawansowania choroby i określić rokowania w chwili rozpoznania. Ułatwia również przewidywanie ewentualnego nawrotu choroby u pacjentów oraz dobranie terapii dostosowanej do stopnia zaawansowania choroby [25], [26].

System klasyfikacji histopatologicznej obejmuje przedinwazyjnego raka *in situ* oraz raka naciekającego (inwazyjnego). Przedinwazyjny rak piersi najczęściej przyjmuje postać raka przewodowego *in situ* (*ang. ductal carcinoma in situ - DCIS*), będącego prekursorem raka inwazyjnego; oraz formę raka zrazikowego (*ang. lobular carcinoma in situ - LCIS*). Rak inwazyjny stanowi heterogenną grupę, jednakże najczęściej występującym jest inwazyjny rak przewodowy (*ang. invasive ductal carcinomas - IDC*) stanowiący 60–70% przypadków oraz inwazyjny rak zrazikowy (*ang. invasive lobular carcinoma - ILC*), który stanowi do 15% raków gruczołu sutkowego. Wśród inwazyjnych raków przewodowych najpowszechniejszym typem jest IDC „bez specjalnego typu” (*ang. no special type - NST*) (Tabela 1) [27], [28].

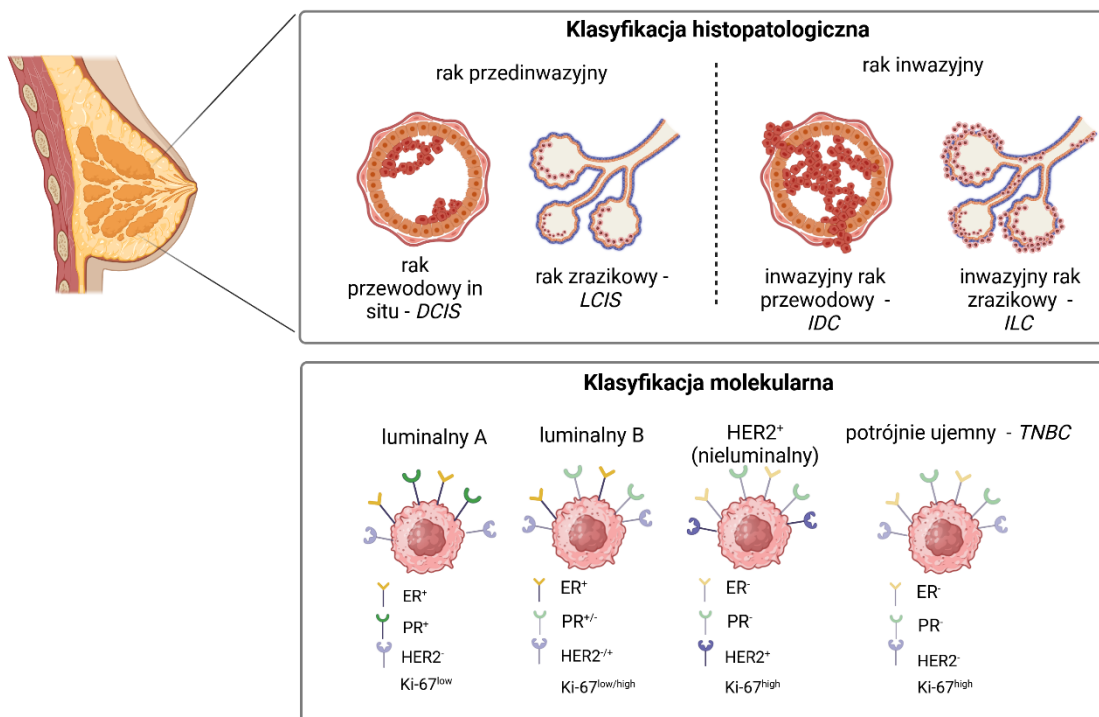
Tabela 1. Klasyfikacja histopatologiczna raków gruczołu sutkowego (źródło zdjęć: <https://www.pathologyoutlines.com> [dostęp 12.01.2024]).

Typ raka		Cechy charakterystyczne	Obraz histopatologiczny (barwienie hematoksylina i eozyna)
Rak przedinwazyjny	Rak przewodowy <i>in situ</i> (DCIS)	małe, jednolite, okrągłe, monomorficzne komórki rosnące w regularnym ułożeniu; jądra mają jednakową wielkość i regularne ułożenie [29]	
	Rak zrazikowy (LCIS)	małe, dość jednolite i luźno ułożone komórki, zajmujące końcowe części przewodów [29]	
Rak inwazyjny	Inwazyjny rak przewodowy (IDC)	szeroki zakres zmienności morfologicznej; komórki nowotworowe są pleomorficzne, różniące się kształtem i rozmiarem z uwydatnionymi jąderkami i licznymi mitozami; w ponad połowie przypadków obserwuje się obszary martwicy i zwapnień [30]	

Typ raka	Cechy charakterystyczne	Obraz histopatologiczny (barwienie hematoksyliną i eozyną)
Inwazyjny rak zrazikowy (ILC)	małe komórki nowotworowe z niewielką atypią, równomiernie rozmieszczone w zrębie w sposób koncentryczny [30]	

Raki gruczołu sutkowego rozróżniane są także w zależności od ekspresji receptora progesteronowego (PR), estrogenowego (ER), ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu-2 (*ang. human epidermal growth factor receptor-2 - HER2*) oraz wskaźnika proliferacji Ki-67. Największą specyficznością w predykcji nowotworu cechują się markery oznaczane bezpośrednio z fragmentu tkanki barwionej metodą immunohistochemiczną. Klasyfikacja molekularna pomaga przydzielić nowotwór do poszczególnych typów: luminalny A, luminalny B, HER2⁺ (nieluminalny), potrójnie ujemny (*ang. triple-negative breast cancer – TNBC*) i typu podstawnego (*ang. basal-like*). Guzy klasyfikowane jako luminalne A to w większości guzy o niskim stopniu złośliwości, wykazujące ekspresję receptorów ER⁺ i PR⁺ oraz niską ekspresję HER2 i Ki-67. Charakteryzują się większą szansą na przeżycie pacjenta i niższym prawdopodobieństwem nawrotu choroby. Guzy luminalne B można podzielić na dwa podtypy: HER⁻ wykazujące ekspresję receptora ER⁺ i Ki-67 przy braku ekspresji PR⁻ i HER2⁻, oraz podtyp HER2⁺ ekspresjonujący ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁺. Guzy klasyfikowane jako HER2⁺ wyróżniają się nadekspresją HER2/ERBB2 i Ki-67 oraz brakiem ekspresji ER⁻ i PR⁻. Guzy typu podstawnego charakteryzują się silną proliferacją i zwiększoną ekspresją receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (*ang. epidermal growth factor receptor – EGFR*). Zauważa się w nich dużą niestabilność chromosomową, co skutkuje mutacjami w genie *BRCA1*. Nowotwory określane jako potrójnie ujemne, posiadają cechy komórek mezenchymalnych i aktywują nacieki komórek odpornościowych. Ten typ nowotworu charakteryzuje się brakiem ekspresji receptorów ER⁻, PR⁻, HER2⁻

i wysoką ekspresją Ki-67. Nowotwory TNBC charakteryzuje słaba wrażliwość na chemioterapię (Rycina 2) [27], [31], [32], [30].



Rycina 2. Klasyfikacja histopatologiczna i molekularna raków gruczołu sutkowego.

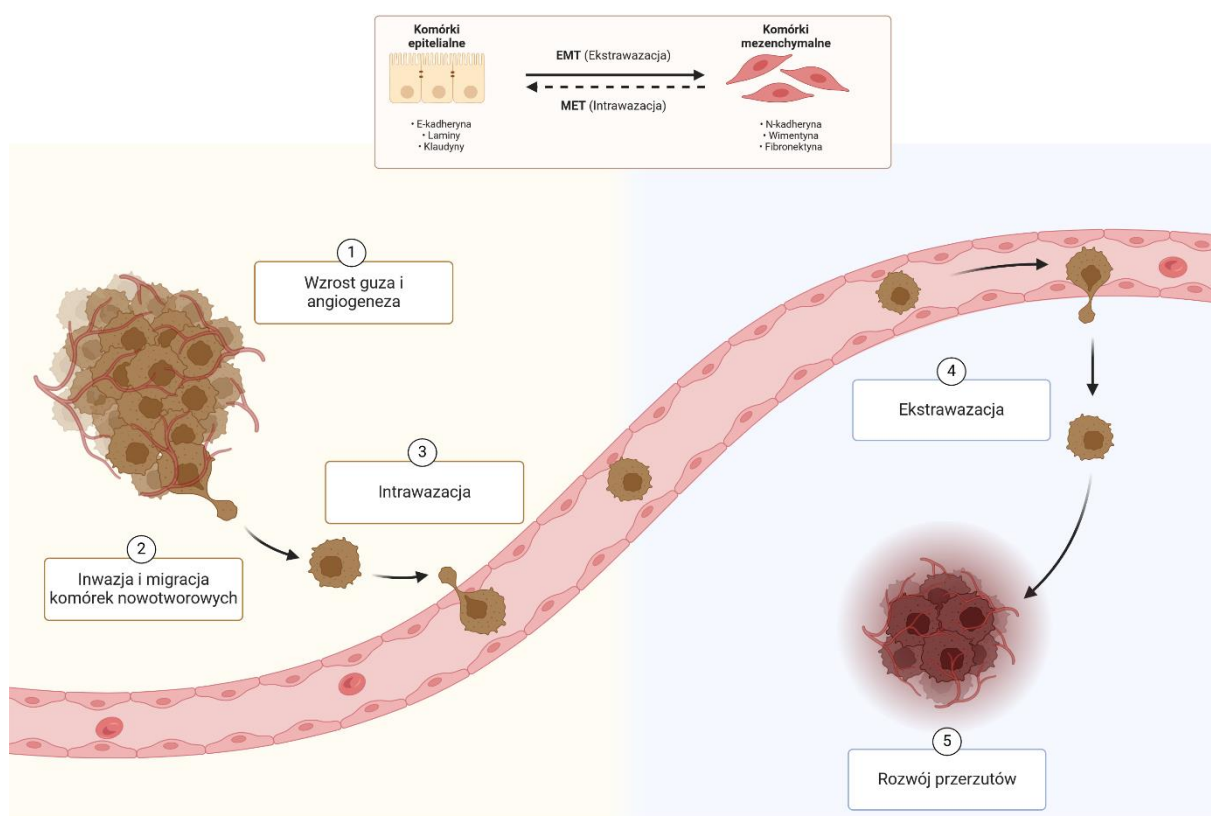
PR - receptor progesteronowy, ER - receptor estrogenowy, HER2 - receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu-2, Ki-67 – wskaźnik proliferacji.

1.4 Proces przerzutowania nowotworów

Komórki w odpowiedzi na stan inny niż fizjologiczny, na przykład podczas rozwijającego się stanu zapalnego, ulegają zmianom, w konsekwencji których dochodzi do ich transformacji określanej mianem metaplastji komórkowej. Zjawisko to wiąże się ze zwiększoną predyspozycją do rozwoju raka oraz z nabywaniem potencjału przerzutowego komórek [1]. Serię następujących po sobie etapów prowadzących od opuszczenia komórek guza pierwotnego aż do zasiedlenia przez nie innych tkanek organizmu i tworzenia przerzutów odległych nazywamy kaskadą przerzutowania [33]. Zdolność do tworzenia przerzutów to cecha nowotworów złośliwych prowadząca zwykle

do niepowodzenia leczenia. Proces przerzutowania jest bardzo złożony i obejmuje wiele mechanizmów komórkowych, w tym odłączenie komórek od guza pierwotnego, inwazję, unikanie nadzoru immunologicznego i regulację mikrośrodowiska guza [34]. Przejście nabłonkowo-mezenchymalne (*ang. epithelial-mesenchymal transition - EMT*) w warunkach fizjologicznych obserwowane jest w rozwoju embrionalnym i gojeniu się ran, jednakże odgrywa także ważną rolę w oporności nowotworu na leczenie, a także w procesie inwazji i tworzeniu odległych ognisk nowotworowych [35]. Niezbędnym etapem w kaskadzie przerzutowania jest wytworzenie nowych naczyń krwionośnych otaczających guz. Nadmierna angiogeneza, indukowana stanem hipoksji nowotworu, umożliwia komórkom nowotworowym przedostawanie się do krążenia ogólnoustrojowego dzięki zwiększonej przepuszczalności naczyń. Drugi etap składa się z ucieczki komórek nowotworowych z masy guza pierwotnego oraz inwazji i migracji przez błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową na drodze jej proteolitycznej degradacji. Jest to pierwszy krytyczny etap procesu przerzutowego, wymagający zmian w adhezji między komórkami, a także w adhezji komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej [36]. Wspomnianym powyżej procesom towarzyszy spadek ekspresji E-kadheryny nabłonkowej, będącej kluczowym składnikiem połączeń przylegających i wzrost ekspresji N-kadheryny, charakterystycznej dla komórek mezenchymalnych. Elementami odpowiadającymi za połączenia i przyleganie komórek nabłonkowych są również kładyny, okładyny i kateniny, a także składniki desmosomalne, takie jak desmogleina i desmokolina. Jako markery komórek mezenchymalnych uznawane są wimentyna, fibronektyna, N-kadheryna i aktyna mięśni gładkich [37]–[40]. Kolejny etap stanowi intrawazacja, czyli przedostanie się komórki nowotworowej do układu krwionośnego poprzez penetrację błony podstawnej i ściany naczynia krwionośnego. Uważa się, że leukocyty oraz płytki krwi, łącząc się w kompleksy z komórkami nowotworowymi przez L- lub P-selektyny, ułatwiają proces wędrowki w naczyniach krwionośnych. Migracja komórek nowotworowych do tkanek odległych możliwa jest dzięki obecności chemokin w tkance docelowej, za pośrednictwem których dochodzi do kierunkowej migracji komórek i aktywacji szlaków regulujących przebudowanie cytoszkieletu. Ostatnim etapem w procesie przerzutowania jest ekstrawazacja, czyli wynaczynienie komórek nowotworowych z układu krwionośnego i inwazja komórek przez błonę podstawną otaczającą tkankę docelową oraz wzrost wtórnego ogniska nowotworowego w miejscu przeznaczenia (Rycina 3). Komórki nowotworowe, promując stan zapalny, tworzą niszę, sprzyjającą wzrostowi

nowotworu [33], [41], [42]. W miejscu przerzutów bardziej korzystnym fenotypem dla komórki jest forma nabłonkowa, stąd konieczność transformacji komórki z jej charakteru mezenchymalnego do nabłonkowego. Proces przeciwny do EMT nazywany jest przejściem mezenchymalno – nabłonkowym (*ang. mesenchymal - epithelial transition – MET*).



Rycina 3. Tworzenie przerzutów i rola przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego – EMT w tym procesie.

1.5 Nowoczesne terapie wykorzystywane w leczeniu pacjentów chorych na raka gruczołu sutkowego

Rak gruczołu sutkowego to jednostka chorobowa, której leczenie ukierunkowane jest na wiele różnych punktów uchwytu. Wynika to ze złożoności cech nowotworów gruczołu sutkowego. Szczególne wyzwanie w terapii raka piersi stanowi oporny na wiele typów leczenia podtyp określany jako potrójnie ujemny. Obecnie wykorzystywane konwencjonalne terapie to między innymi chemioterapia adjuwantowa i neoadjuwantowa, chirurgia, terapia hormonalna i radioterapia. Nowatorskie strategie wykorzystujące

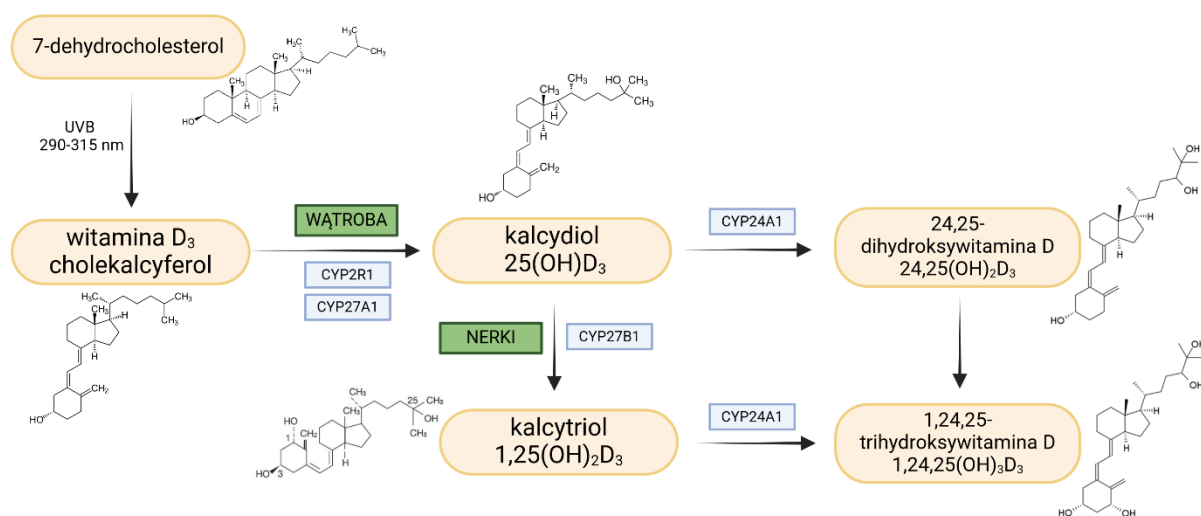
ukierunkowane cząsteczki biologiczne oraz bionośniki do miejsca docelowego, ograniczają uszkodzenia komórek prawidłowych [43]. Zarówno terapie nowatorskie, jak również klasyczne podejścia, testowane są obecnie w terapiach skojarzonych, mogących przynieść pozytywny skutek leczniczy [44]. Jedno z najważniejszych osiągnięć ostatnich kilkudziesięciu lat stanowi immunoterapia nowotworów, co wynika z niepodważalnego wpływu układu odpornościowego na rozwój nowotworów [45]. Naciek komórek immunologicznych pomiędzy podtypami nowotworów piersi jest bardzo zróżnicowany, stąd zastosowanie tego samego podejścia immunoterapeutycznego dla wszystkich pacjentów może nie odnieść oczekiwanych efektów. Wraz ze wzrostem wiedzy na temat inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego oraz ich wykorzystania w leczeniu, wzrosła liczba badań w obszarze immunoterapii, ze szczególnym skupieniem uwagi na receptorze PD-1 (*ang. programmed death-1*) oraz jego ligandzie PD-L1 (*ang. programmed death ligand-1*) [46], [47]. Innymi cząsteczkami wartymi uwagi są między innymi CTLA-4, LAG3 i TIGIT, hamujące limfocyty T lub cząsteczki takie jak OX-40 i 4-1BB stymulujące limfocyty T i zwiększające ich aktywność cytotoksyczną [48]. Na szczególną uwagę zasługują również nowe metody takie jak terapie komórkowe obejmujące limfocyty infiltrujące guz czy terapie wykorzystujące chimeryczne limfocyty T (*ang. chimeric antigen receptor T - CAR-T*) [49], bispecyficzne przeciwciała rozpoznające dwa różne epitopy lub antygeny na komórkach nowotworowych i komórkach układu odpornościowego, co prowadzi do rozpoznania immunologicznego komórek nowotworowych [50] oraz szczepionki przeciwnowotworowe, w których najczęstszym celem są cząsteczki takie jak HER-2, CTA, NY-ESO-1 [51], [52]. Z nadzieją na poprawę wyników w leczeniu pacjentów z nowotworem gruczołu sutkowego stale prowadzone są prace nad skojarzonymi strategiami terapeutycznymi zwiększającymi odsetek odpowiedzi komórkowej i korzyści kliniczne [53].

2. Mechanizm działania oraz metabolizm witaminy D

Witamina D należy do grupy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Jest niezbędna do utrzymania prawidłowej homeostazy i procesów metabolicznych w organizmie. Niedobór witaminy D jest istotnym czynnikiem ryzyka dla rozwoju nowotworów i innych chorób takich jak np. osteoporoza [54]. Głównym źródłem witaminy D dla człowieka jest jej synteza w skórze oraz dieta. Dieta bogata w ryby, jaja

czy fortyfikowane mleko są dodatkowym źródłem dostarczenia witaminy D w formie egzogennej [55].

Wyróżnia się dwie formy witaminy D jakimi są: cholekalcyferol (witamina D₃), produkowany w skórze pod wpływem światła słonecznego oraz ergokalcyferol (witamina D₂) syntetyzowany w roślinach i grzybach. Witaminy D₂ i D₃ różnią się budową łańcuchów bocznych, przez co odmienne jest ich wiązanie z białkami nośnikowymi we krwi i późniejszy metabolizm [56]. Pierwszym etapem przekształceń witaminy D₃ jest hydroksylacja przy udziale cytochromów wątrobowych P450 – CYP2R1 oraz CYP27A1 i utworzenie kalcydiolu - 25(OH)D₃, gromadzonego głównie w wątrobie. Natomiast w nerkach dochodzi do hydroksylacji kalcydiolu poprzez działanie enzymu CYP27B1 i wytworzenie kalcytriolu (1 α ,25(OH)₂D₃). Kalcytriol jest metabolitem witaminy D₃ powszechnie uznawanym za biologicznie aktywny. Kolejnym etapem metabolizmu jest przekształcenie kalcydiolu - 25(OH)D₃ do 24,25-dihydroksywitaminy D₃ (24,25(OH)₂D₃) i kalcytriolu do 1,24,25-trihydroksywitaminy D₃ (1,24,25(OH)₃D₃) przez enzym CYP24A1 (Rycina 4). Wszystkie metabolity dostając się do układu krwionośnego wiązane są z białkiem wiążącym witaminę D (*ang. vitamin D-binding protein - DBP*), albuminą i lipoproteinami. W monitorowaniu klinicznym podaży witaminy D u pacjentów stosuje się obecnie pomiar całkowitego 25(OH)D₃, ponieważ to właśnie kalcydiol, stanowiący główny metabolit witaminy D₃, występuje w osoczu w znacznie wyższym stężeniu niż kalcytriol. Wynika to z biologicznego okresu półtrwania kalcydiolu wynoszącego kilkadziesiąt dni w porównaniu do kilkugodzinnego okresu półtrwania kalcytriolu [56]–[58].

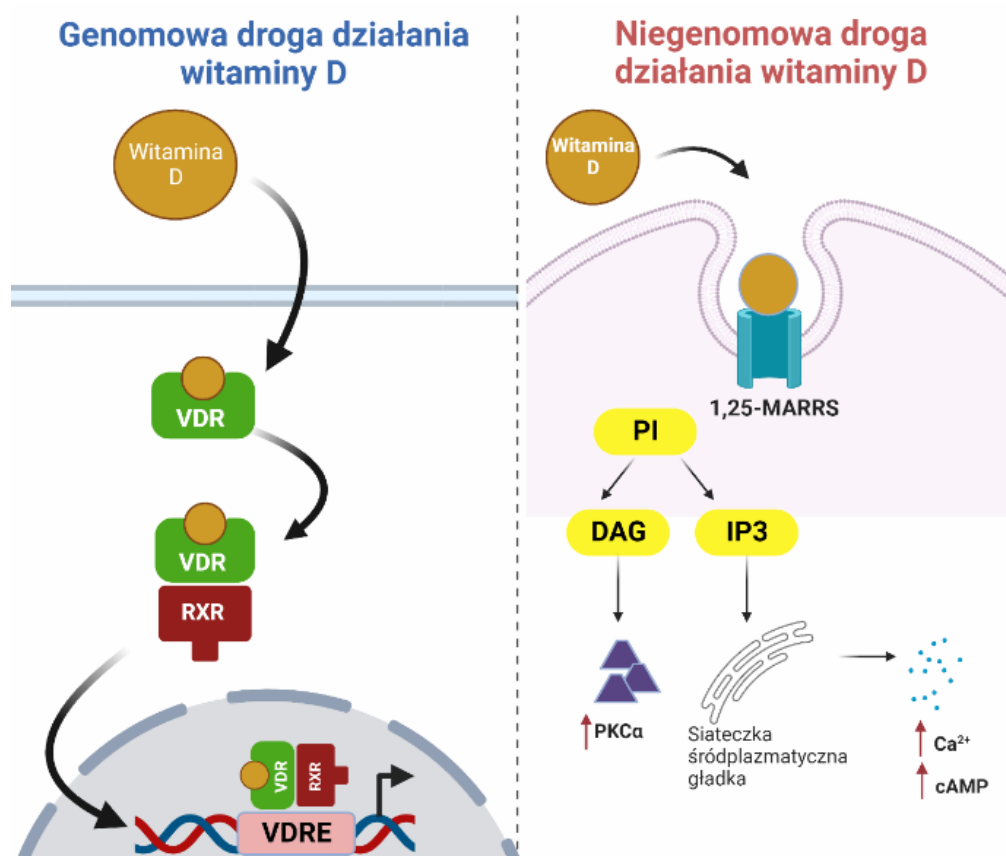


Rycina 4. Schemat szlaku metabolicznego witaminy D₃ (źródło wzorów chemicznych: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> oraz <https://www.chemodex.com> [dostęp 7.12.2023]).

Witamina D zaangażowana jest w utrzymanie homeostazy oraz regulowanie wielu procesów biochemicznych, co związane jest z mechanizmem jej działania. Funkcje genomowe regulowane są poprzez wiązanie witaminy D z jej receptorem VDR (*ang. vitamin D receptor*). Receptor dla witaminy D stanowi specyficzny receptor jądrowy z motywem palca cynkowego z wysoce konserwatywną domeną o wysokim powinowactwie i specyficzności wiązania liganda oraz DNA. Związana ze swoim receptorem witamina D ulegając modyfikacji konformacyjnej tworzy kompleks z receptorem X kwasu retinowego (*ang. retinoic acid X receptor - RXR*). Kompleks VDR/RXR transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie z wysokim powinowactwem wiąże się z elementami odpowiedzi na witaminę D (*ang. vitamin D responsive element - VDRE*) w regionach promotorowych docelowych genów, gdzie rekrutując białka odpowiedzialne za modyfikacje histonów, przebudowę chromatyny i wiązanie polimerazy RNA II, reguluje transkrypcję wielu różnych genów [59]–[61].

Złożoność następujących po sobie etapów w odpowiedzi genomowej wiąże się z wydłużonym czasem odpowiedzi komórkowej. Istnieje jednak mechanizm szybkiej odpowiedzi na witaminę D określany jako mechanizm niegenomowy. Niegenomowa droga działania witaminy D pozwala regulować aktywność kanałów jonowych, fosfataz, kinaz i innych enzymów. Połączenie aktywnej formy witaminy D z jej błonowym receptorem szybkiej odpowiedzi wiążącym steroidy (1,25-D-MARRS/PDIA3/ERp57)

powoduje między innymi aktywację szlaków sygnałowych kinazy MAP, aktywację kinazy białkowej C (PKC), wytwarzanie wtórnych przekaźników, takich jak wapń czy cykliczny AMP. Ostatecznie mechanizm niegenomowy, na drodze wielu przemian, może doprowadzić także do modulowania ekspresji docelowych genów (Rycina 5) [60], [61].



Rycina 5. Schemat genowego i niegenowego działania witaminy D w komórce.

2.1 Znaczenie witaminy D w nowotworach

Kalcytriol wykazujący działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne stał się przedmiotem zainteresowania w onkologii. Jednym z mechanizmów działania kalcytriolu jest modulacja cyklu komórkowego poprzez podniesienie poziomu inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (*ang. cyclin-dependent kinases – CDK*) regulujących przejście między fazami cyklu komórkowego – G0/G1, S, G2 i M [62], [63]. Kalcytriol, dzięki swoim właściwościom, przyczynia się do ograniczenia rozwoju nowotworu. Badania populacyjne, obejmujące chorych na raka jelita grubego, raka piersi

i raka wątrobowokomórkowego sugerują, iż niski poziom witaminy D w surowicy koreluje ze zwiększonym ryzykiem rozwoju i progresji tych nowotworów [63]. Uważa się także, że zwiększone ryzyko rozwoju raka płuc, jelita grubego, gruczołu sutkowego, pęcherza moczowego i chłoniaka występuje u osób z niskim stężeniem witaminy D w surowicy [64]. Ostatnie eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych nad stosowaniem witaminy D łącznie z innymi terapiami przeciwnowotworowymi pozwoliły potwierdzić jej znaczenie przeciwnowotworowe w wielu typach nowotworów [65]. Na przykład w przypadku glejaka wielopostaciowego u szczurów witamina D indukowała programowaną śmierć komórek, autofagię cytotoksyczną oraz hamowała migrację [66], [67]. W badaniach *in vitro* w przypadku szpiczaka mnogiego kalcytriol znosił oporność na bortezomib [68], a w nowotworze pęcherza moczowego zwiększał skuteczność działania cisplatyny [69]. Ponadto, w modelu mięsaka kościopochodnego u myszy hamował wzrost guza i rozwój przerzutów [70].

2.2 Wpływ witaminy D na raka piersi

Obecność receptora dla witaminy D (*ang. vitamin D receptor – VDR*) oraz wpływ witaminy D na funkcjonowanie gruczołu sutkowego zaczęły stanowić przedmiot zainteresowania naukowców i klinicystów od początku lat 80. XX wieku. Już ówczesne badania sugerowały, że obecność receptora dla witaminy D koreluje z lepszym rokowaniem u pacjentek z rakiem piersi [71]. Obecne badania *ex vivo* wskazują na wyższą ekspresję VDR w nowotworach piersi u kobiet w początkowym stadium niż w zaawansowanych stadiach raka piersi. Wiąże się to z utratą wrażliwości na działanie witaminy D wraz z progresją nowotworu na skutek zmniejszającej się ekspresji receptora dla witaminy D [72]–[74]. Podwyższona ekspresja cytoplazmatycznego i jądrowego poziomu VDR koreluje również z cechami nowotworu takimi jak mniejsza wielkość guza, niższy stopień złośliwości, niższa ekspresja białka Ki67, oraz mniejsze ryzyko śmiertelności związanej z nowotworem piersi u chorujących kobiet [74], [75].

W badaniach *ex vivo* przeprowadzonych na materiale pobranym od pacjentek zauważono, że komórki nowotworowe unikają działania kalcytriolu za pośrednictwem zmian w ekspresji enzymów metabolizujących witaminę D. W rakach piersi poziom enzymu CYP27B1 spada, podczas gdy ekspresja CYP24A1 rośnie. Dochodzi wówczas do zmniejszenia lokalnej produkcji aktywnej formy witaminy D [72], [76]. Biorąc pod

uwagę odwrotną korelację poziomu VDR i stopnia agresywności nowotworu, uważa się, iż receptor dla witaminy D może odgrywać kluczową rolę jako czynnik prognostyczny, wskazujący na niższe ryzyko zgonu z powodu nowotworu [77]. Szacuje się, iż optymalne stężenie kalcydiolu w surowicy krwi wynosi 30–50 ng/ml (75–125 nmol/l) [78]. W badaniach klinicznych zauważono, iż istotnie niższy poziom kalcydiolu w surowicy (<25 ng/ml) odnotowano u pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi niż u kobiet zdrowych, choć inne badania, wykluczające ochronny efekt witaminy D, wykazały, iż wyższy jej poziom (≥ 99 nmol/l) u starszych kobiet (średnia wieku 63 lata) korelował z większym ryzykiem zachorowania na nowotwór piersi oraz gorszą przeżywalnością osób chorych [79].

Liczne badania *in vitro* oraz *in vivo* wskazują na przeciwnowotworowe działanie witaminy D na drodze regulacji szlaków różnicowania i proliferacji komórek, apoptozy i inwazji, jak również za pośrednictwem regulowania stanu zapalnego i powstawania nowych naczyń krwionośnych [77], [79], [80]. W zależności od typu raka gruczołu sutkowego, kalcytriol zdolny jest do regulowania apoptozy komórek na drodze różnych szlaków. Badania *in vitro* pokazały, że kierowanie komórek na drogę śmierci pod wpływem kalcytriolu odbywa się dzięki obniżeniu ekspresji czynników antyapoptotycznych, do których należą Bcl-2, Bcl-XL [81]. Silnie konserwatywny proces polegający na usuwaniu przez komórkę dysfunkcyjnych organelli komórkowych i fragmentów komórki zwany inaczej autofagią, również podlega modulacji przez witaminę D. W trakcie progresji nowotworu, komórki gruczołu sutkowego tracą zdolność do prawidłowej autofagii, co związane jest z zależnym od VDR obniżeniem ekspresji kluczowego w tym procesie genu *MAP1LC3B*. W badaniach *in vitro* dowiedziono jednak, iż kalcytriol może znosić działanie VDR na ekspresję *MAP1LC3B* i modulować w ten sposób autofagię komórkową [82].

Stan zapalny towarzyszący procesowi nowotworzenia stymuluje układ immunologiczny, angażując między innymi limfocyty T cytotoksyczne ($CD8^+$). Limfocyty $CD8^+$ naciekające nowotwór (*ang. tumour-infiltrating lymphocytes - TIL*) działają przeciwnowotworowo i stanowią czynnik predykcyjny, wiążący się z lepszym rokowaniem pacjentek chorujących na potrójnie ujemny nowotwór piersi (TNBC) [83]. W badaniach biorących pod uwagę zawartość tłuszczów w diecie wykazano, iż cholekalcyferol powodował zwiększenie liczby i aktywności limfocytów $CD8^+$ TIL u myszy z prawidłowo zbilansowaną dietą, z kolei podanie doustne cholekalcyferolu przy wysokiej podaży tłuszczu w diecie powodowało zmniejszenie rekrutacji limfocytów T

CD8⁺ oraz wzrost wielkości guzów pierwotnych mysiego raka gruczołu sutkowego E0771 [84]. Oprócz wcześniej wspomnianego pozytywnego wpływu witaminy D na proces zapalny towarzyszący nowotworom, istnieją również doniesienia o jej przeciwnym działaniu. Badania wykazują, iż traktowanie myszy cholekalcyferolem powodowało tłumienie działania przeciwnowotworowego limfocytów pomocniczych T typu 1 (Th1), promując proces wzrostu guza pierwotnego u myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu sutkowego 4T1 [85]. Pronowotworowy charakter witaminy D wykazano również w przypadku podskórnego podania kalcytriolu i jego analogów (PRI-2191 i PRI-2205) u myszy w wieku 6-8 tygodni, obserwując zwiększenie potencjału przerzutowego komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1 do płuc. Procesowi temu towarzyszyło zwiększone wydzielanie proprzerzutowego białka osteopontyny (*ang. osteopontin - OPN*) przez komórki guza [86].

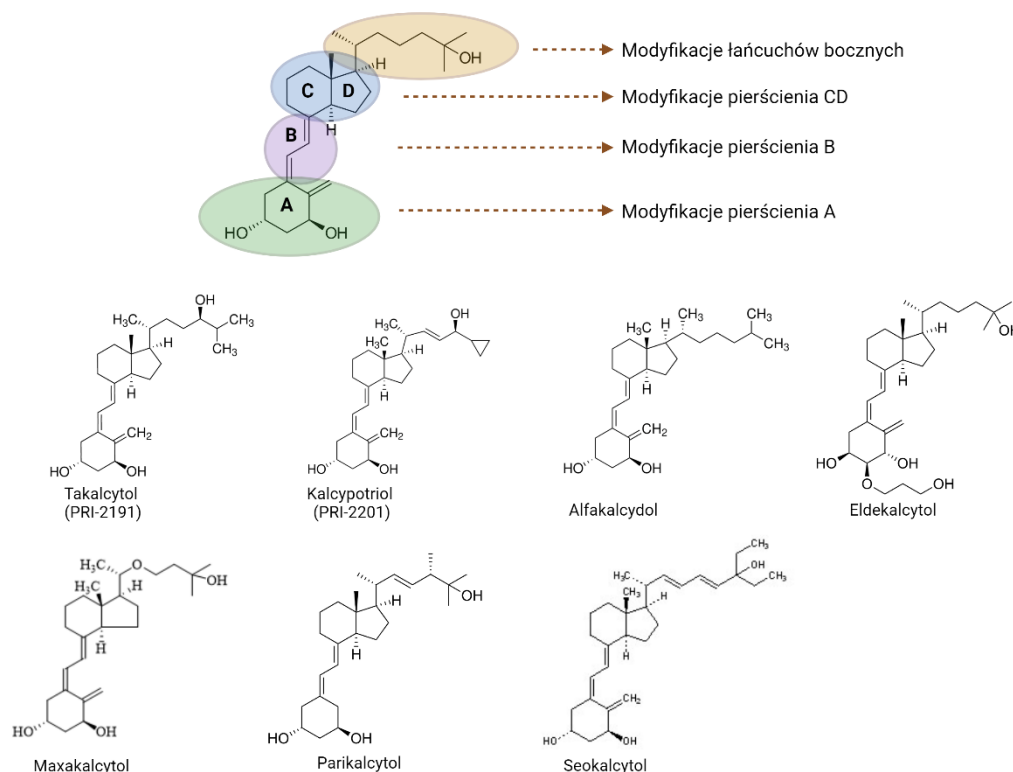
Badania prowadzone na myszach zaszczepionych ludzkimi komórkami MCF7 wykazały, że kalcytriol odgrywa również znaczącą rolę w modulacji poziomu endogennego estrogenu będącego czynnikiem promującym powstawanie i rozwój raka piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Kalcytriol hamował lokalną syntezę estrogenu w mikrośrodku guza poprzez zmniejszenie ekspresji aromatazy w tkance tłuszczowej piersi [87]. Istotną rolę kalcytriolu zauważono również w mechanizmach regulacji procesu EMT w badaniach *in vitro* nad potrójnie ujemnym nowotworem piersi (ludzkie linie komórkowe MDA-MB- 231, Hs578T, BT-549). Powodował zwiększenie ekspresji markera nabłonkowego E-kadheryny i obniżenie ekspresji N-kadheryny w komórkach oraz zahamowanie tworzenia przerzutów do kości. W świetle tych danych kalcytriol uważa się za czynnik przeciwnowotworowy [88]–[90].

2.3 Analogi witaminy D

Ze względu na szereg procesów, w których kalcytriol odgrywa kluczową rolę, między innymi w regulowaniu homeostazy wapnia i fosforanów oraz funkcji immunologicznych, może być uważany za potencjalny lek w leczeniu wielu chorób. Odzwierciedleniem wolnej frakcji metabolitów witaminy D w surowicy jest oznaczenie poziomu kalcydiolu - 25(OH)D₃. Obecnie uznawany jest on za najbardziej rzetelny marker oceny poziomu witaminy D w organizmie. Stężenie kalcydiolu w osoczu wynoszące ≤20 ng/ml (lub 50 nmol/L) wskazuje na niedobór witaminy D [78]. Uzupełnienie niedoboru w formie egzogennej kalcytriolu, zwłaszcza stosowanego

w wysokich dawkach, w konsekwencji przekłada się na wywoływanie niepożądanych skutków ubocznych w postaci zwężenia naczyń krwionośnych, hiperkalcemii (>6 mmol/l lub 10,5 mg/dl) [91] czy hiperkalciurii (> 4 mg/kg/dobę) [92], [93], [94]. Celem uniknięcia występowania skutków ubocznych stworzono strukturalne analogi kalcytriolu posiadające potencjał w zastosowaniu ich w terapiach wielu chorób. Analogi kalcytriolu syntezuje się w celu rozwiązania problemu związanego z obciążeniem gospodarki wapniowej i efektami, które to obciążenie powoduje, ale również podyktowane jest poszukiwaniem metod na poszerzenie okna terapeutycznego działania witaminy D oraz na wyeliminowanie oporności na indukcję apoptozy [95], [96]. Modyfikacje łańcuchów bocznych, pierścienia A, pierścienia B czy pierścienia CD polegające na zmianach w grupach hydroksylowych pozwoliły na stworzenie analogów witaminy D₃, takich jak takalcytol (PRI-2191), kalcypotriol (PRI-2201), alfakalcydol, eldekalcytol, maksakalcytol czy parikalcytol (Rycina 6) [97]. Zmiany wprowadzane w strukturze witaminy D pozwoliły na opracowanie wielu tysięcy analogów kalcytriolu, z czego część stosowana jest powszechnie w różnych dziedzinach medycyny. Oprócz samego kalcytriolu, alfakalcydol oraz eldekalcytol w Japonii stosowane są w terapii osteoporozy oraz osteodystrofii nerkowej [98], kalcypotriol i takalcytol w leczeniu łuszczycy [99], [100], zaś alfakalcydol w leczeniu niedoczynności przysadczycy [101]. Badania, które wskazywały na przeciwnowotworowy charakter kalcytriolu, skłoniły badaczy do poszukiwań analogów posiadających podobne funkcje hamujące rozwój nowotworu, lecz z niższym potencjałem do wywoływania hiperkalcemii. Pierwszym analogiem, którego potencjał przeciwnowotworowy analizowano w badaniach klinicznych w raku piersi, jelita grubego i trzustki był seokalcytol, lecz nie zaobserwowano wyraźnych efektów przeciwnowotworowych [102], [103]. Niepowodzeniem w terapii raka prostaty, zarówno w badaniach *in vitro* jak i badaniach klinicznych, okazał się być również parikalcytol [104], [105]. Badania przeprowadzone na pacjentach wykazały, że działanie kalcypotriolu u chorych na raka piersi również nie jest jednoznaczne. U części pacjentów zauważono istotne zmniejszenie średnicy zmian nowotworowych, podczas gdy w innym badaniu nie stwierdzono odpowiedzi na zastosowaną terapię [106], [107]. Wykorzystanie kalcypotriolu u myszy w terapii czerniaka okazało się blokować rozwój wczesnego raka skóry poprzez regulację układu odpornościowego [108], [109]. Badania nad aktywnością takalcytolu wykazały, iż analog ten charakteryzował się silniejszym działaniem przeciwnowotworowym oraz niższą toksycznością kalcemiczną niż kalcytriol w przypadku mysiego nowotworu gruczołu

sutkowego [110]. Badania *in vitro* wskazują, iż mechanizm stojący za przeciwnowotworowym efektem działania takalcytolu związany jest z hamowaniem proliferacji komórek nowotworowych oraz regulowaniem cyklu komórkowego [111], [112]. Celem zwiększenia skuteczności terapeutycznej analogów witaminy D, prowadzi się badania nad ich łącznym stosowaniem z radioterapią oraz chemioterapeutykami powszechnie wykorzystywanymi w leczeniu przeciwnowotworowym [99].



Rycina 6. Analogi kalcytriolu oraz modyfikacje strukturalne umożliwiające wytworzenie analogów.

3. Osteopontyna jako modulator odpowiedzi immunologicznej

Za zachowanie prawidłowej homeostazy organizmu i utrzymanie odpowiednich proporcji między czynnikami patologicznymi a fizjologicznymi oraz prawidłowe reagowanie na szkodliwe czynniki egzogenne i endogenne w organizmie odpowiada między innymi układ odpornościowy. W odpowiedzi na zaburzenie fizjologicznych funkcji organizmu, w ramach odpowiedzi wrodzonej i nabytej aktywowane są poszczególne komórki układu odpornościowego co prowadzi do odpowiedzi

cytotoksycznej, uwolnienia cytokin czy aktywacji białek poszczególnych szlaków sygnałowych.

Jednym z białek wydzielanych na skutek działania czynników stresogennych jest kodowana przez gen *SPP1*, osteopontyna [113]. Ludzki gen kodujący osteopontynę - *SPP1* znajduje się na chromosomie 4, locus q22.1 i obejmuje 7 eksonów, z kolei myszy gen *Spp1* zlokalizowany jest na chromosomie 5 z regionem kodującym o długości około 6 kb, obejmującym 8 eksonów [114]. OPN jest fosfoproteiną glikozylowaną kwasowo i należy do rodziny małych N-glikoprotein wiążących integryny. Ludzka OPN złożona jest z 314, a mysia z 294 reszt aminokwasowych. Pomimo, że masa cząsteczkowa białka wynosi 35 kDa u ludzi i 32 kDa u myszy, to ze względu na liczne modyfikacje potranslacyjne, jakim poddawane może być to białko, w analizach biochemicznych identyfikowane jest w zakresie od 40 do 80 kDa [115]. Z racji dużej ilości reszt kwasu asparaginowego lub kwasu glutaminowego budujących OPN jest ona silnie naładowana ujemnie i bardzo podatna na liczne modyfikacje potranslacyjne (w tym obróbkę proteolityczną, fosforylację, glikozylację, sulfonowanie i sieciowanie za pośrednictwem transglutaminazy) oraz alternatywny splicing, które prowadzą do powstania różnorodnych pod względem mas i funkcjonalności białek [116], [117]. Pełniąc funkcje białka plejotropowego OPN nie jest białkiem tkankowo-specyficznym, a jej obecność stwierdza się w różnych typach tkanek i komórek, gdzie odpowiada za procesy zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne, do których należą między innymi gojenie ran, biomineralizacja, przebudowa kości, regulacja stanów zapalnych, choroby autoimmunologiczne. Reguluje między innymi procesy takie jak angiogeneza, regeneracja tkanek, immunomodulacja, ale odgrywa również istotną rolę w zaburzeniach neurologicznych czy procesie kancerogenezy. Produkowana jest przez osteoblasty, osteoklasty oraz komórki śródbłonkowe, neuronalne, nabłonkowe oraz odpornościowe w tym komórki T, komórki NK, makrofagi i komórki Kupffera, a działa za pośrednictwem swoistych receptorów, do których należą między innymi integryny takie jak $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$ i $\alpha \nu\beta 6$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ i $\alpha 9\beta 1$ czy glikoproteiny typu I i CD44. OPN identyfikowana jest w osoczu i ulega konstytutywnej ekspresji w narządach takich jak nerki, piersi, mózg, skóra, kości, szpik kostny i pęcherz moczowy [114], [118].

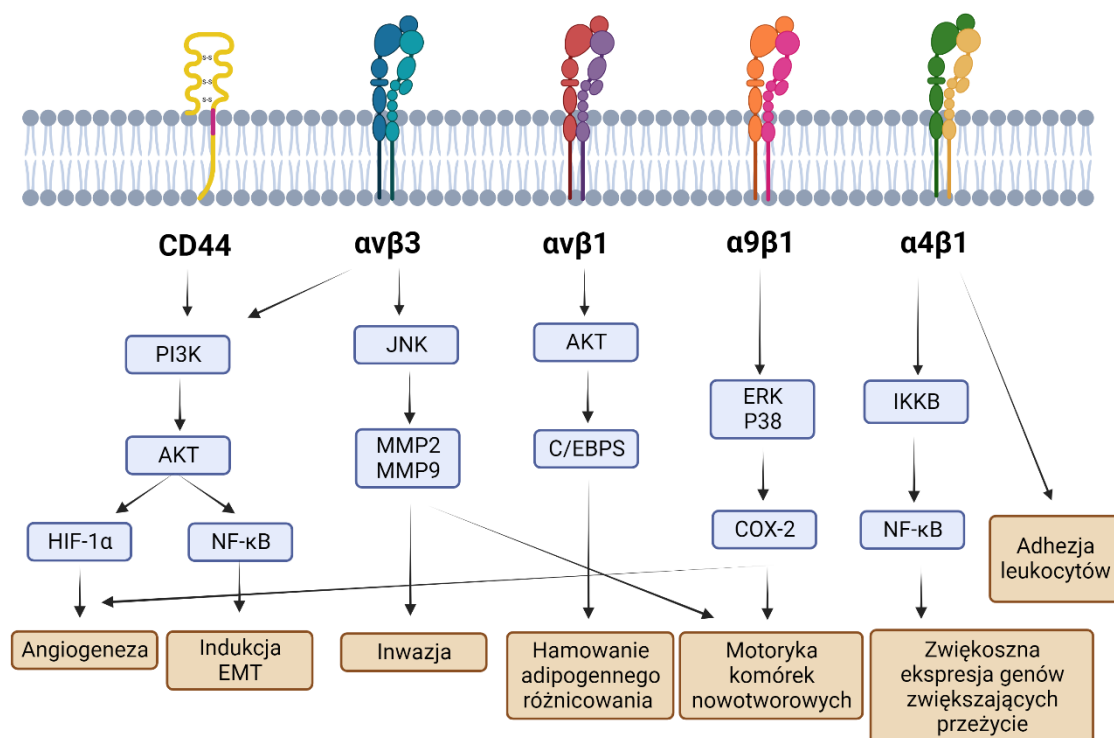
Modyfikacja potranslacyjna polegająca na usunięciu sekwencji sygnałowej białka (delecja N-końcowej sekwencji sygnałowej 16 aminokwasów), zapobiega jego lokalizowaniu się w pęcherzykach wydzielniczych i uwolnieniu poza komórkę, co

powoduje powstanie wewnątrzkomórkowej OPN (*ang. intracellular OPN - iOPN*) zlokalizowanej w cytoplazmie lub jądrze komórkowym. iOPN pełni funkcję białka adaptorowego lub rusztowania w szlakach przekazywania sygnału. Odpowiada również za stabilizację innych białek wewnątrzkomórkowych. OPN zewnątrzkomórkowa (*ang. secreted OPN - sOPN*), ze względu na zachowaną podczas modyfikacji sekwencję sygnałową, kierowana jest poza komórkę, gdzie oddziałuje z receptorami, takimi jak integryny czy glikoproteiny, adhezyny CD44, modulując i aktywując szlaki wewnątrzkomórkowe. OPN poprzez wiązanie z receptorem CD44, a dokładniej z jego podjednostkami CD44s i CD44v, stymuluje inwazję komórek nowotworowych. Połączenie OPN z integryną $\alpha\beta 3$ aktywuje szlak wewnątrzkomórkowy PI3K/Akt/NF- κ B, regulując w ten sposób zależny od NF- κ B/ZEB sygnał do przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) i promuje rozwój nowotworu. z kolei, za pośrednictwem metaloproteinaz MMP2 i MMP9 zwiększa potencjał migracyjny komórek nowotworowych pobudzając proces inwazji komórkowej. Poprzez oddziaływanie z receptorem $\alpha\beta 1$ reguluje ekspresję C/EBP, hamując różnicowanie adipogenne. Po połączeniu OPN z $\alpha\beta 1$ dochodzi do aktywacji szlaków sygnałowych ERK i p38, co stymuluje ekspresję COX-2 w makrofagach i indukuje proces angiogenezy. Interakcje pomiędzy OPN a receptorem $\alpha 4\beta 1$ bezpośrednio wiążą się z promowaniem adhezji leukocytów oraz, za pośrednictwem NF- κ B, prowadzą do zwiększenia ekspresji genów odpowiadających za przeżycie komórek (Rycina 7) [119]–[123]. OPN określana jest jako białko wczesnej aktywacji limfocytów T-1 (*ang. early T lymphocyte activation 1 - Eta-1*), ponieważ aktywowane komórki T silnie ekspresjonują OPN, w szczególności sOPN. Inne komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, takie jak makrofagi czy komórki dendrytyczne, wykazują ekspresję obu podjednostek iOPN oraz sOPN. Z kolei, w komórkach NK dominuje iOPN [114], [118].

Liczne badania wskazują, że wysoki poziom OPN często skorelowany jest ze złośliwym fenotypem nowotworu, gorszym rokowaniem u pacjentów chorujących na raka i słabą odpowiedzią na leczenie [124]. Wysoka ekspresja OPN zdaje się być znacząca w przypadku wielu nowotworów, w tym w raku skóry, głowy i szyi, tarczycy, piersi, płuc, przełyku, żołądka, wątroby, trzustki, jelita grubego, nerek, pęcherza moczowego, prostaty, jajnika, czerniaku, szpiczaku, kostniakomięsaku i glejaku wielopostaciowym. Zidentyfikowana w osoczu i tkance nowotworowej OPN uczestniczy w regulowaniu stopnia zaawansowania, wielkości guza, inwazyjności, przerzutowaniu i stanowi słaby prognostyk przeżycia u pacjentów onkologicznych [116]. W raku piersi

OPN działa za pośrednictwem receptorów CD44 i $\alpha v \beta 3$, rekrutuje i aktywuje fibroblasty, a także promuje proces zapalny i sprzyja wzrostowi nowotworu [125]. OPN odpowiada za promowanie angiogenezy poprzez regulację wydzielania czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor* – VEGF) w komórkach śródbłonka. Regulowanie przerzutowania komórek nowotworowych za pośrednictwem OPN odbywa się przez wpływ na aktywność kinazy 1 i 2 regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2) oraz aktywowaniem szlaków kinazy 3-fosfatydyloinozytolu/kinazy białkowej B (PI3K/AKT) [126], [127]. Ze względu na charakter oraz poznane mechanizmy działania OPN, uważa się, że białko to może stanowić dobry cel terapeutyczny przy wykorzystaniu tradycyjnych terapii przeciwnowotworowych, takich jak radioterapia czy chemioterapia w skojarzeniu z ukierunkowaną terapią celującą w OPN [124].

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, stwierdzić można, że charakter działania OPN jest dwukierunkowy. Z jednej strony, ulega ekspresji w prawidłowo funkcjonujących komórkach oraz reguluje takie procesy jak adhezja komórek, migracja, proliferacja, przeżycie czy różnicowanie, przez co jest kluczowym elementem w utrzymaniu wielu funkcji fizjologicznych. Z drugiej strony, aktywności OPN przypisuje się stymulację wzrostu guza, inwazyjności komórek nowotworowych, EMT i powstawania przerzutów, a także supresję immunologiczną. Ze względu na mechanizm działania OPN, niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań zgłębiających wiedzę na temat tego białka. Co więcej, pokłada się duże nadzieje w wykorzystaniu OPN jako celu terapeutycznego w leczeniu przeciwnowotworowym [116].



Rycina 7. Efekty oddziaływań OPN ze swoistymi receptorami.

4. Udział wybranych komórek układu odpornościowego w progresji nowotworów

Sprawny układ odpornościowy jest niezbędny w rozpoznawaniu nieprawidłowych komórek rozwijających się w organizmie. Wyspecjalizowane komórki układu odpornościowego pełnią funkcję nadzoru immunologicznego, rozpoznają i niszczą patogeny oraz nieprawidłowe komórki. Komórki nowotworowe zdolne są do unikania odpowiedzi ze strony układu odpornościowego między innymi za pośrednictwem mechanizmu określanego jako ucieczka immunologiczna. Zmniejszenie lub całkowita utrata ekspresji białek stanowiących antygeny, za pośrednictwem których komórki układu odpornościowego zdolne są do rozpoznania komórek nowotworowych jest jednym z mechanizmów ucieczki immunologicznej. Układ odpornościowy odgrywa także kluczową rolę w kształtowaniu mikrośrodowiska nowotworu (*ang. tumor microenvironment - TME*). Przeżycie i funkcjonowanie komórek nowotworowych, jak również nabycie inwazyjnego fenotypu umożliwiające rozprzestrzenianie się komórek

do odległych miejsc od miejsca pierwotnego, regulowane jest przez interakcje między składnikami strukturalnymi a komórkami tworzącymi wspólnie mikrośrodowisko guza [128], [129], [130]. W zależności od typu nowotworu skład mikrośrodowiska może różnić się, lecz wspólnymi cechami są komórki zrębowe, naczynia krwionośne, macierz zewnątrzkomórkowa oraz komórki odpornościowe [131].

Komórki występujące w TME, odgrywające znaczącą rolę w rozwoju nowotworu to komórki dendrytyczne, limfocyty naciekające nowotwór, makrofagi M2, komórki NK oraz fibroblasty związane z nowotworem [132]. Komórki dendrytyczne oraz makrofagi obecne w TME, poprzez wydzielanie czynników hamujących aktywność limfocytów T i promujących rozwój naczyń krwionośnych, sprzyjają wzrostowi guza i indukują immunosupresję [128], [129]. Fibroblasty związane z nowotworem ze względu na swoją funkcję, modulują środowisko nowotworu, wspomagając procesy naprawcze w organizmie, a tym samym przyczyniając się do immunosupresji mikrośrodowiska nowotworowego, co sprzyja wzrostowi nowotworu i przerzutom. W odpowiedzi na stan zapalny w otoczeniu guza, fibroblasty zdolne są do rekrutowania limfocytów T oraz makrofagów M2 i modulowania ich polaryzacji [133]. Komórkami efektorowymi, zdolnymi do rozpoznawania i zabicia nowotworowych komórek macierzystych oraz nie zróżnicowanych lub słabo zróżnicowanych komórek nowotworowych, wykazujących niższy poziom ekspresji cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy I, są komórki NK. Komórki te przyczyniają się do uwolnienia czynnika martwicy nowotworu, perforyny czy granzymu B i poprzez indukcję śmierci komórkowej, powodują efekt przeciwnowotworowy. Działanie przeciwnowotworowe komórek NK polega również na bezpośredniej i zależnej od przeciwciał cytotoksyczności komórkowej oraz regulacji funkcji innych komórek poprzez wydzielanie cytokin i chemokin [134],[135]. Limfocyty T stanowią 75% wszystkich limfocytów naciekających nowotwór (*ang. tumor infiltrating lymphocytes – TIL*). Uważa się, że obecność limfocytów CD8⁺ koreluje z korzystnym rokowaniem pacjentów chorujących na nowotwór, a obecność wysokiego odsetka komórek CD8⁺ jest powiązana z wydłużoną przeżywalnością chorych. Fakt ten wynika z cytotoksycznego mechanizmu, za pomocą którego TIL kontrolują wzrost nowotworu. Dla optymalnego działania komórek CD8⁺ niezbędna jest obecność limfocytów CD4⁺, a ich prawidłowy stosunek jest kluczem do odpowiedniego funkcjonowania limfocytów naciekających nowotwór. Zaburzenie tego stosunku może być różne w zależności od typu nowotworu i skutkować wspomnianą wcześniej ucieczką komórek nowotworowych spod kontroli układu odpornościowego i promowaniem

powstawania przerzutów [136], [137]. Subpopulacja limfocytów T regulatorowych działając immunosupresyjnie zmniejsza indukcję i proliferację limfocytów T [138], tłumiąc reakcje zapalne, dodatkowo przez wydzielanie czynników wzrostu wspiera przeżycie komórek nowotworowych [132].

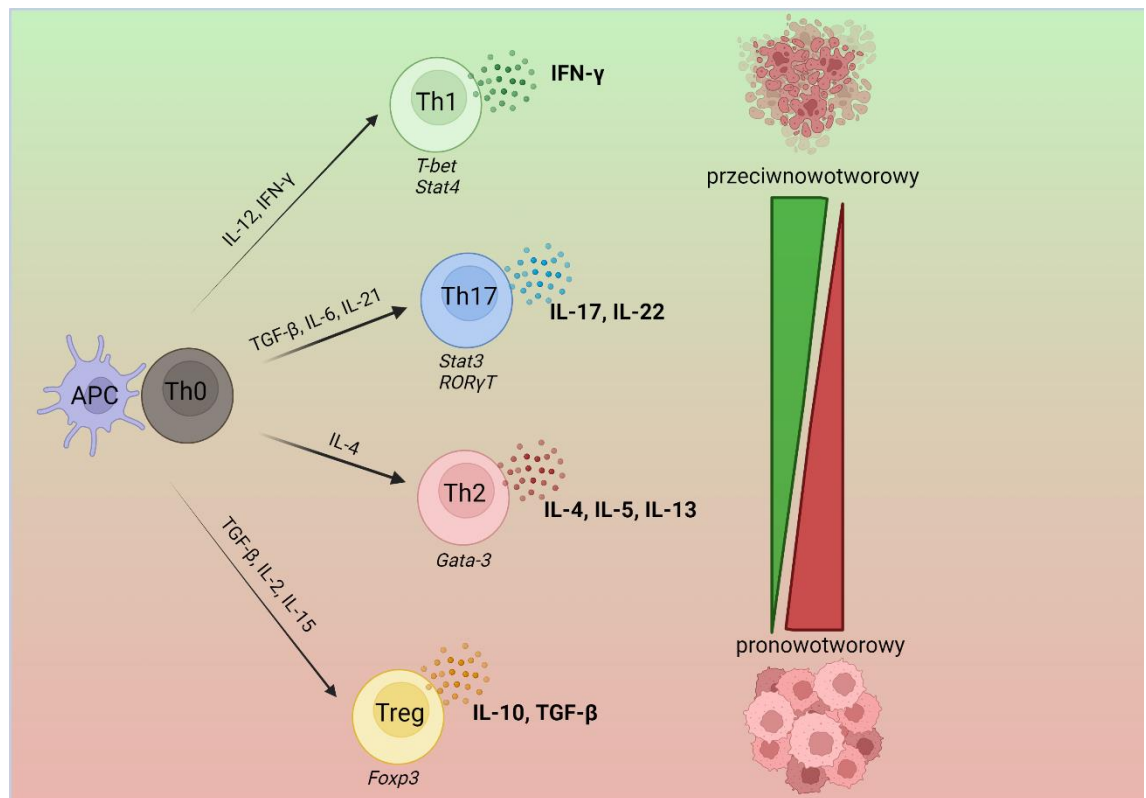
4.1 Rola limfocytów Th17

Pierwsza klasyfikacja limfocytów T pomocniczych ($CD4^+$) dzieliła je na dwa podzbiory – komórki Th1 oraz Th2, różniące się efektem działania oraz ekspresją wybranych cytokin [139]. Usystematyzowano wówczas, że komórki Th1 wytwarzające IFN- γ , różnicują w obecności IL-12 i odpowiedzialne są za sprawowanie wewnątrzkomórkowej kontroli nad patogenami. Natomiast komórki Th2 wytwarzające IL-4, IL-5 oraz IL-13, różnicują pod wpływem działania IL-4 oraz IL-2, a ich funkcja polega na ochronie komórek przed patogenami zewnątrzkomórkowymi [140]. Lata 90. XX wieku przyniosły nowe odkrycia identyfikując kolejny podzbiór komórek pomocniczych $CD4^+$ - komórki Th17 [141]. Subpopulacja limfocytów Th17 powstaje na skutek polaryzacji dziewiczych komórek T $CD4^+$ w obecności transformującego czynnika wzrostu β (TGF β) i IL-6, a głównym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za ekspresję genów kluczowych dla komórek Th17 jest sierocy receptor γ t związany z receptorem kwasu retinowego (ROR γ t) (Rycina 8) [142]–[144]. Pierwszy sygnał do aktywacji komórek Th17 pochodzi od receptorów CD28 i ICOS [145]. Drugi sygnał aktywacji pochodzi z synergistycznego działania TGF β i IL-6. IL-6 zdaje się być kluczową cytokiną w procesie różnicowania komórek Th17, ponieważ hamuje ona różnicowanie komórek Foxp3 $^+$ (limfocytów T regulatorowych), które dzielą z komórkami Th17 drugi czynnik stymulujący jakim jest TGF β [142]. Udowodnionym jest, iż utrata IL-6 podczas odpowiedzi autoimmunologicznej skutkuje zwiększeniem ilości limfocytów T regulatorowych [146]. TGF β jest czynnikiem, hamującym różnicowanie komórek Th1 i wydzielanie IFN- γ , zwiększając szansę na różnicowanie limfocytów Th17 [144].

Komórki Th17 zdolne są głównie do wydzielania IL-17. Wyróżnia się 6 podtypów cytokin należących do grupy IL-17 – IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, działających za pośrednictwem swoistych receptorów (IL-17RA - IL-17RF), aczkolwiek najlepiej zbadaną jest IL-17A [147]. IL-17 określana jest jako cytokina prozapalna, a jej

funkcję opisano w ludzkich chorobach autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS; w modelu mysim - zapalenie stawów indukowane kolagenem (*ang. Collagen-Induced Arthritis – CIA*)) czy stwardnienie rozsiane (w mysim modelu - eksperymentalne, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (*ang. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – EAE*)) [148]. Mimo, iż IL-17 jest cytokiną wytwarzaną głównie przez limfocyty Th17, nie są one jedynymi komórkami zdolnymi do produkcji tej cytokiny. Za uwalnianie IL-17 odpowiedzialne są również komórki takie jak limfocyty T CD8⁺, limfocyty T $\gamma\delta$, wrodzone komórki limfoidalne (ILC), komórki NK [149]–[155]. Badania opisujące negatywną rolę IL-17 w patogenezie chorób doprowadziły do powstania nowych terapii wykorzystujących przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko IL-17A, jak również IL-17F, IL-17RA lub IL-23, co umożliwiło leczenie niektórych chorób autoimmunologicznych, między innymi łuszczycy, łuszczycowego zapalenia stawów i zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa [156]–[159].

Wspomniane wcześniej badania dowodzą patologicznej funkcji komórek Th17 jako tych, które głównie wydzielają IL-17. Jednakże, komórki Th17, a w szczególności produkowane przez nie IL-17A i IL-17F uczestniczą również w utrzymaniu homeostazy tkanek, pełniąc rolę ochronną przed niektórymi infekcjami, szczególnie tymi wywoływanymi przez patogeny grzybicze u ludzi. W przypadku infekcji grzybiczych *Candida* uważa się, że IL-17 pełni kluczową rolę ochronną. Zastosowanie terapii neutralizujących IL-17, prowadziło do częstszego występowania od łagodnej do umiarkowanej kandydozy jamy ustnej [156].



Rycina 8. Schemat różnicowania komórek T oraz ich charakter w procesie nowotworowym. APC - komórka prezentująca antygen; Th – limfocyt T pomocniczy; IL – interleukina; TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta; *Stat4* - signal transducer and activator of transcription 4; *Stat3* - signal transducer and activator of transcription 3; *ROR γ T* - sierocy receptor γ t związany z receptorem kwasu retinowego.

4.1.1 Znaczenie komórek Th17 w progresji nowotworów

Mikrośrodowisko nowotworu, poprzez wzajemne interakcje pomiędzy komórkami i/lub składnikami macierzy komórkowej, jest bezpośrednio związane z rozwojem i progresją lub regresją nowotworu. Komórki układu odpornościowego, w tym limfocyty Th17, w zależności od typu nowotworu mogą pełnić funkcję przeciwnowotworową lub pronowotworową. Nie jest jeszcze pewne, czy komórki Th17 są indukowane, rekrutowane czy przekształcane z innych komórek T w otoczeniu nowotworu. Jednakże postuluje się, że za obecność limfocytów Th17 w mikrośrodowisku guza odpowiadają mechanizmy indukcji różnicowania z udziałem TGF- β i IL-6, aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT3, rekrutacja Th17 w odpowiedzi na chemokiny, takie jak CCL20, CCL17, CCL22, MIF, RANTES i MCP1 czy konwersja

z innych typów limfocytów [142], [160]–[163]. W badaniach prowadzonych na myszach wykazano, iż zwiększenie ekspresji cząsteczek charakterystycznych dla limfocytów Th17, takich jak IL-17A, IL-17F, IL-22 i GM-CSF oraz zmniejszenie ekspresji PD-L1 możliwe jest dzięki zastosowaniu aktywatorów dla czynnika transkrypcyjnego ROR γ [164]. Plastyczność komórek Th17 umożliwia ich konwersję w kierunku przeciwnowotworowych limfocytów Th1. Nie jest jeszcze pewne, czy transformacja ta zachodzi w mikrośrodku nowotworu, czy też komórki Th17/Th1 rekrutowane są do otoczenia nowotworu. Badania pokazują, że polaryzacja komórek Th17 prowadzi do wytworzenia cząsteczek związanych z komórkami Th1, takich jak INF- γ i T-bet [165]. Komórki Th17 odpowiedzialne są za promowanie procesu zapalnego w przypadku raka prostaty, jajnika oraz czerniaka [166]–[168], polegającego na rekrutacji komórek układu odpornościowego i wytwarzaniu cytokin prozapalnych, w szczególności INF- γ . W ten sposób pełnią funkcję pronowotworową. Wiadomo również, że odsetek komórek Th17 jest obniżony w środowisku nowotworu złośliwego w porównaniu z guzem łagodnym [169]. Korelację nacieku komórek Th17 z lepszym przeżyciem u pacjentów, zaobserwowano w przypadku osób chorujących na raka jajnika, prostaty, płuc, jelita grubego, trzustki oraz raka wątrobowokomórkowego [170]. W przypadku raka jajnika, odnotowano, iż Th17 działały synergicznie z INF- γ w indukcji CXCL9 i CXCL10, które rekrutowały komórki T CD8⁺ do mikrośrodku nowotworu [166]. W mysim modelu czerniaka, komórki zróżnicowane do Th17 były efektywniejsze w zwalczaniu nowotworu niż spolaryzowane komórki Th1, gdzie efekt był w dużej mierze zależny od INF- γ . Zauważono również wyższą skuteczność przeciwnowotworową, związaną ze wzrostem liczby aktywowanych limfocytów T CD8⁺ [171], [172].

Biorąc pod uwagę plastyczność limfocytów Th17, ich rola w procesie nowotworowym nie jest jednoznaczna. Uważa się, że za charakter pronowotworowy tych komórek odpowiada indukcja ekspresji IL-6, która odpowiedzialna jest za aktywację onkogennych przekźników sygnału oraz czynnika STAT3, regulującego geny proangiogenne. IL-17A łącząc się ze swoistym receptorem IL-17RA działa pronowotworowo wskutek aktywacji szlaków sygnałowych ERK, p38 MAPK i NF- κ B [173], [174]. Produkowana przez komórki Th17 cytokina IL-17 jest silnie ekspresjonowana w nowotworach wątroby, żołądka, okrężnicy, trzustki, piersi, płuc i jajnika oraz dodatnio koreluje z agresywnością nowotworu złośliwego [175]. Obecność IL-17A koreluje z przerzutami i złym rokowaniem także w przypadku raka wątrobowokomórkowego. Odnotowano, że poziom IL-17A jest istotnie wyższy we krwi

pacjentów z przerzutami niż u pacjentów bez przerzutów. Prawdopodobny mechanizm stojący za tym niekorzystnym działaniem wiąże się z tym, że IL-17A może znacząco zwiększać szybkość migracji komórek poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i zwiększać poziom metaloproteinaz MMP2 i MMP9 [176]. W innych badaniach nad rakiem wątrobowokomórkowym wykazano, iż inwazja i migracja komórek promowana jest przez zależną od Akt aktywację IL-6/STAT3, co prowadzi do zwiększenia ekspresji IL-8, MMP2 i VEGF [174]. Proces przerzutowania komórek raka płuc na drodze przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego modulowany jest przez IL-17 za pośrednictwem NF- κ B. Badania nad nowotworem płuc pokazały, że komórki Th17 i IL-17 stymulują angiogenezę i proliferację komórek nowotworowych. Działając poprzez transdukcję sygnalizacji NF- κ B i ERK indukowały ekspresję, między innymi G-CSF, Bv8 i VEGF [177].

Tak kontrastująca rola limfocytów Th17 w progresji nowotworów wynika z możliwości przenikania komórek Th17 do różnych obszarów guza i dostosowywania się do nich w funkcjonalnie odmienny sposób. Mimo, że działanie komórek Th17 opisuje się głównie w procesach promujących powstawanie nowotworów, to ważnym, wartym podkreślenia jest ós działania Th17/Th1 oraz zdolność konwersji komórek Th17 w kierunku przeciwnowotworowych komórek Th1 [178].

4.1.2 Wpływ witaminy D na limfocyty Th17

Aktywna forma witaminy D jaką jest kalcytriol, może modulować ekspresję IL-17A w limfocytach T, zarówno ludzkich, jak i mysich, a receptor dla tej witaminy – VDR ulega silnej ekspresji w limfocytach Th17. Fakt ten może sugerować, iż witamina D lub jej analogi mogą mieć wpływ na regulację aktywności limfocytów Th17. Jednakże, niektóre badania wskazują na brak korelacji pomiędzy obecnością komórek Th17 a poziomem krążącego 25(OH)D₃. Badania prowadzone na pacjentach chorujących na stwardnienie rozsiane pokazały, iż udział poszczególnych frakcji komórek T pomocniczych nie jest zależny od suplementacji witaminą D [179], [180]. W badaniu dotyczącym układowego toczenia rumieniowatego występującego we wczesnym dzieciństwie zaobserwowano, że poziom witaminy D ujemnie korelował z odsetkiem limfocytów Th17, lecz poziom 25(OH)D₃ był dodatnio skorelowany z odsetkiem komórek Treg [181]. Podobne zależności zauważono u pacjentek z niewyjaśnioną

nawracającą utratą ciąży (*ang. unexplained recurrent pregnancy loss - URPL*), u których stwierdzono, iż suplementacja witaminą D powoduje zwiększenie odsetka limfocytów Treg i ekspresji genu *FOXP3*, oraz zmniejszenie odsetka limfocytów Th17 i ekspresji *ROR γ t* [182]. Spójny z wcześniej wymienionymi badaniami wynik otrzymano w badaniu *ex vivo* ludzkich limfocytów T, gdzie traktowanie komórek CD4⁺ kalcytriolem powodowało zmniejszenie polaryzacji w kierunku limfocytów Th17 [183]. Zwiększenie produkcji cytokin przez komórki Treg i Th2 (IL-4, IL-10) oraz obniżenie poziomu cytokin prozapalnych IFN- γ i IL-17 produkowanych przez komórki Th1 i Th17 zauważono po zastosowaniu kalcytriolu w leczeniu zapalenia przyzębia u myszy [184]. Immunomodulujący wpływ aktywnej formy witaminy D na komórki T pomocnicze pokazało badanie, w którym kalcytriol w obecności komórek dendrytycznych, w środowisku zapalnym promował różnicowanie komórek w kierunku Th2, zmniejszając potencjał do różnicowania się limfocytów Th17 [185]. Kilka badań nad EAE pokazało, że kalcytriol zmniejszał liczbę limfocytów Th17. Mechanizmy, za pośrednictwem których dochodziło do owej modulacji polegały na hamowaniu wytwarzania IL-17F w sposób zależny od VDR lub hamowaniu transkrypcji genu *Il17* poprzez blokowanie czynnika jądrowego dla aktywowanych limfocytów T (*ang. nuclear factor of activated T cells - NFAT*), rekrutację deacetylazy histonów i wiązania czynnika transkrypcyjnego związanego z Runt (*ang. Runt-related transcription factor 1- Runx1*) lub za pośrednictwem mechanizmu zaprogramowanej śmierci komórki [186]–[188].

Powyższe badania sugerują, iż kalcytriol wykazuje hamujące działanie w stosunku do limfocytów Th17. Nie wszystkie badania jednak, potwierdzają tę zależność. Działanie kalcytriolu i jego analogów – PRI-2191 (takalcytolu) oraz PRI-2205 na komórki mysiego raka gruczołu sutkowego u myszy młodych (model przedmenopauzalny) powodowało zwiększoną ekspresję genów charakterystycznych dla komórek Th17, takich jak *Il17a*, *Il17re*, *Il1r1*, *Il21*, *Rora*, *Rorc* [189]. Z kolei, u myszy starych poddanych owariektomii (model pomenopauzalny), obarczonych tymi samymi komórkami nowotworowymi i traktowanych takalcytolem, lecz tylko we wczesnym etapie choroby, dochodziło do stymulacji ekspresji genów związanych z różnicowaniem Th17. Wyindukowane *ex vivo* iTh17 od myszy młodych produkowały większe ilości IL-17A na skutek działania takalcytolu, z kolei, u myszy starych zaobserwowano odwrotny efekt [190]. Wynik ten może wskazywać na zależny od wieku i etapu progresji guza wpływ kalcytriolu i jego analogów na rozwój limfocytów Th17 u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego.

4.1.3 Wpływ osteopontyny na limfocyty Th17

Stymulowane limfocyty T na wczesnym etapie tego procesu wykazują ekspresję genu kodującego osteopontynę. Z tego powodu, OPN jest znana również pod nazwą Eta-1, czyli białko wczesnej aktywacji limfocytów T - 1. OPN wytwarzana jest również przez inne komórki układu odpornościowego i zdolna jest do stymulacji różnych komórek tego układu. Aktywacja komórek dendrytycznych (*ang. dendritic cells* - DC) przez OPN prowadzi do wytworzenia przez nie TNF- α i IL-12, a dziewicze limfocyty T pomocnicze stymulowane przez aktywowane DC wytwarzają cytokiny charakterystyczne dla komórek Th1 [191].

Ekspresja genu dla OPN w aktywowanych limfocytach T podlega regulacji przez T-bet, należący do rodziny czynników transkrypcyjnych T-box, co, w konsekwencji, kieruje ścieżkę różnicowania dziewiczych limfocytów T w kierunku komórek Th1 [192]. Z kolei, w makrofagach ekspresja OPN regulowana jest przez heterogeniczne jądrowe rybonukleoproteiny (*ang. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* - hnRNP) [193]. Konwencjonalne komórki dendrytyczne wytwarzające wewnątrzkomórkową OPN odpowiadają za promowanie odpowiedzi immunologicznej, w którą zaangażowane są komórki Th17. Mechanizm ten polega na hamowaniu ekspresji IL-27, która odpowiada za tłumienie rozwoju Th17. Wykazano, iż DC z obniżoną ekspresją OPN charakteryzują się wydzielaniem dużych ilości IL-27, co w konsekwencji, powoduje słabszą odpowiedź ze strony limfocytów Th17 [194]. Hamowanie komórek Th17 może zachodzić przez zależne od OPN wydzielanie IFN typu I i przez plazmocytoidalne DC po aktywacji TLR7 lub TLR9, co skutkuje pobudzeniem receptora IFNAR (*ang. interferon- α/β receptor*) na powierzchni konwencjonalnych komórek dendrytycznych [195]. Ekspresja genu *Spp1* kodującego OPN okazała się być znacząco zwiększona w indukowanych Th17 izolowanych od myszy młodych obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 traktowanych takalcytolem. Wynik ten dodatnio korelował z ekspresją genów związanych z prozapalnym fenotypem tych komórek [190]. Zauważono, że zastosowanie kalcytriolu lub jego analogów u myszy młodych obarczonych rakiem gruczołu sutkowego powoduje wzrost poziomu OPN w tkance guza, podczas gdy u myszy starszych poddanych owariektomii w celu indukcji statusu hormonalnego odpowiadającego modelowi pomenopauzalnemu, spadek poziomu OPN [86], [196]. Bezpośredni wpływ OPN na różnicowanie Th17 wynika z interakcji z jej receptorami. Z kolei, bezpośredni wpływ kalcytriolu na OPN w różnych komórkach wynika z genomowego działania

kalcytriolu w obszarze elementów odpowiedzi na VDR w genie *Spp1* [197], [198]. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, wzrost parametrów związanych z ekspresją OPN w tkance nowotworowej 4T1 i komórkach indukowanych limfocytów Th17 u myszy młodych, może wskazywać na ważną rolę OPN w pozytywnej stymulacji komórek Th17 i wytwarzania prozapalnej IL-17A u tych myszy [190], [196].

Wpływ OPN na działanie limfocytów Th17, zarówno bezpośredni jak i z udziałem komórek dendrytycznych stanowi jeden z czynników pobudzających te komórki do działania w określonych warunkach. Zdolność OPN do regulowania odpowiedzi komórek Th17 może okazać się istotna dla rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych [79].

4.2 Rola limfocytów Th1

W odpowiedzi na wydzielanie specyficznych dla nowotworu czynników przez tkankę guza, antygeny nowotworowe ulegają fagocytozie przez komórki dendrytyczne i prezentowane są na ich powierzchni w postaci cząsteczek MHC klasy II. Docelowe limfocyty T, które na skutek prezentacji antygeny dojrzewają, zostają aktywowane i stają się zdolne do pełnienia funkcji efektorowych [199]. Jednym z głównych podtypów komórek T, na temat którego pierwsze badania pochodzą z lat 80. XX wieku są limfocyty Th1 [139].

Powstawanie limfocytów Th1 zależne jest od IFN- γ i IL-12. Z kolei, czynnikami transkrypcyjnymi, kluczowymi w różnicowaniu tych komórek są STAT1, STAT4 i T-bet. Wydzielane cytokiny, charakterystyczne dla komórek pomocniczych typu 1 stanowią IFN- γ i IL-4 [200], [201]. Na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego, w odpowiedzi na wydzielany IFN- γ dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT1. STAT4 z kolei jest czynnikiem indukowanym przez sygnalizację zależną od IL-12. Oba te czynniki regulujące wpływają na ekspresję genu *Tbx21* kodującego białko T-bet, będące czynnikiem transkrypcyjnym pełniącym funkcję represora genów specyficznych dla innych niż Th1 komórek pomocniczych T [202]–[204]. Cytokiny produkowane przez Th1 takie jak IFN- γ , TNF- α powodują hamowanie wzrostu nowotworu [205]. W mysich komórkach wątrobiaka, skąpodrzewiaka i białaczki szpikowej, TNF- α i IFN- γ synergistycznie indukują śmierć komórek, podobnie jak w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej powstałej z prekursorów komórek B, gdzie synergizm tych cytokin prowadził do apoptozy komórek nowotworowych [206].

Aktywacja szlaku sygnałowego STAT1, zależna od IFN- γ , zwiększając ekspresję receptora śmierci FAS i jego ligandu FAS-L, może przyczyniać się do hamowania proliferacji rozsiaanych komórek nowotworowych [207], [208]. Zlokalizowane w tkance płuc, skóry, układu rozrodczego i w mysim modelu czerniaka, komórki nowotworowe wykazywały właściwości komórek nieproliferujących, za których regulację odpowiadały limfocyty Th1 [209].

4.3 Rola limfocytów Th2

Udział w naprawie uszkodzonych tkanek oraz istotna rola w odpowiedzi na infekcje pasożytnicze są przypisywane komórkom układu odpornościowego – limfocytom Th2. Komórki te zaangażowane są również w indukcję przewlekłych chorób zapalnych takich jak astma czy różnego rodzaju alergii. W mikrośrodkowisku dochodzi wówczas do aktywacji limfocytów, w której uczestniczą cytokiny pochodzenia nabłonkowego - IL-25, IL-33 i TSLP, jak również ważna dla różnicowania komórek Th2 – IL-4. Efektem działań tych cytokin jest indukcja kaskady immunologicznej, której towarzyszy skurcz mięśni gładkich, wytwarzanie śluzu, mastocytoza, eozynofilia, polaryzacja makrofagów M2 oraz proliferacja limfocytów B [210], [211].

Różnicowanie limfocytów Th2 zależne jest od obecności cytokin takich jak IL-4 oraz IL-2. IL-4, za pośrednictwem STAT6, aktywuje szlak sygnałowy, w wyniku którego dochodzi do zwiększenia poziomu czynnika transkrypcyjnego GATA3, odpowiadającego za wzrost różnicowania Th2. IL-4 jest kluczowym czynnikiem indukującym polaryzację tej populacji limfocytów T pomocniczych, produkowaną również przez same limfocyty Th2. Drugą cytokiną zaangażowaną w regulację Th2 jest IL-2. IL-2 aktywując białko STAT5, stymuluje produkcję cytokin charakterystycznych dla limfocytów Th2, takich jak wcześniej wspomniane IL-4 i IL-2, działających na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego, utrzymującego stymulację Th2, ale również produkcję takich cytokin jak IL-5, IL-13, IL-33 (uwalniana podczas uszkodzenia tkanki) [211]–[213]. Zauważono, że populacja limfocytów Th2 dominuje w nowotworach trzustki, jamy ustnej, przełyku i żołądka [214]–[216]. Aktywność limfocytów Th2 oraz produkowanych przez te komórki cytokin sprzyja wzrostowi nowotworu poprzez tłumienie odpowiedzi ze strony układu odpornościowego gospodarza [217]–[221]. Nie wszystkie badania jednak wskazują jednoznacznie na wspomniany wyżej charakter limfocytów Th2. Odpowiedź immunologiczną o charakterze przeciwnowotworowym,

mediowaną przez IL-5 i rekrutującą eozynofile zaobserwowano w nowotworze płuc i włókniakomięsaku [222], [223]. Aktywność eozynofili i ich migracja regulowana jest przez IL-5. Dodatkowo uważa się, że eozynofile działają w sposób cytotoksyczny na komórki nowotworowe [224]. Badania prowadzone na nowotworze okrężnicy i trzustki podkreślają znaczenie IL-5 w promowaniu działania przeciwnowotworowego, któremu towarzyszy aktywacja zarówno makrofagów, jak i eozynofili przez komórki Th2 [225].

4.4 Rola limfocytów T regulatorowych

Mechanizmy regulacyjne wykorzystujące układ odpornościowy do immunomodulacji są kluczowym elementem utrzymania prawidłowej homeostazy organizmu. Immunosupresyjna odpowiedź komórek układu odpornościowego zapobiega chorobom autoimmunologicznym i łagodzi stan zapalny po infekcji lub urazie. Pierwsze badania nad limfocytami T regulatorowymi, pozwoliły na określenie funkcji limfocytów Treg jako tych, które odpowiadają za supresję immunologiczną oraz pełnią funkcję mediatorów w tolerancji obwodowej [226]–[228]. Limfocyty T regulatorowe istotnie wpływają na rozwój autotolerancji wobec własnych antygenów lub antygenów pochodzących np. z żywności. Ich zadaniem jest również regulowanie tolerancji wobec płodu, tłumienie nadmiernej odpowiedzi ze strony układu odpornościowego oraz wspomaganie regeneracji tkanek [229]–[232].

Wśród limfocytów T regulatorowych wyróżnia się limfocyty Treg naturalne (nTreg), które wywodzą się z grasicy i są pozytywne pod względem ekspresji białka Foxp3 oraz indukowane Treg (iTreg), które powstają z obwodowych, dziewiczych prekursorów komórek T CD4⁺ w wyniku aktywacji poliklonalnej lub aktywacji specyficznej dla antygeny, prowadzącej do przekształcenia komórek CD4⁺ Foxp3⁻ w komórki CD4⁺ Foxp3⁺. nTreg stanowią podzbiór komórek CD4⁺ konstytutywnie ekspresjonujących CD25 oraz Foxp3, które są kluczowe dla funkcjonowania i rozwoju tych komórek [233]. Udział komórek Treg obserwowany jest nie tylko w patogenezie chorób autoimmunologicznych, lecz również w nowotworach. Uważa się, że rola komórek Treg w mikrośrodku guza polega na promowaniu specyficznej dla nowotworu odpowiedzi układu odpornościowego, co przyczynia się do wytworzenia tolerancji immunologicznej wobec komórek nowotworowych [175]. Mechanizm ten oparty jest na działaniu wytwarzanych przez te komórki cytokin takich jak IL-10 i TGF-β lub hamowaniu działania inhibitorów punktów kontrolnych układu

odpornościowego takich jak TIGIT i CTLA-4 [169], [234], [235]. W warunkach *in vivo*, rozwój Treg zależny jest również od ekspresji cytokin IL-2 i IL-15 [235], [236]. Tolerancja immunologiczna powstająca za pośrednictwem Treg i utrudniająca rozpoznanie immunologiczne nowotworu opiera się na wydzielaniu rozpuszczalnych lub związanych z błoną cząsteczek immunosupresyjnych, zaburzeniach metabolicznych, supresji komórek dendrytycznych i bezpośrednim działaniu cytolitycznym, jak również promowaniu angiogenezy poprzez modulację mikrośrodowiska nowotworu [237].

Liczne badania pokazują, że charakter komórek Treg w różnych typach nowotworu nie jest jednoznaczny. Korelację pomiędzy poprawą rokowania pacjentów i zwiększoną częstością występowania komórek Foxp3⁺ zaobserwowano w przypadku nowotworów głowy i szyi oraz raka jelita grubego, gdzie w tym drugim typie nowotworu, mechanizm oparty był na udziale Treg w hamowaniu odpowiedzi zapalnej na drobnoustroje jelitowe [238], [239], [240]. Sprzeczne wyniki dotyczące udziału limfocytów Treg zauważono w innym badaniu dotyczącym nowotworu głowy i szyi, gdzie wysoki odsetek komórek CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ korelował ze złym rokowaniem dla pacjentów i krótkim wskaźnikiem przeżycia [241]. Wiele badań ukazuje powiązanie pomiędzy obecnością nacieku komórek Treg w mikrośrodowisku nowotworowym a złym rokowaniem dla pacjentów. Metaanaliza obejmująca badania na kilkunastu typach nowotworów wskazuje, iż Treg występujące w dużej ilości w obszarze nowotworu korelują z negatywnym współczynnikiem całkowitego przeżycia pacjentów w większości badanych guzów. Efekt zależał od umiejscowienia guza, a także podtypu molekularnego i stadium nowotworu [242]. Inne badania nad czerniakiem, rakiem piersi, glejakiem wielopostaciowym, rakiem szyjki macicy, nerek, żołądka i rakiem wątrobowokomórkowym również wskazują na negatywny wpływ komórek T regulatorowych na rokowanie dla pacjentów i przebieg samej choroby [242]–[249].

ZAŁOŻENIA i CELE PRACY

Niedobór witaminy D₃ jest zjawiskiem występującym na całym świecie i pojawia się częściej u pacjentów chorych na nowotwory lub w trakcie terapii przeciwnowotworowej niż w populacji ogólnej.

Uważa się, że witamina D₃ moduluje szlaki sygnałowe odpowiadające za proliferację, różnicowanie oraz przeżycie komórek. Ekspresję receptora dla witaminy D wykazano między innymi w limfocytach Th17 wydzielających prozapalną IL-17. Dodatkowo udowodniono, że witamina D₃ może modulować ekspresję OPN, białka wpływającego na proliferację i różnicowanie limfocytów Th17, a także na proces przerzutowania nowotworów. Znając możliwość pro- lub przeciwprzerzutowego działania witaminy D założono, że w zależności od mikrośrodowiska nowotworu oraz od wieku może modulować ona różnicowanie limfocytów Th17, zarówno działając bezpośrednio na te komórki, jak i za pośrednictwem OPN, w ten sposób wpływając na proces przerzutowania i angiogenezę raka gruczołu sutkowego.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu, na populację limfocytów Th17, z uwzględnieniem udziału receptorów dla OPN w procesie różnicowania tych komórek u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR. Ponadto w celu poszerzenia oraz usystematyzowania wiedzy na temat znaczenia wieku w tych procesach, do badań włączono dwie grupy myszy reprezentujące status hormonalny kobiet w wieku przed menopauzą oraz kobiet po menopauzie.

Kolejne, szczegółowe cele badań obejmowały:

1. Ocenę efektu przeciwnowotworowego kalcytriolu i jego mniej toksycznego analogu – takalcytolu, w tym:
 - Określenie ich wpływu na wzrost guzów i proces przerzutowania;
 - Określenie ich wpływu na proces angiogenezy;
2. Charakterystykę odpowiedzi immunologicznej Th17 i Treg podczas progresji raka gruczołu sutkowego u myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem, w tym:
 - Ocenę fenotypową populacji limfocytów Th17 i Treg ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji wybranych receptorów dla OPN;

- Ocenę wpływu kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję genów i białek kluczowych w procesach proliferacji i różnicowania limfocytów T, ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów Th17;
3. Wskazanie roli receptorów dla OPN w różnicowaniu limfocytów Th17 pod wpływem kalcytriolu i takalcytolu w modelu raka gruczołu sutkowego 4T1.

MATERIAŁY I METODY

5. Materiały i metody

Tabela 2. Odczynniki wykorzystane w badaniach oraz ich pochodzenie

Odczynniki	Pochodzenie
Przeciwciało Ultra-LEAF Purified CD3ε, przeciwciało Ultra-LEAF Purified anti-mouse CD28, mysia rekombinowana IL-6, ludzki rekombinowany TGF-β1, bufor do utrwalania komórek (Fixation Buffer), bufor do permabilizacji komórek (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10X)), Brefeldyna A	BioLegend, San Diego, USA
Zestawy ELISA: DuoSet Ancillary Reagent Kit 2, DuoSet Mouse Osteopontin	R&D Systems, Minnesota, USA
Zestaw kapilar 12-230 kDa, zestaw kapilar 66-440 kDa, RePlex Module, zestaw Total Protein Detection, przeciwciało drugorzędowe anti-mysie HRP, przeciwciało drugorzędowe anty-królicze HRP, Streptavidin-NIR,	ProteinSimple, Minneapolis, USA
przeciwciało drugorzędowe anti-mysie NIR, przeciwciało drugorzędowe anty-królicze NIR	Bio-Techne, Abingdon, United Kingdom
TaqMan Array 96-Well FAST Plate Mouse FoxP3	Life Technologies, Kalifornia, USA
Izofluran	Baxter, Deerfield, Niemcy
Quick Start Bio-Rad Protein Assay, BSA, iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
Mouse 25 Dihydroxy vitamin D (25 OH VD) ELISA kit	MyBioSource, San Diego, USA
Kalcytriol, Takalcytol - PRI-2191 (1,24-dihydroxy Vitamin D3)	Cayman Chemical, Michigan, USA
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, Mouse VEGF-A ELISA	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA

kit, ProcartaPlex Mo Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 17plex, ProcartaPlex Mouse IL-21 Simplex	
CD4 (L3T4) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Trypsyno-wersen o pH=8, woda MiliQ, PBS, PBS+2 mM EDTA+0,5% BSA o pH=7.2, 0,9% sól fizjologiczna	PChO IITD, Wrocław, Polska
DNase I, Ca ²⁺ , ALTL, ASTL, CRE2, Cleaner (Cobas)	Roche, Basel, Szwajcaria
Collagenase from Clostridium histolyticum, Fetal Bovine Serum (FBS), inhibitory fosfataz 2 i 3, inhibitory proteaz, bufor do lizy erytrocytów Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™, RIPA, streptomycyna, TRI Reagent, trypan Blue, jonomycyna (Ionomycin calcium salt), PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), 6-tioguanina	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Fetal Bovine Serum (FBS) HyClone, medium RPMI 1640 GlutaMAX, standard mas (Page Ruler), β-merkaptotanol, medium IMDM + GlutaMax, medium RPMI 1640, Horse Serum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Direct-zol™ RNA Miniprep	ZYMO RESEARCH, Tustin, CA, USA
Pasza SAFE 132	SAFE, Rosenberg, Niemcy
Penicylina	Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska
Direct Tissue PCR Kit, agaroz, SimplySafe, Bufor x50 TAE, Perfect 100-1000 bp DNA Ladder	EurX, Gdańsk, Polska
Bupaq Multidose 0,3 mg/ml	Orion Pharma Poland, Warszawa, Polska

5.1 Linie komórkowe

W badaniach *in vivo* użyte zostały linie komórkowe mysiego raka gruczołu sutkowego – 4T1 i 67NR (Tabela 3). Linie te są częścią kolekcji linii komórkowych należących do Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Hodowle komórkowe prowadzono w warunkach 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza na plastikowych szalkach Ø10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy). Komórki, po rozmrożeniu pasażowano 2 razy w tygodniu z wykorzystaniem roztworu trypsyno-wersen, gdy hodowle osiągnęły 85% poziom konfluencji. Zawiesinę komórek wirowano (195 × g, 7', 4°C), a następnie mikroskopowo określano ich żywotność z wykorzystaniem roztworu Trypan Blue oraz liczono z użyciem hemocytometru (komory Bürkera). Poniżej scharakteryzowano wybrane linie komórkowe.

Tabela 3. Charakterystyka linii komórkowych wykorzystanych w eksperymentach *in vivo*

Nazwa linii	Charakterystyka linii	Pochodzenie linii	Stosowane medium hodowlane
4T1	Linia komórkowa mysiego raka gruczołu sutkowego odpowiadającego IV stadium ludzkiego raka gruczołu sutkowego, potrójnie ujemnego (ER(-), PR(-), HER2(-)), typu podstawnego. Linia pozyskana z myszy szczepu BALB/c. W badaniach <i>in vivo</i> zdolna do tworzenia przerzutów odległych [250], [251].	ATCC, Rockville, USA	RPMI 1640 + 10% FBS + 3,5 g/L glukozy + 1 mM pirogronianu sodu + 100 µg/ml streptomycyny + 100U/ml penicyliny
67NR	Linia komórkowa mysiego raka gruczołu sutkowego pochodząca z myszy szczepu BALB/c. Linia niezdolna do tworzenia przerzutów (model nieprzerzutujący) odpowiadająca ludzkiemu nowotworowi o charakterze luminalnym B (ER(+), PR(-), HER2(-)) [251].	Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Detroit, USA	DMEM + 10% CBS + 2,0 mM L-glutaminy + 1% aminokwasów + 100 µg/ml streptomycyny + 100 U/ml penicyliny

5.2 Zwierzęta doświadczalne

W doświadczeniach *in vivo* wykorzystano myszy szczepu BALB/c/Foxp3^{GFP} w wieku 6-8 tygodni, jako model przedmenopauzalny, oraz myszy w wieku 40 tygodni, poddane owariektomii, jako model pomenopauzalny. Myszy pochodziły z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, gdzie zakładano gniazda zarodowe myszy ze szczepu Foxp3^{GFP} (C57BL/6-Tg(Foxp3-GFP)90Pkraj) i BALB/c [252], a krzyżowanie kolejnych pokoleń odbywało się w bliskim pokrewieństwie, po określeniu pożądanego genotypu. Doświadczenia terapeutyczne przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (nr zgody 50/2020). Myszy utrzymywano w warunkach SPF (specific pathogen free) na terenie zwierzętarni IITD PAN przez cały okres trwania eksperymentu *in vivo*. Wykorzystanie szczepu modyfikowanego umożliwiło oznaczanie populacji limfocytów T regulatorowych (gen kodujący białko zielonej fluorescencji – *Gfp*, znajduje się pod

promotorem genu *Foxp3*) w analizach w cytometrze przepływowym. Modyfikacja ta ograniczyła liczbę niezbędnych dodatkowych barwień, przyczyniając się do zmniejszenia liczby wykorzystanych myszy, jak również ułatwiła analizy podnosząc ich wiarygodność. W wybranych analizach, celem sprawdzenia wpływu obecności samego nowotworu na dany czynnik i porównania do myszy niezaszczepionych komórkami nowotworowymi, wykorzystane zostały myszy zdrowe w modelu przedmenopauzalnym oraz myszy zdrowe w modelu pomenopauzalnym, poddane procesowi pozorowanej owariektomii (określane jako SHAM) (proces opisany w podrozdziale 5.3.1).

5.2.1 Genotypowanie

W celu potwierdzenia genotypu myszy modyfikowanych genetycznie, od 4-tygodniowych myszy pobierano skrawki uszu. Pobrane biopaty poddane zostały analizie genotypowej z użyciem zestawu Direct Tissue PCR Kit (EurX, Gdańsk, Polska) według protokołu producenta. Startery użyte do reakcji PCR (Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Wrocław, Polska) przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 4).

Tabela 4. Lista genów oraz sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w celu genotypowania

Gen	Sekwencja startera Forward	Sekwencja startera Reverse
<i>Gfp</i>	CTCTCGAGTCACAGCATCCAAC GAATC	CGGTGGTGCAGATGAACTTCA GGGT
<i>ACTB</i>	TGTCATGGTAGGTATGGGTCAGA AGG	GATGTCGCACAATCTCACGTT CAG

Celem wizualizacji produktów reakcji PCR wykonano elektroforezę w 2% żelu agarozowym. W celu przygotowania żelu odważono 4 gramy agarozy (EurX, Gdańsk, Polska) i rozpuszczono w 200 ml buforu x1 TAE (Tabela 5) następnie mieszaninę podgrzewano przez 15' temperaturze 80-90°C, po czym dodano do niej barwnika SimplySafe (EurX, Gdańsk, Polska) służącego do wybarwienia kwasów nukleinowych. Żel wylano do formy z umieszczonymi wewnątrz grzebieniami, po czym pozostawiono do wyschnięcia na 60'. Gdy żel spolimeryzował, formę umieszczono w aparacie elektroforetycznym, który uzupełniono buforem x1 TAE, po czym naniesiono drabinkę masy Perfect 100-1000 bp DNA Ladder (EurX, Gdańsk, Polska) oraz próbki poddane

amplifikacji w objętości 5µl/dołek. Rozdział prowadzono z użyciem aparatu Sub-Cell GT Cell (BioRad, Kalifornia, USA) przy stałym napięciu prądu (100V przez pierwsze 25', następnie 120V przez 35'). Prążki zwizualizowano z użyciem aparatu ChemiDoc Imaging System (czas ekspozycji: 0,049 sekund, wartość filtrów: 590/110, BioRad, Kalifornia, USA).

Tabela 5. Skład buforu x1 TAE do elektroforezy

Odczynnik	Zastosowana ilość	Producent
Bufor x50 TAE	10 ml	EurX, Gdańsk, Polska
Woda MilliQ	490 ml	PChO IITD, Wrocław, Polska

5.3 Badania *in vivo*

5.3.1 Owariektomia

Celem stworzenia modelu pomenopauzalnego, u myszy wykonano zabieg owariektomii [253]. Myszy w wieku 30-35 tygodni, 30' przed zabiegiem znieczulono buprenorfiną (Orion Pharma Poland, Warszawa, Polska) w dawce 0,4 mg/kg masy ciała, po czym poddano narkozie (3% izofluranu (Baxter, Deerfield, Niemcy) w powietrzu syntetycznym (200 ml/min). W głębokim uśpieniu, myszom wycięto oba jajniki i zaszyto powłoki grzbietu. Jako kontrolę powodzenia owariektomii oraz kontrolę wpływu operacji na parametry poddawane analizie, przeprowadzono równolegle zabieg pozorowanego usunięcia jajników, poprzez rozcięcie powłok skórnych, następnie ich zaszycie (myszy kontrolne „SHAM”). Po usunięciu jajników, rany pokrywano proszkiem Dermatol (Galen, Polska) przyspieszającym gojenie ran. Myszy poddawano codziennej obserwacji przez okres całkowitego wygojenia ran. Po 30 dniach od zabiegu myszom wszczepiono komórki nowotworowe.

5.3.2 Wszczepienie komórek nowotworowych

Hodowle komórek nowotworowych *in vitro* przeprowadzano zgodnie ze schematem przedstawionym w podrozdziale 5.1 w medium dedykowanym dla danej linii. Myszom w wieku 6-8 tygodni oraz 40-tygodni (zależnie od schematu eksperymentu) wszczepiono

ortotopowo (wszczepienie komórek nowotworowych do podściółki tłuszczowej drugiego, prawego gruczołu mlekowego, anatomicznie prawa listwa mleczna) komórki linii 4T1 ($2,5 \times 10^5$ komórek/mysz) lub 67NR (2×10^5 komórek/mysz). Po 7 dniach wykonano pomiar objętości guza i przydzielono myszy do poszczególnych grup terapeutycznych przez przeprowadzenie procesu randomizacji.

5.3.3 Ocena wzrostu guza i masy ciała

Celem oceny aktywności przeciwnowotworowej, po osiągnięciu przez guzy objętości około 15 mm^3 rozpoczynano pomiary wzrostu guza oraz monitorowanie masy ciała myszy. Zmiany w masie ciała myszy oszacowano w oparciu o zestawienie średniej masy myszy w danym dniu pomiaru w stosunku do masy ciała zmierzonej w dniu rozpoczęcia eksperymentu, korzystając z poniższego wzoru:

$$BWC [\%] = \frac{BW_n}{BW_o} \times 100 - 100\%$$

Gdzie:

BWC – zmiana masy ciała [%], BW_n – średnia masa ciała myszy w danej grupie w n-dniu eksperymentu, BW_o – średnia masa ciała myszy w danej grupie w dniu rozpoczęcia eksperymentu

Pomiar wzrostu guza, z wykorzystaniem suwmiarki elektronicznej, umożliwił ocenę średnicy guza w dwóch wymiarach (krótszym i dłuższym). Objętość guza obliczono na podstawie wzoru:

$$TV [\text{mm}^3] = \frac{a^2 \times b^2}{2}$$

Gdzie:

TV – objętość guza [mm^3], a – krótszy wymiar guza, b – dłuższy wymiar guza

Wyliczone objętości guza dla każdej myszy normalizowano, obliczając stosunek pomiaru z danego dnia względem pierwszego wyniku w dniu rozpoczęcia pomiarów. Pomiary wykonywano 3 razy w tygodniu przez 24-dniowy okres trwania eksperymentu.

5.3.4 Doustne podania kalcytriolu i takalcytolu

Po przydzieleniu myszy do odpowiednich grup terapeutycznych (5 myszy/grupę) rozpoczęto doustne podania kalcytriolu (0,5 µg/kg masy ciała), takalcytolu (1 µg/kg masy ciała) lub glikolu polietylenowego (kontrola rozpuszczalnika) w grupie kontrolnej. Podanie za pomocą sondy dożołądkowej wykonywano 3 razy w tygodniu przez 24 dni, aż do momentu zakończenia eksperymentu *in vivo*.

5.3.5 Ocena perfuzji guza metodą obrazowania ultrasonograficznego

Guzy poddano ocenie perfuzji metodą obrazowania ultrasonograficznego za pomocą systemu Vevo 2100 (VisualSonics, Ontario, Kanada). 13 dnia eksperymentu myszy poddano znieczuleniu ogólnemu za pomocą 2% izofluranu (Baxter, Deerfield, Niemcy) w powietrzu syntetycznym (200 ml/min), guzy wizualizowano z użyciem sondy ultrasonograficznej MS-250S w przekroju strzałkowym. 100 µl kontrastu MicroMarker™ Contrast Agent (VisualSonics, Ontario, Kanada) podano do żyły ogonowej (bolus) w jałowej 0,9% soli fizjologicznej (PChO IITD, Wrocław, Polska) w stężeniu $\sim 10^7$ cząsteczek kontrastu/mysz. Napływ kontrastu do wizualizowanego obszaru (perfuzję guza) rejestrowano w trybie kontrastu nieliniowego przez ok. 30s, po czym wykonywano rejestrację reperfuzji guza po uprzednim zniszczeniu cząsteczek kontrastu w polu obrazowania (burst). Wygenerowane dane poddano analizie za pomocą oprogramowania Vevo LAB 1.7.1 Software oraz VevoCQ (VisualSonics, Ontario, Kanada). Stopień perfuzji guza oceniano na podstawie parametrów takich jak:

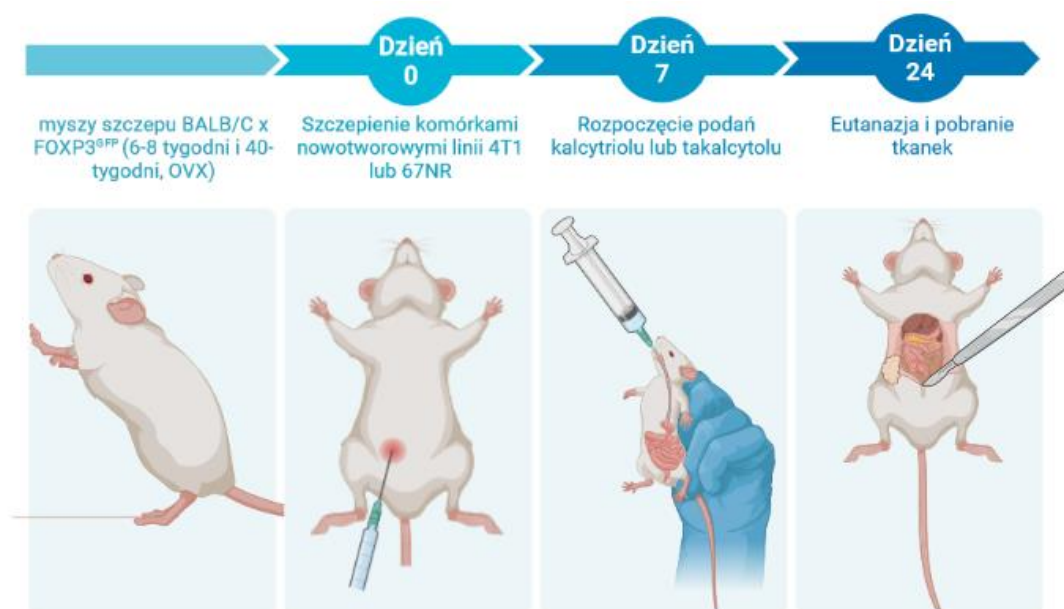
- czas wysycenia kontrastem (time to peak; s)
- maksymalne wysycenie kontrastem (peak enhancement; AU)

5.3.6 Pobranie tkanek do analiz *ex vivo*

W dniu zakończenia eksperymentu *in vivo*, z zatoki żyłnej oka pobrana została krew. Myszy znieczulono przez podanie buprenorfiny 10 µl/g masy ciała na 20' przed pobraniem krwi. Zwierzęta poddane zostały ogólnemu znieczuleniu wziewnemu, za pomocą izofluranu, po czym usunięto gałkę oczną i pobrano krew do jałowych probówek. Po pobraniu krwi, myszy poddano humanitarnej eutanazji przez dyslokację kręgow szyjnych, od myszy pobrano tkanki do dalszych analiz:

- Guz - analiza histopatologiczna, cytometryczna oraz analiza detekcji białek metodą Jess Simple Western,
- Śledziona - analiza cytometryczna, real-time PCR, analiza detekcji białek metodą Jess Simple Western, test klonogeny,
- Wątroba, szpik kostny – test klonogeny
Płuca - test klonogeny, analiza cytometryczna i histopatologiczna
- Węzły chłonne – test klonogeny, analiza cytometryczna
- Krew- analiza cytometryczna, analiza morfologiczna i biochemiczna, testy ELISA

Schemat opisujący przebieg eksperymentu *in vivo* przedstawiono na poniższej rycinie (Rycina 9).



Rycina 9. Schemat eksperymentu *in vivo*.

Przy wszystkich przeprowadzonych eksperymentach *in vivo* uczestniczyłam i asystowałam. Poszczególne procedury *in vivo* wykonywane były przez przeszkolony i doświadczony zespół specjalistów z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej - dr inż. Beatę Filip-Psurską oraz dr inż. Mateusza Psurskiego.

5.4 Badania ex vivo

5.4.1 Analiza histopatologiczna

Skrawki guza pobrane od myszy obarczonych guzami 4T1 i 67NR przeznaczono do analizy histologicznej (barwienie metodą H&E) oraz barwienia metodą immunohistochemiczną (pod kątem ekspresji białka CD31). Analizie histologicznej poddano również wycinki płuc z modelu raka gruczołu sutkowego 4T1. Badanie histologiczne obejmowało ocenę stopnia złośliwości, a także odsetka martwicy badanych guzów. Badanie immunohistochemiczne, w pierwszym etapie obejmowało ocenę powierzchni całego analizowanego preparatu, w drugim etapie oceniano powierzchnię tkanki nowotworowej z wykluczeniem obszarów martwiczych. Dodatkowo przeprowadzoną analizą była ocena mikroskopowa preparatów polegająca na określeniu liczby naczyń krwionośnych widocznych w polu widzenia. Analiza histopatologiczna przeprowadzona została przez jednostkę zewnętrzną - Laboratorium Badawcze SORBOLAB (Poznań, Polska).

5.4.2 Preparacja komórek z krwi

Krew pobrano w sposób jałowy do probówek VACUETTE TUBE 2 ml LH Lithium Heparin (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria). Z każdej próbki odpipetowano po 40 μ l krwi i wykonano analizę morfologiczną. Pozostałą krew pełną wirowano przez 15', 1500 $\times$ g, 4°C w celu uzyskania osocza, które pobrano do świeżych, jałowych probówek konikalnych, po czym zamrożono i przechowywano w -80°C. Pozostałe elementy morfotyczne krwi zawieszono w płynie Hanksa (PChO IITD, Wrocław, Polska) do uzyskania łącznej objętości 2 ml. Tak przygotowaną zawiesinę nawarstwiono na roztwór Ficoll-Paque Premium 1.084 (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), następnie wirowano przez 30', 400 $\times$ g, w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu, utworzony na powierzchni ficollu kożuch frakcji mononuklearnej (PBMC) przenoszono do jałowych probówek, przepłukano 2 $\times$ jałowym buforem PBS, po czym zwirowano i policzono komórki zawieszone w końcowej objętości 5 ml. Część komórek frakcji leukocytarnej od myszy obarczonych guzem 4T1 przeznaczono do analizy cytometrycznej, pozostałe komórki, zwirowano przez 7 min 350 $\times$ g, 4°C i zawieszono

w 90% surowicy FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), następnie zamrożono i przechowywano w -80°C.

5.4.3 Preparacja komórek z guza, płuc, mózgu i wątroby

Świeżo pobraną tkankę guza, płuc, wątroby i mózgu umieszczono na szklanej szalce, dodano 1 ml medium IMDM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) i rozdrobniono z użyciem skalpela na drobne kawałki. Tkanke umieszczono w probówce konikalnej, uzupełniono medium IMDM do łącznej objętości 3,6 ml i dodano 400 µl kolagenazy IV (1mg/ml; Collagenase from Clostridium histolyticum; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) i 40 µl DNazy i (1mg/ml; Roche, Basel, Szwajcaria), po czym inkubowano przez 1 godzinę, w temperaturze 37°C w piecu hybrydizacyjnym z funkcją delikatnego wstrząsania. Po godzinnym trawieniu zawartość probówki przelewano do filtra (średnica porów 40 µm, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria) umieszczonego w probówce konikalnej 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) w celu oddzielenia wytrawionych komórek od niestrawionych resztek. Resztki tkanek guza, które nie uległy strawieniu przenoszono do probówek wraz z ceramiczną kulką do homogenizacji (MP Bio-medicals, Santa Ana, USA) i dodano 500 µl RIPPY z koktajlem inhibitorów proteaz i fosfataz 2, 3 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Próbkę homogenizowano w sposób mechaniczny z użyciem homogenizatora FastPrep®-24 Instrument (MP Bio-medicals, Santa Ana, USA) z ustawieniami: 5m/s, 30s. Próbkę inkubowano na lodzie przez 30', umieszczono w ciekłym azocie na 1' po czym przechowywano w temperaturze -80°C.

Przefiltrowane komórki wirowano przez 7', 350 × g, 4°C, usunięto supernatant po czym do osadu komórek dodano 1 ml buforu do lizy erytrocytów (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), wytrząsano przez 1', następnie dodano 10 ml buforu PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska). Ponownie wirowano komórki przez 7', 350 × g, 4°C, usunięto supernatant, zawieszono komórki w 5 ml buforu PBS + 2% FBS i policzono z użyciem roztworu Trypan Blue i komory Bürkera. Tak przygotowane komórki przeznaczono do dalszych analiz.

5.4.4 Preparacja komórek ze śledzion i węzłów chłonnych

Celem uzyskania zawiesiny zawierającej pojedyncze komórki, bezpośrednio na tkankę dodano 5 ml schłodzonego buforu PBS + 2% FBS i sterylną końcówką strzykawki

roztarto śledzionę lub węzły chłonne. Roztartą tkankę przeniesiono do nylonowego filtra (wielkość porów 40 μm) umieszczonego w probówce konikalnej 50 ml w celu oddzielenia resztek tkanek. Przepłukano szalkę oraz filtr 10 ml buforu PBS + 2% FBS i wirowano komórki przez 7', 350 $\times$ g, 4°C. Po wirowaniu, usunięto supernatant i zawieszono komórki w 1 ml buforu do lizy erytrocytów mieszano delikatnie obracając probówkę przez 1', następnie dodano 10 ml buforu PBS i wirowano przez 7 min 350 $\times$ g, 4°C. W przypadku śledzion, jeśli pelet po jednorazowej lizie erytrocytów nadal pozostawał czerwony, lizę powtórzono. Po zwirowaniu komórek, pelet zawieszono w 10 ml buforu PBS + 2% FBS (dla śledziony) oraz 2 ml PBS + 2% FBS (dla węzłów chłonnych), po czym policzono komórki z użyciem komory Bürkera i roztworu Trypan Blue. Część przygotowanych w ten sposób komórek z modelu 4T1 przeznaczono do analiz cytometrycznych, pozostałą część zamrożono w probówkach do mrożenia (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) w 90% surowicy FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i przechowywano w ciekłym azocie.

5.4.5 Preparacja komórek ze szpiku kostnego

Kości udową i piszczelową wycięto w sposób nienaruszający stawy biodrowe i kolanowe, a następnie oddzielono tkankę mięśniową z użyciem skalpela. Celem utrzymania kości w warunkach sterylnych, po wycięciu umieszczono je w roztworze antybiotyków (penicylina i streptomycyna) z buforem PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska). Za pomocą skalpela usunięto nasady kości po czym każdą z nich przepłukiwano roztworem PBS + 2% FBS przy pomocy strzykawki i igły (0,5 $\times$ 25 mm) do całkowitego wypłukania szpiku z wnętrza kości. Uzyskane komórki szpiku kostnego zwirowano przez 7', 432 $\times$ g, 4°C, supernatant usunięto, po czym przepłukano komórki buforem PBS i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Po wirowaniu supernatant usunięto a osad komórek zawieszono w 90% surowicy FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), następnie zamrożono i przechowywano w ciekłym azocie.

5.4.6 Analiza parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi

Pobraną od myszy krew poddano analizie hematologicznej w aparacie Mythic 18 (Cormay, Warszawa, Polska). Resztę krwi odpowiednio przygotowano do dalszych analiz (opis przygotowania krwi opisano w rozdziale 5.4.2). Zabezpieczone osocze przeznaczono do analizy toksyczności względem wątroby i nerek oraz analizy poziomu jonów wapnia w organizmie. U każdej z myszy oznaczono poziom wapnia, kreatyniny (CRE2) oraz aminotransferazy asparaginianowej (AST) i aminotransferazy alaninowej (ALT) przy pomocy analizatora biochemicznego Cobas c111z ISE (Roche Diagnostics, Warszawa, Polska).

5.4.7 Analiza fenotypu komórek CD4⁺ i T regulatorowych za pomocą cytometrii przepływowej

Komórki pochodzące z guza, płuc i śledziony od myszy obarczonych guzami 4T1 i 67NR oraz węzłów chłonnych i krwi od myszy obarczonych guzami 4T1, przygotowane według schematów kolejno w podrozdziałach 5.4.3, 5.4.4, 5.4.2 przeznaczono do analizy cytometrycznej. Analizie poddano komórki żywe w ilości 1×10^5 /próbkę, zawieszano w 100 μ l PBS + 2% FBS z dodatkiem przeciwciała blokującego receptory dla fragmentów Fc przeciwciał TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) (BioLegend, USA) i inkubowano w ciemności w temperaturze 4°C przez 15'. Po inkubacji komórki wirowano 7' 350 $\times$ g, 4°C i usunięto supernatant. Kolejny etap stanowił wybarwienie komórek martwych w celu późniejszego oddzielenia ich od frakcji komórek żywych, dlatego do osadu komórek dodano 50 μ l PBS + 2% FBS i przeciwciała Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Komórki inkubowano 30', 4°C. Po 30' dodano kolejną porcję przeciwciał przeciwko określonym antygenom mysim (Fixable Viability Dye, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD29, anti-CD61, anti-CD44, anti-CD51 (Tabela 6) zawieszoną w 50 μ l PBS + 2% FBS, po czym próbki ponownie inkubowano przez 30' w 4°C. Po upływie czasu inkubacji komórki odwirowano 7' 350 $\times$ g, 4°C, zawieszono w 200 μ l PBS + 2% FBS i wykonano odczyt przy pomocy cytometru LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA). Analizę uzyskanych danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania FACSDiva software.

Tabela 6. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych fenotypu komórek CD4⁺ i limfocytów T regulatorowych

ANTYGEN	CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁA	KLASA PRZECIWCIAŁA (KLON)	FLUOROCHROMY	STOSOWANE ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT
CD3	Chomicze anty-mysz	IgG (145-2C11)	PE/Dazzle™ 594	1:200	BioLegend
CD4	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (GK1.5)	Alexa Fluor® 700	1:1000	BioLegend
CD44	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (IM7)	APC	1:400	BioLegend
CD29	Chomicze anty-mysz	IgG (HMβ1-1)	PerCP/Cyanine5.5	1:400	BioLegend
CD61	Chomicze anty-mysz	IgG, 2C9.G2 (HMβ3-1)	PE/Cyanine7	1:400	BioLegend
CD25	Szczurze anty-mysz	IgG1, λ (PC61)	Brilliant Violet 605	1:200	BioLegend
CD51	Szczurze anty-mysz	IgG1, κ (RMV-7)	Brilliant Violet 786	1:400	BD Biosciences

5.4.8 Analiza poziomu IL-17 i IFN-γ w komórkach CD4⁺ za pomocą cytometrii przepływowej

Komórki pochodzące z tych samych tkanek przedstawionych w rozdziale 5.4.7 policzono z wykorzystaniem roztworu Trypan Blue i komory Bürkera. Celem pobudzenia komórek do produkcji cytokin, na płytce 24-dołkowej (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) wysiano po 5×10^5 komórek zawieszonych w medium do stymulacji (medium IMDM + GlutaMax + 10% FBS + PMA (50 ng/ml) + jonomycyna (500 ng/ml) + brefeldyna A (5 μg/ml)) i inkubowano przez 4 godziny w 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza. Po 4-godzinnej stymulacji komórki zebrano i ponownie policzono. Komórki w liczbie 1×10^5 /próbkę rozpipetowano do probówek i zwirowano (7', 350 × g, 4°C). Usunięto supernatant i dodano 100 μl przeciwciała blokującego TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) (BioLegend, USA) zawieszonego w buforze PBS + 2% FBS, inkubowano w ciemności przez 15' w temperaturze 4°C. Po upływie 15' komórki ponownie zwirowano, a następnie w celu wybarwienia komórek martwych osad komórek zawieszono w 100 μl mieszaniny przeciwciała Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) z buforem PBS + 2% FBS, inkubowano 30' w ciemności w temperaturze 4°C. W celu dalszego barwienia wewnątrzkomórkowego komórki utrwalono poprzez dodanie 500 μl buforu Fixation Buffer (BioLegend, San Diego, USA) i 20' inkubację w temperaturze pokojowej, w ciemności. Kolejno, celem

permeabilizacji komórek, trzykrotnie wirowano je w objętości 500 µl/próbkę w buforze 1× Intracellular Staining Perm Wash Buffer (BioLegend, San Diego, USA) w warunkach wirowania 7', 350 × g, temperatura pokojowa. Na skutek inkubacji z PMA, jonomycyną i brefeldyną antygeny CD3 i CD4 pierwotnie występujące na powierzchni komórki ulegają internalizacji, dlatego w kolejnym etapie barwienia wewnątrzkomórkowego, komórki poddane permeabilizacji w poprzednim etapie, barwiono z użyciem wybranych przeciwciał anti-CD3, anti-CD4, anti-IL17A i anti-IFN-γ (Tabela 7) zawieszonych w 100 µl buforu do permeabilizacji i inkubowano przez 30', w ciemności w temperaturze pokojowej. Komórki wirowano, zawieszono w buforze PBS + 2% FBS i odczytano z użyciem cytometru LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA). Analizę danych przeprowadzono za pomocą programu FACSDiva software.

Tabela 7. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych poziomu IL-17 w komórkach CD4⁺

ANTYGEN	CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁA	KLASA PRZECIWCIAŁA (KLON)	FLUOROCHROMY	STOSOWANE ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT
CD3	Chomice anty-mysz	IgG (145-2C11)	PE/Dazzle™ 594	1:200	BioLegend
CD4	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (GK1.5)	Alexa Fluor® 700	1:1000	BioLegend
IL-17A	Szczurze anty-mysz	IgG1, κ (TC11-18H10.1)	Brilliant Violet 421™	1:200	BioLegend
IFN-γ	Szczurze anty-mysz	IgG1, κ (XMG1.2)	PE	1:200	Invitrogen

5.4.9 Określenie zdolności komórek do tworzenia kolonii – test klonogeny

W celu analizy zdolności komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów odległych wykonano test klonogeny. Tkanki takie jak płuca, śledziona, wątroba, mózg, węzły chłonne i szpik kostny zostały pobrane i przygotowane w sposób umożliwiający uzyskanie zawiesiny pojedynczych komórek zgodnie ze schematami opisanymi w rozdziałach 5.4.3, 5.4.4, 5.4.5. Komórki policzono i wysiano na szalkę Ø10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) w liczbie: płuca ($0,25 \times 10^5$ komórek), wątroba ($4,5 \times 10^6$ komórek), śledziona (5×10^6 komórek), mózg (10×10^6 komórek), węzły chłonne ($0,5 \times 10^6$ komórek), szpik (10×10^6 komórek) w 10 ml medium przeznaczonym dla danej linii. Wykorzystując oporność komórek linii 4T1 na 6-tioguaninę (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), po 24 godzinach od wysiania komórek, medium uzupełniano o 6-tioguaninę w stężeniu 10 µM. Po upływie 48 godzin, odbierano 5 ml medium po czym ponownie uzupełniano szalkę właściwym dla danej linii medium z czynnikiem selekcyjnym

(dla komórek 4T1) lub bez (dla komórek 67NR) do łącznej objętości 10 ml. Po upływie 4 dni od wysiania, z szalki odbierano medium, przemywano 10 ml buforu PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska) i dodawano 10 ml świeżego medium. Komórki pochodzące z płuc, śledziony i węzłów chłonnych hodowano przez 3 tygodnie, z kolei komórki wątroby i szpiku kostnego hodowano przez 2 tygodnie zmieniając pożywkę co 3 dni według procedury z dnia czwartego. Po upływie określonego czasu hodowli (37°C; 5% CO₂; wilgotność 95%), komórki na szalkach przemywano buforem PBS, następnie barwiono przez godzinę w 0,5% fiolecie krystalicznym (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (1 ml fioletu/szalkę). Po godzinie odebrano fiolet i szalki przemywano wielokrotnie wodą. Po płukaniu usunięto pozostałości wody z szalki i pozostawiono do wyschnięcia. Szalki fotografowano z użyciem aparatu ChemiDoc Imaging System (BioRad, Kalifornia, USA) i analizowano w oprogramowaniu ImageJ.

5.4.10 Magnetyczna separacja komórek CD4⁺ z mysich śledzion

Limfocyty CD4⁺ wyizolowane zostały z mysich śledzion za pomocą zestawu do magnetycznej separacji (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Komórki śledziony rozmrożono i odwirowano w warunkach 7', 300 × g, 4°C, osad komórek policzono i zawieszono w roztworze buforu do separacji – PBS + 2mM EDTA + 0,5% BSA o pH=7.2 (70µl na każde 10⁷ komórek; PChO IITD, Wrocław, Polska) oraz przeciwciała blokujące anty-CD16/CD32 (1µl na każde 10⁶ komórek; TruStain FcX, BioLegend, San Diego, USA). W celu zablokowania receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał komórki inkubowano 10' w temp. 4°C. Kolejno dodano przeciwciała do separacji magnetycznej skoniugowane z kulkami magnetycznymi (CD4 (L3T4) MicroBeads, 10µl na każde 10⁷ komórek (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) i inkubowano przez 30' w 4°C w ciemności. Po inkubacji komórki przepłukano buforem do separacji (90µl na każde 10⁷ komórek) i wirowano 7', 300 × g, 4°C. Usunięto supernatant zawierający niezwiązane przeciwciała, a osad zawieszono w świeżym buforze do separacji (500 µl/2×10⁸ komórek). Kolumny MS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) umieszczono w magnesie na statywie separatora magnetycznego MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) i aktywowano przez dodanie do kolumny 500 µl buforu do separacji. Po aktywacji, na kolumnę dodano zawiesinę komórek w buforze do separacji (maksymalna przepuszczalność kolumny - 2×10⁸ komórek/kolumnę MS), odczekano do całkowitego przejścia zawiesiny przez kolumnę po czym kolumnę dwukrotnie przepłukano 500 µl

buforu do separacji. Po przepłukaniu kolumny, umieszczono ją w świeżej, sterylnej 5 ml probówce, dodano na kolumnę 1 ml buforu do separacji po czym wypchnięto komórki tłokiem dołączonym do kolumny. Komórki policzono przy użyciu roztworu Trypan Blue i komory Bürkera, a następnie przeznaczono do dalszych analiz oraz sprawdzono pod względem czystości separacji z użyciem cytometrii przepływowej (ze względu na niewielką ilość komórek uzyskanych po separacji i po przeznaczeniu ich na kluczowe analizy, w celu oznaczenia czystości komórki z poszczególnych próbek po procesie separacji łączono w obrębie grupy). Proces barwienia komórek opisano w rozdziale 5.4.7. Przeciwciała zastosowane w barwieniu cytometrycznym: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD45, anti-CD326 (EpCAM; dla modelu 4T1), anti-podoplanina (dla modelu 67NR) (Tabela 8).

Tabela 8. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych czystości separacji magnetycznej

ANTYGEN	CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁA	KLASA PRZECIWCIAŁA (KLON)	FLUOROCHROMY	STOSOWANE ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT
CD3	Chomice anty-mysz	IgG (145-2C11)	PE/Dazzle™ 594	1:200	BioLegend
CD4	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (GK1.5)	Alexa Fluor® 700	1:1000	BioLegend
CD326 (EpCAM)	Szczurze anty-mysz	IgG2a, κ (G8.8)	PE/Cyanine7	1:1000	BioLegend
Podoplanina	Chomice anty-mysz	IgG (eBio8.1.1 (8.1.1))	PE/Cyanine7	1:200	Invitrogen
CD45	Szczurze anty-mysz	IgG2b, κ (30-F11)	PerCP/Cyanine5.5	1:200	BD Biosciences

5.4.11 Przygotowanie lizatów komórkowych do analizy PCR i Jess Simple Western

Komórki CD4⁺ pochodzące ze śledziony zabezpieczono do analizy ekspresji genów oraz białek. Uzyskane na drodze magnetycznej separacji komórki CD4⁺ (schemat separacji opisany został w rozdziale 5.4.10) stymulowano do produkcji cytokin. Na płytkę 24-dółkową komórki wysiano w liczbie 5×10⁵ komórek/dółek w medium do stymulacji (IMDM + GlutaMax + 10% FBS + PMA (50 ng/ml) + jonomycyna (500 ng/ml) i inkubowano przez 4 godziny w warunkach 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza. Po stymulacji komórki zebrano do świeżych probówek, zwirowano 12', 200 × g, 4°C. Supernatanty zamrożono w -80°C do dalszych analiz. Komórki przeznaczone do analizy PCR zawieszono w 200 µl odczynnika TRI-Reagent (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) dla komórek w ilości ≤10⁷ oraz 500 µl dla komórek w ilości >10⁷ komórek. Komórki

przeznaczone do analizy białek zawieszono w buforze lizującym RIPA z dodatkiem koktajlu inhibitorów fosfataz 2 i 3 oraz inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (50 µl/próbkę), inkubowano na lodzie przez 10', po czym zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.4.11.1 Ocena ekspresji genów na poziomie mRNA za pomocą analizy real-time PCR

5.4.11.1.1 Izolacja RNA

Proces izolacji całkowitego RNA z lizatów komórkowych zabezpieczonych w odczynniku TRI-Reagent (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) przeprowadzony został za pomocą zestawu do izolacji RNA (Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH, Tustin, CA, USA). Procedurę izolacji przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. W trakcie izolacji, celem usunięcia pozostałości genomowego DNA zastosowano trawienie DNAzą i bezpośrednio na kolumnach do izolacji. Po wyizolowaniu materiału genetycznego zmierzono stężenie RNA z użyciem spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.4.11.1.2 Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono z użyciem zestawu SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto całość wyizolowanego RNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w termocyklerze Veriti 9902 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) w warunkach: 10' w temp. 25°C, 10' w temp. 50°C i 5' w temp. 85°C. Zsyntetyzowane próbki cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz.

5.4.11.1.3 Real-time PCR

Analizę ekspresji genów specyficznych dla komórek CD4⁺ przeprowadzono z użyciem specjalnie zaprojektowanych płytek TaqMan Array 96-Well FAST Plate Mouse FoxP3 opłaszczonych sondami, celem analizy określonych genów (Tabela 9).

Tabela 9. Wykaz sond użytych w reakcji real-time PCR

Nazwa genu		Numer identyfikacyjny sondy
<i>T-bet</i>	<i>Tbx21</i>	Mm00450960_m1
<i>RORa</i>	<i>RORA, NR1F1</i>	Mm01173766_m1
<i>RORγt</i>	<i>RAR-related orphan receptor C (Rorc/ROR-γt)</i>	Mm01261022_m1
<i>FoxP3</i>	<i>forkhead box P3</i>	Mm00475165_m1
<i>Gata3</i>	<i>GATA Binding Protein 3</i>	Mm01337569_m1
<i>Stat3</i>	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>	Mm01219775_m1
<i>Stat5</i>	<i>STAT5a</i>	Mm00839861_m1
<i>Gfi-1</i>	<i>growth factor independent 1</i>	Mm00515855_m1
<i>Vdr</i>	<i>vitamin D receptor</i>	Mm00437297_m1
<i>Spp1</i>	<i>osteopontin</i>	Mm00436767_m1
<i>Il17</i>	<i>IL17a</i>	Mm00439619_m1
<i>Gapdh*</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Mm99999915_g1
<i>Actb*</i>	<i>Actin, beta</i>	Mm01205647_g1
<i>Sdha*</i>	<i>Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i>	Mm01352366_m1
<i>B2m*</i>	<i>Beta-2 microglobulin</i>	Mm00437762_m1

*- kontrole endogenne

Analizę genów w komórkach pochodzących od myszy obarczonych guzami 4T1 przeprowadzono z użyciem 18,5 ng cDNA na reakcję, z kolei w przypadku 67NR z użyciem 10 ng cDNA na reakcję. Mix reakcyjny oprócz określonej ilości cDNA składał się również z 2x TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz wody wolnej od RNaz – DEPC. Reakcję przeprowadzono w urządzeniu ViiA™ 7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zgodnie z programem: 40 cykli, w temp. 95°C przez 15s, następnie w temp. 60°C przez 60s. Po zakończeniu reakcji wybrano kontrole endogenne (*B2m*, *Actb*, *Sdha* dla 4T1; *B2m*, *Actb* dla 67NR) i przeprowadzono analizę porównawczą $\Delta\Delta C_t$. Jako kalibratory celem uzyskania parametru RQ wybrano próbki z grupy myszy kontrolnych. Analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ExpressionSuite Software v1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.4.11.2 Ocena poziomu białek za pomocą analizy Jess Simple Western

Analizę białek związanych z różnicowaniem limfocytów Th17 w odpowiedzi na witaminę D przeprowadzono na stymulowanych komórkach CD4⁺ pochodzących ze śledziony oraz z guza (opis przygotowania komórek CD4⁺ ze śledziony i guza opisano w rozdziałach 5.4.4 oraz 5.4.3).

5.4.11.2.1 Pomiar poziomu białka

W celu oznaczenia poziomu białka w przygotowanych lizatach komórkowych użyto zestawu DC Protein Assay Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, USA). Oznaczenie opiera się na metodzie kolorymetrycznej Lowry'ego, gdzie stężenie białka w próbce wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla standardu białkowego (albuminy surowicy wołowej; BSA; 2 mg/ml-0,125 mg/ml; Bio-Rad, Hercules, USA). Po rozmrożeniu próbek, odwirowano supernatant (10 000 × g, 4°C, 10 min), po czym przeniesiono go do świeżej probówki. Lizaty CD4⁺ zagęszczano przy użyciu kolumn Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filter Unit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Całkowitą objętość próbki przenoszono na filtr, wirowano 14 000 × g, 4°C, 15 min, po czym zagęszczoną próbkę przenoszono do świeżej probówki. Białko oznaczono z użyciem wspomnianego powyżej zestawu, dla guza, w oznaczeniu zastosowano 30-krotne rozcieńczenie. Pomiar absorbancji wykonano przy użyciu czytnika Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.4.11.2.2 Analiza poziomu białek z wykorzystaniem metody detekcyjnej Jess Simple Western

Zautomatyzowana metoda detekcji białek Jess Simple Western stanowi nowoczesną alternatywę dla tradycyjnej metody Western Blot. Użycie analizy Simple Western umożliwiło oznaczenie białka z lizatów komórek CD4⁺, w których stężenie białka było bardzo niskie. Do analizy wykorzystano odczynniki dedykowane metodzie Jess Simple Western (ProteinSimple, Bio-Techne, Minneapolis, USA). Oznaczenia białek takich jak ERK/p-ERK, mTOR/p-mTOR, NF-κB/p-NF-κB, JNK/p-JNK, p38/p-p38, Akt/p-Akt oraz receptor dla witaminy D (VDR) prowadzone były na lizatach z komórek CD4⁺ pochodzących ze śledziony, z kolei oznaczenie osteopontyny przeprowadzone zostało na komórkach pochodzących z guza. Próbki przygotowano w buforze x0,1 Sample Buffer

(ProteinSimple, Bio-Techne), po czym do każdej z nich dodano x4 Master Mix (EZ standard pack 1/3; ProteinSimple) w stosunku 4:1. Ilości białka całkowitego użytego do oznaczeń poszczególnych białek przedstawiono w Tabeli 11. Próbkę inkubowano na bloku grzejnym w temperaturze 95°C przez 5', po czym przeniesiono na лёd. Kolejny etap stanowiło przygotowanie przeciwciała pierwszorzędowego (spis użytych przeciwciał przedstawiono w Tabeli 10), zgodnie z podanym rozcieńczeniem (przeciwciała pierwszorzędowe rozpuszczano w Milk-free antibody diluent (ProteinSimple, Bio-Techne)). W przypadku oznaczeń, w których w jednej analizie badano dwa różne białka w kanałach detekcji NIR oraz HRP (CHEMI) przygotowano przeciwciała drugorzędowe w stosunku 1:1000 (Anti-Mouse NIR Detection Antibody/Anti-Rabbit NIR Detection Antibody:Anti-Mouse secondary antibody/Anti-Rabbit Secondary antibody (ProteinSimple, Bio-Techne)). Następnie celem wykonania analizy multiplex i normalizacji próbek do białka całkowitego przygotowano roztwór Replex (ProteinSimple, Bio-Techne) oraz roztwór Total Protein Detection (ProteinSimple, Bio-Techne) zgodnie z protokołem producenta. W kolejnym etapie przygotowano roztwór luminolu-S (ProteinSimple, Bio-Techne) oraz Peroksydazy (ProteinSimple, Bio-Techne) w stosunku 1:1. Tak przygotowane roztwory naniesiono na 25-kapilarową płytkę (12-230 kDa separation module lub 66-440 kDa separation module, ProteinSimple, Bio-Techne) dedykowaną do analizy Jess Simple Western, zgodnie ze ściśle określonym schematem (Rycina 10). Analizę prowadzono w aparacie Jess Simple Western System (ProteinSimple, Minneapolis, USA), przy warunkach reakcji opisanych w Tabeli 12.

Tabela 10. Przeciwciała stosowane do immunodetekcji białek metodą Jess Simple Western

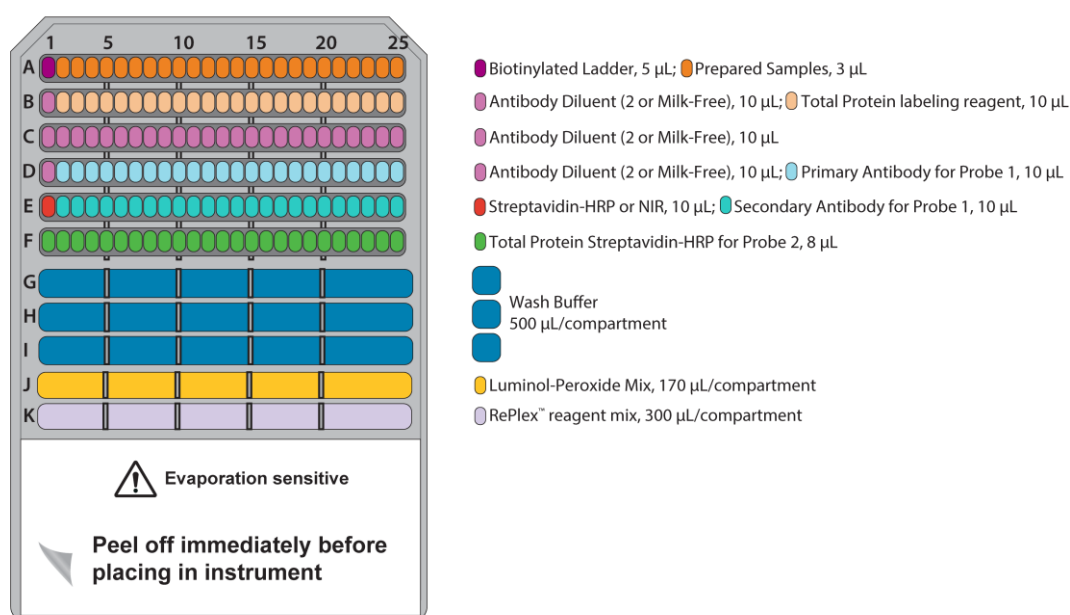
BIAŁKO	POCHODZENIE	KLASA PRZECIWCIAŁA	STOSOWANE ROZCIEŃCZENIE	KANAŁ DETEKCJI	PRODUCENT
Human/Mouse/Rat ERK1/ERK2	królicze	IgG	1:25	NIR	R&D Systems, Minnesota, USA
Human/Mouse/Rat Phospho-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187)	królicze	IgG, # 269434	1:25	HRP (CHEMI)	R&D Systems, Minnesota, USA
mTOR (L27D4)	mysie	IgG1	1:5	HRP (CHEMI)	R&D Systems, Minnesota, USA
Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2)	królicze	IgG	1:5	HRP (CHEMI)	R&D Systems, Minnesota, USA
NF-κB p65 (D14E12)	królicze	IgG	1:25	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology,

BIĄŁKO	POCHODZENIE	KLASA PRZECIWCIAŁA	STOSOWANE ROZCIEŃCZENIE	KANAŁ DETEKCJI	PRODUCENT
					Massachusetts, USA
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (7F1)	mysie	IgG2b	1:25	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
SAPK/JNK Antibody	królicze	-	1:25	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9)	mysie	IgG1	1:25	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
p38 MAPK (D13E1)	królicze	IgG	1:125	NIR	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10)	mysie	IgG1	1:125	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Akt (pan) (40D4)	mysie	IgG1	1:125	NIR (dla 4T1) HRP (CHEMI; dla 67NR)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Phospho-Akt (Ser473) (193H12)	królicze	IgG	1:125	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Vitamin D3 Receptor (D2K6W)	królicze	IgG	1:125	HRP (CHEMI)	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Osteopontin	Królicze	IgG	1:250	HRP (CHEMI)	Proteintech, Rosemont, USA

Tabela 11. Ilości białka całkowitego użytego w analizie Jess Simple Western

Analizowane białko	Ilość białka całkowitego użyta w analizie
ERK/p-ERK	1,12 µg / dołek
mTOR/p-mTOR	1 µg / dołek
NF-κB/p-NF-κB	1,5 µg / dołek
JNK/p-JNK	1,75 µg / dołek

Analizowane białko	Ilość białka całkowitego użyta w analizie
p38/p-p38	1,25 µg / dołek
Akt/p-Akt	1,75 µg / dołek
Receptor dla witaminy D (VDR)	3 µg / dołek
Osteopontyna	0,75 µg / dołek



Rycina 10. Schemat płytki do zautomatyzowanej detekcji białek Jess Simple Western (dzięki uprzejmości Rachael Preston, Bio-Techne).

Tabela 12. Warunki reakcji zautomatyzowanej detekcji białek Jess Simple Western

Etap	Warunki reakcji
Pobranie żelu rozdzielającego	200s
Pobranie żelu zagęszczającego	15s
Pobranie próbek badanych	9s
Rozdział próbek	25', 375 V
Czas ekspozycji standardu	4s
Replex	30'
Znakowanie biotyną	30'
Rozcieńczenie przeciwciała	5'
Pobieranie i inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym	30'
Pobieranie i inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym	30'

Etap	Warunki reakcji
Analiza białka całkowitego (Total Protein, HRP)	30'
Detekcja w kanale chemiluminescencji (CHEMI)	1 ekspozycja – 1s 2 ekspozycja – 2s 3 ekspozycja – 4s 4 ekspozycja – 8s 5 ekspozycja – 16s 6 ekspozycja – 32s 7 ekspozycja – 64s
Detekcja w kanale bliskiej podczerwieni (NIR)	1 ekspozycja – 5s 2 ekspozycja – 10s 3 ekspozycja – 30s 4 ekspozycja – 60s 5 ekspozycja – 120s 6 ekspozycja – 300s

5.4.12 Różnicowanie limfocytów Th17

Indukowane limfocyty Th17 (iTh17) zróżnicowano w warunkach *ex vivo* ze śledzion pochodzących od myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego obarczonych guzami 4T1. W celu zróżnicowania limfocytów Th17, płytkę 24-dołkową opłaszczono przeciwciałami anty-CD3 (5 µg/ml) oraz anty-CD28 (5 µg/ml) zawieszonymi w jałowym PBS-ie (500 µl/dołek) i inkubowano przez noc w 4°C. Kolejnego dnia, przepłukano dwukrotnie PBS-em opłaszczoną dzień wcześniej płytkę i wysiano $0,5 \times 10^6$ komórek CD4⁺ (separacja magnetyczna i przygotowanie komórek CD4⁺ opisano w podrozdziale 5.4.10) zawieszonych w medium IMDM + GlutaMax + 10% FBS + 100 µg/ml streptomycyny + 100 U/ml penicyliny + IL-6 (50 ng/ml) + TGF-β (1 ng/ml) + β-merkaptotanol (5×10^{-5} M). Komórki hodowano przez 4 dni w 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza. Po upływie 4 dni zróżnicowane limfocyty Th17 poddawano dalszym analizom, a supernatant zabezpieczono w -80°C do dalszych analiz.

5.4.12.1 Blokowanie receptorów dla osteopontyny w warunkach *in vitro*

Celem zbadania wpływu białek powierzchniowych mających szczególne znaczenie w różnicowaniu limfocytów Th17 i zidentyfikowanych w analizie opisanej w rozdziale 5.4.7 przeanalizowano wpływ zablokowania CD44, CD51 i CD29 na proces różnicowania komórek Th17 pochodzących od myszy zdrowych, SHAM oraz myszy obarczonych guzami 4T1. Przeprowadzono analizę różnicowania limfocytów Th17 zgodnie ze schematem przedstawionym w rozdziale 5.4.12, gdzie komórki CD4⁺

bezpośrednio po separacji, poddano inkubacji z przeciwciałami blokującymi poszczególne białka, zawieszonymi w medium IMDM + GlutaMax + 10% FBS + 100 µg/ml streptomycyny + 100 U/ml penicyliny + β-merkaptotanol ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) z dodatkiem przeciwciał blokujących (Tabela 13) na czystej, nieopłaszczonej płytce 24-dołkowej. Komórki inkubowano przez 30' w 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza. Po 30-minutowej inkubacji komórki zebrano wraz z medium, uzupełniono o czynniki różnicujące (IL-6 (50 ng/ml) i TGF-β (1 ng/ml)), wysiano na opłaszczone płytki i hodowano przez 4 dni w tych samych warunkach. Ostatniego dnia, każdy dołek uzupełniono o PMA (50 ng/ml) + jonomycynę (500 ng/ml) + brefeldynę A (5 µg/ml) i inkubowano przez 4 godziny w 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności powietrza. Po zakończonym procesie różnicowania, indukowane limfocyty Th17 poddano analizie cytometrycznej celem oznaczenia wewnątrzkomórkowego poziomu IL-17 oraz IFN-γ, będących sprawdzieniem wpływu blokowania na różnicowanie się komórek CD4⁺ (schemat barwienia wewnątrzkomórkowego opisano w rozdziale 5.4.8).

Tabela 13. Przeciwciała stosowane do blokowania receptorów dla osteopontyny

ANTYGEN	POCHODZENIE	KLASA PRZECIWCIAŁA (KLON)	STOSOWANE STĘŻENIE	PRODUCENT
CD44 Monoclonal Antibody	Szczurze	IgG2b, kappa (IM7)	2µg/ml	eBioscience
Rat IgG2b kappa Isotype Control	Szczurze	IgG2b, kappa (eB149/10H5)	2µg/ml	eBioscience
CD51 (Integrin alpha V) Monoclonal Antibody	Szczurze	IgG1, kappa (RMV-7)	2µg/ml	eBioscience
Rat IgG1 kappa Isotype Control	Szczurze	IgG1, kappa (eBRG1)	2µg/ml	eBioscience
CD29 (Integrin beta 1) Monoclonal Antibody	Chomicze	IgG (eBioHmb1-1 (Hmb1-1))	4µg/ml	eBioscience
Armenian Hamster IgG Isotype Control	Chomicze	IgG (eBio299Arm)	4µg/ml	eBioscience

5.4.13 Ocena poziomu ekspresji wybranych czynników metodą ELISA

Analizę poziomu ekspresji wybranych czynników za pomocą metody ELISA przeprowadzono w osoczu myszy zdrowych, myszy zaszczepionych komórkami nowotworowymi linii 4T1 i 67NR (oznaczenie poziomu osteopontyny, VEGF oraz 25(OH)D₃) oraz supernatantach z nad hodowli stymulowanych komórek CD4⁺ oraz hodowli różnicowanych limfocytów Th17 pochodzących ze śledzion myszy obciążonych guzami 4T1 (oznaczenie osteopontyny). Przygotowanie osocza oraz supernatantów opisano kolejno w podrozdziałach 5.4.2, 5.4.11, 5.4.12. Poszczególne testy ELISA wykonano zgodnie z protokołami producentów. Użyte testy przedstawiono w Tabeli 14. Stężenie białek w analitach obliczono z równania krzywej wyznaczonej w programie CurveExpert 1.4.

Tabela 14. Lista zestawów ELISA wykorzystanych do oznaczeń poziomu cząsteczek

Nazwa	Numer katalogowy	Model nowotworowy	Badany materiał	Producent
OPN	DY441	4T1 i 67NR, myszy zdrowe	Osocze	R&D Systems, Minnesota, USA
		4T1	supernatanty z nad hodowli stymulowanych komórek CD4 ⁺	
		4T1	supernatanty z nad hodowli różnicowanych limfocytów Th17	
VEGF	BMS619-2	4T1 i 67NR, myszy zdrowe	Osocze	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA
25(OH)D ₃	MBS2601506	4T1 i 67NR, myszy zdrowe	Osocze	MyBioSource, San Diego, USA

OPN – Osteopontyna, VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, 25(OH)D₃ – metabolit witaminy D

6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie do analizy danych GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA). Pierwszy etap stanowiło sprawdzenie normalności rozkładu z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilk'a. Dane, które spełniały założenia rozkładu normalnego poddawano analizie wykorzystując test ANOVA (jednokierunkowa lub dwukierunkowa ANOVA) z kolei w przypadku danych niespełniających założeń testu normalności przeprowadzano analizę wykorzystując test Kruskal-Wallis'a. Porównując dwie grupy danych korzystano z testu U Manna-Whitneya lub testu t-Studenta. Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami uznawano, gdy $p \leq 0,05$.

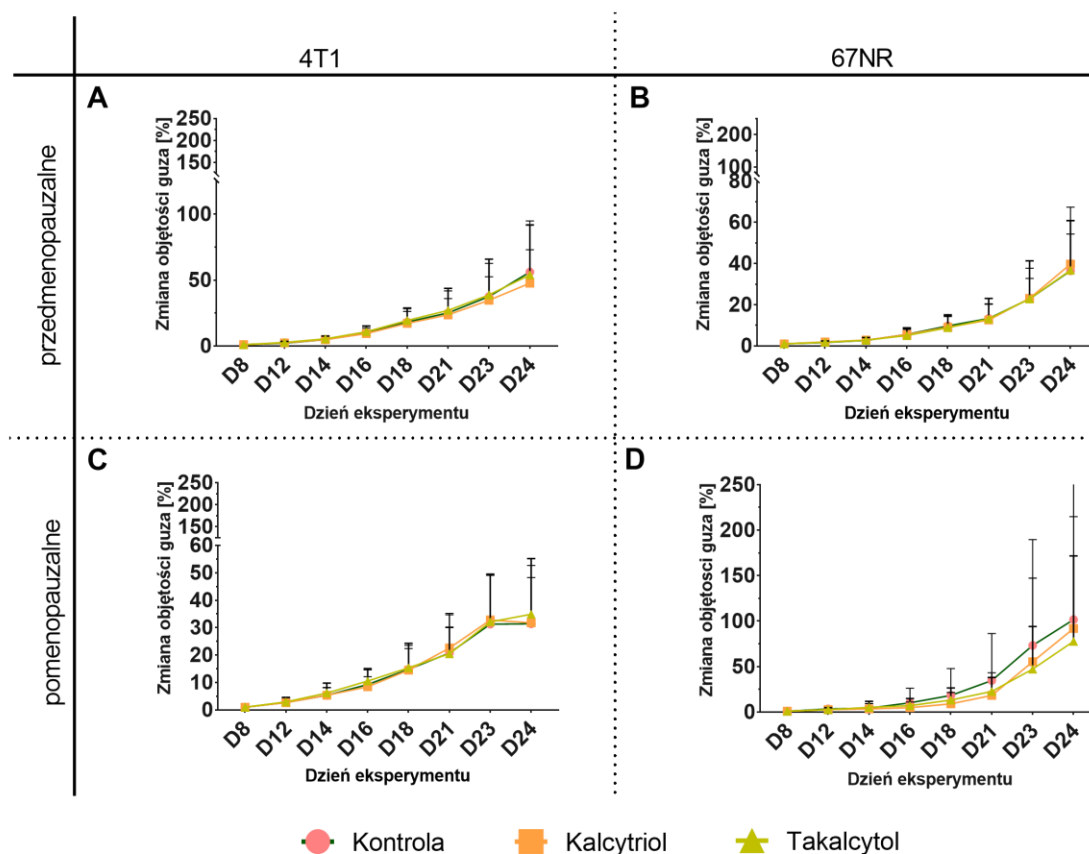
WYNIKI

7. Badania *in vivo*

7.1 Ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na wzrost guza u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR

Pomiary wzrostu guza u myszy młodych obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 lub 67NR wskazywały na brak istotnych różnic w przyroście wielkości guza pomiędzy grupami myszy traktowanych kalcytriolem lub takalcytolem a grupą kontrolną (Rycina 11A i B).

U myszy obciążonych tymi samymi nowotworami, lecz starszych, poddanych owariektomii (model pomenopauzalny) również obserwowano brak znaczących różnic pomiędzy badanymi grupami (Rycina 11C i D).



Rycina 11. Kinetyka wzrostu guza mysich raków gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR.

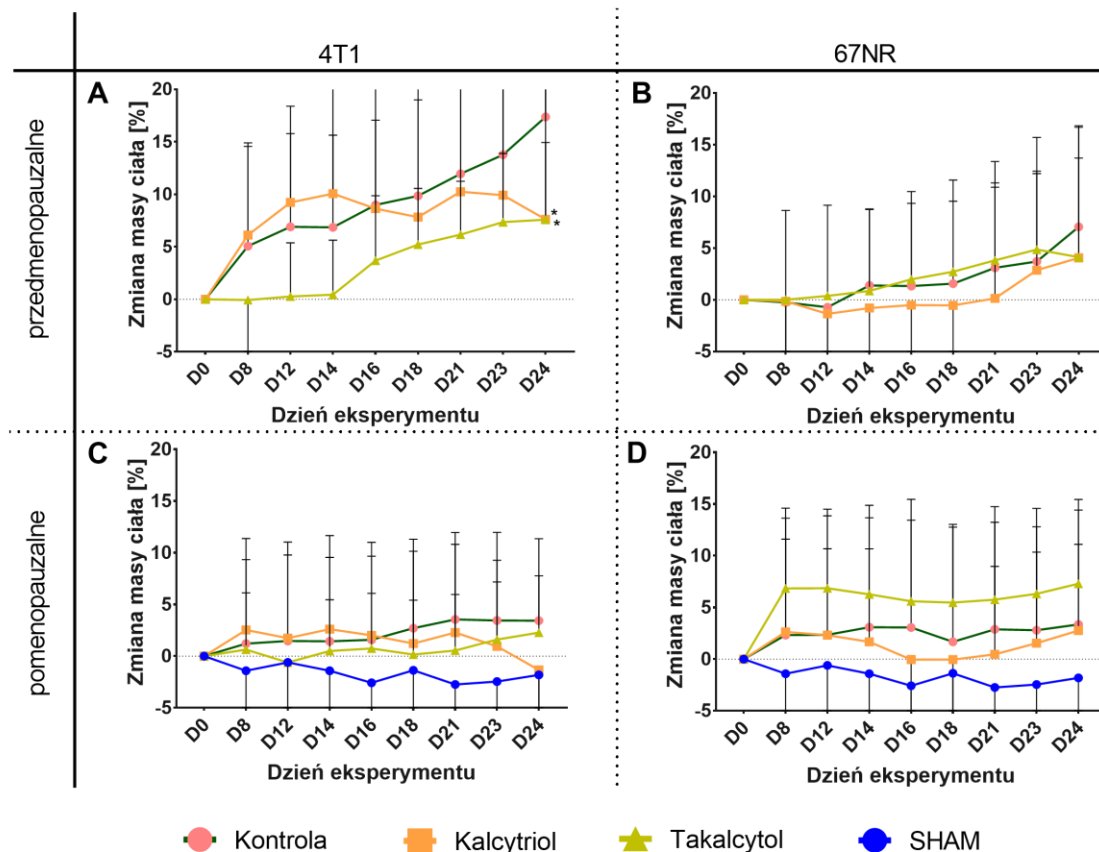
Wyniki przedstawiono w postaci procentu zmiany objętości guza w stosunku do dnia pierwszego pomiaru (dzień 8) $\pm$ odchylenie standardowe, N=20/grupę (Na wykresach przedstawiono wyniki z czterech eksperymentów). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu dwukierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

7.2 Ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na masę ciała myszy

Ocena toksyczności stosowanych preparatów w modelu przedmenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 nie wykazała różnic w zmianie masy ciała myszy przez cały czas trwania eksperymentu, aż do ostatniego dnia pomiaru (dzień 24), w którym masa ciała myszy traktowanych kalcytriolem oraz takalcytolem istotnie obniżyła się dwukrotnie względem grupy kontrolnej (Rycina 12A).

Nie wykazano istotnych różnic w masie ciała między grupami eksperymentalnymi u myszy obarczonych guzami 4T1 w modelu pomenopauzalnym (Rycina 12C).

Podobnie, nie obserwowano istotnych różnic w masie ciała między grupami eksperymentalnymi myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym (Rycina 12B i D).



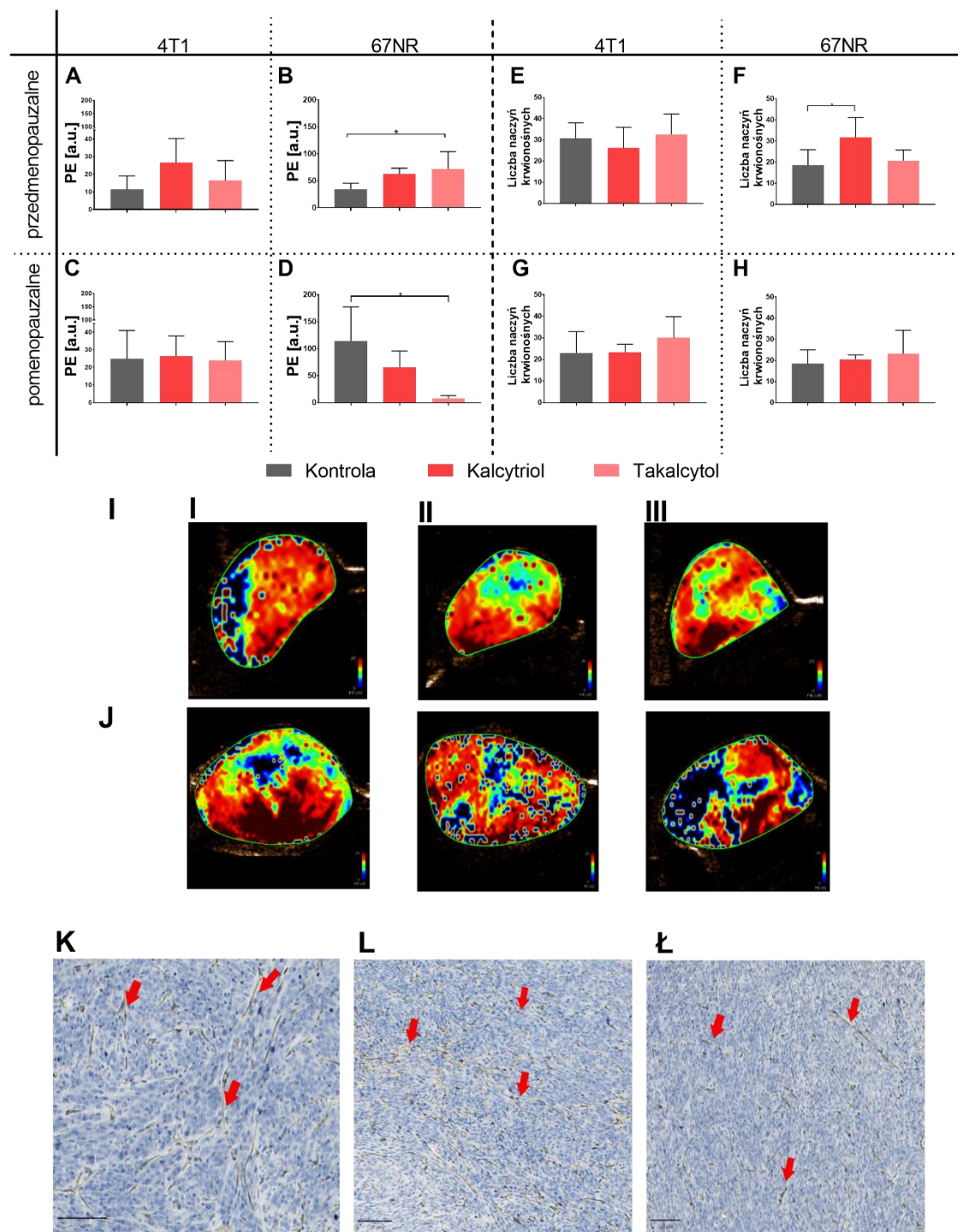
Rycina 12. Kinetyka zmiany masy ciała myszy obciążonych mysim rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR. Pomiary masy ciała dla każdej myszy normalizowano, obliczając stosunek pomiaru z danego dnia eksperymentu względem pomiaru w dniu rozpoczęcia eksperymentu dla każdej z myszy. Wyniki przedstawiono w postaci procentu zmiany masy ciała w odniesieniu do dnia pierwszego pomiaru (dzień 0). N=20/grupę (Na wykresach przedstawiono wyniki z czterech eksperymentów). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu dwukierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

7.3 Ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na proces angiogenezy w guzach myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR

Przyżyciowa analiza ultrasonograficzna - USG nie wykazała różnic między badanymi grupami myszy obarczonych guzami 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym (Rycina 13A i C).

Parametr maksymalnej intensywności sygnału (PE) w guzach myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przedmenopauzalnym wzrósł dwukrotnie w grupie traktowanej takalcytolem względem grupy kontrolnej (Rycina 13B, I.III), zaś w modelu pomenopauzalnym wykazano piętnastokrotny spadek wartości PE w grupie myszy traktowanej takalcytolem względem grupy kontrolnej (Rycina 13D, J.III).

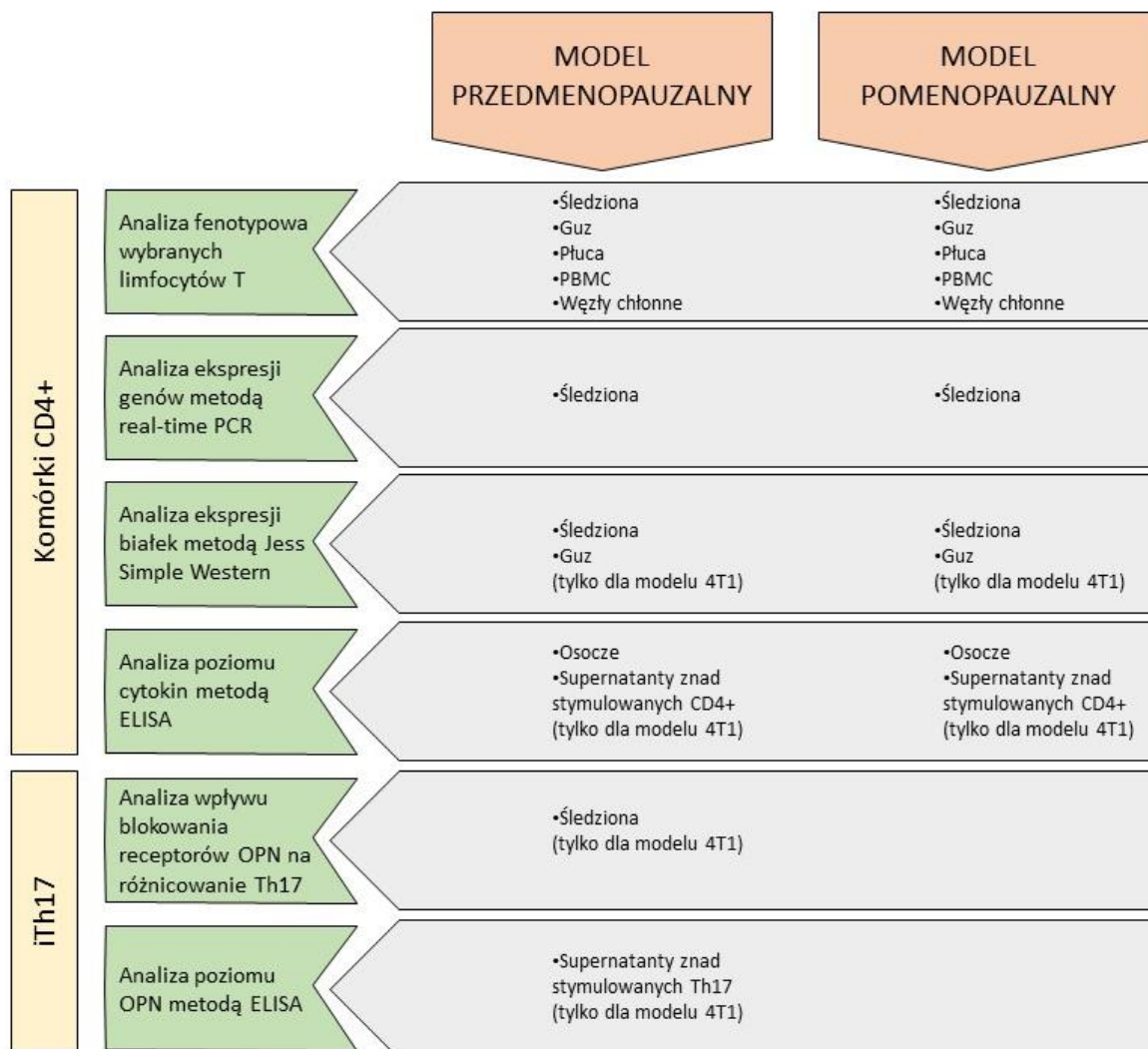
Niezależna analiza histopatologiczna guza pozwoliła określić liczbę naczyń krwionośnych przypadającą na pole widzenia. Zarówno dla myszy w modelu przed- jak i pomenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1, nie zauważono istotnych różnic między grupami traktowanymi kalcytriolem i takalcytolem a grupą kontrolną (Rycina 13E i G). Natomiast w grupie myszy młodych obarczonych guzami 67NR, traktowanych kalcytriolem liczba naczyń zwiększyła się istotnie względem grupy kontrolnej (Rycina 13F). Liczba naczyń przypadająca na pole widzenia w modelu pomenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR nie różniła się znacząco między grupami eksperymentalnymi (Rycina 13H).



Rycina 13. Analiza wpływu kalcytriolu i takalcytolu na proces angiogenezy w mysim modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR. Na wykresach (A-D) przedstawiono parametr maksymalnej intensywności sygnału/maksymalnego wysycenia kontrastem (peak enhancement - PE) dla myszy w modelu przed- i pomenopauzalnym raka gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR, który określono poprzez wykonanie badania ultrasonograficznego. Na wykresach (E-H) przedstawiono liczbę naczyń krwionośnych guza przypadającą na pole widzenia, którą oceniono za pomocą

analizy histopatologicznej. Reprezentatywne zdjęcia z badania perfuzji krwi w obrębie guza w modelu przedmenopauzalnym (I) oraz pomenopauzalnym (J) myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR; I – grupa kontrolna; II – kalcytriol; III – takalcytol. Na zdjęciach (K-Ł) przedstawiono reprezentatywne wyniki z analizy immunohistochemicznej (barwienie anty-CD31) w tkance guza dla modelu pomenopauzalnego 67NR; K - grupa kontrolna; L – kalcytriol; Ł – takalcytol. Czerwone strzałki wskazują na lokalizację skupisk komórek CD31⁺. N=5. Analizę statystyczną dla przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowego ANOVA i testu *post hoc* Sidak’a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

8. Badania ex vivo



Rycina 14. Lista tkanek i komórek wykorzystanych w doświadczeniach ex vivo.

8.1 Ocena wybranych parametrów morfologicznych krwi wobec działania kalcytriolu i takalcytolu

Określenie poszczególnych parametrów morfologicznych krwi z użyciem analizatora hematologicznego pozwoliło na ocenę wpływu kalcytriolu i takalcytolu na poszczególne frakcje komórek krwi pełnej. Do analizy włączono również wyniki pochodzące od młodych myszy zdrowych, stanowiących kontrolę niezaszczepioną komórkami nowotworowymi oraz wyniki pochodzące od myszy w modelu

pomenopauzalnym, z grupy SHAM, poddanej pozorowanej owariektomi, również jako kontrolę bez nowotworu.

W analizie wyników pochodzących od myszy z modelu przedmenopauzalnego 4T1, bezwzględna liczba leukocytów, limfocytów, monocytów, granulocytów oraz płytek krwi była istotnie niższa w grupie myszy zdrowych. Co więcej, we wszystkich wspomnianych powyżej frakcjach, z wyjątkiem płytek krwi obserwowany był wzrost liczby komórek w grupie traktowanej takalcytolem względem grupy kontrolnej. Odsetek limfocytów w grupie myszy zdrowych był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Z kolei, wyraźny spadek odsetka limfocytów odnotowano po traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem. W przypadku frakcji monocytów, granulocytów oraz hematokrytu wykazano istotnie niższe wartości tych parametrów w grupie myszy zdrowych względem grupy kontrolnej.

Analiza krwi pełnej, pobranej od myszy obarczonych tym samym typem nowotworu, lecz reprezentujących model pomenopauzalny dowiodła, iż liczba leukocytów, limfocytów, monocytów i granulocytów była istotnie niższa w grupie myszy SHAM w porównaniu do grupy kontrolnej. Podwyższoną liczbę erytrocytów i hemoglobiny wykazano w grupie myszy SHAM względem grupy kontrolnej. Zwiększony odsetek komórek w tej grupie stwierdzono również w badaniu frakcji limfocytów oraz hematokrytu. Co więcej, w tej samej grupie myszy odsetek monocytów oraz granulocytów był istotnie mniejszy w porównaniu do grupy kontrolnej.

We krwi myszy młodych, obarczonych komórkami 67NR stwierdzono istotne statystycznie obniżenie bezwzględnej liczby leukocytów i granulocytów u myszy traktowanych takalcytolem względem grupy kontrolnej. Stwierdzono również obniżoną liczbę monocytów i płytek krwi w grupie myszy zdrowych w porównaniu do grupy kontrolnej. U myszy z grupy kontrolnej występowało obniżenie frakcji limfocytarnej oraz podwyższenie frakcji monocytarnej w porównaniu do myszy zdrowych.

Ocena parametrów morfologicznych u myszy zaszczepionych tym samym nowotworem, lecz w modelu pomenopauzalnym pokazała znacząco niższą bezwzględną liczbę leukocytów, limfocytów, monocytów i granulocytów w grupie myszy SHAM w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie tej odnotowano również niższy odsetek granulocytów w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza morfologiczna wykazała we krwi myszy SHAM istotnie wyższy odsetek limfocytów w porównaniu do myszy kontrolnych obarczonych rakiem sutka 4T1. Istotne obniżenie poziomu hematokrytu,

zaobserwowano w grupie myszy traktowanych takalcytolem względem grupy kontrolnej (Tabela 15).

Tabela 15. Analiza wybranych parametrów morfologicznych krwi pobranej od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR w dwóch grupach wiekowych. Analizę przeprowadzono w czterech niezależnych eksperymentach dla myszy z grup eksperymentalnych kontrolnej, traktowanej kalcytriolem i takalcytolem oraz jeden niezależny eksperyment dla myszy zdrowych i SHAM. N=5/1 niezależny eksperyment. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a lub Kruskalla-Wallis'a oraz testu t-Studenta lub Manna-Whitney'a dla pojedynczych porównań grup kontrolnej oraz myszy zdrowych/SHAM. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Parametr	Nazwa grupy	Model nowotworowy/ grupa wiekowa			
		4T1 przedmenopauzalne	4T1 pomenopauzalne	67NR przedmenopauzalne	67NR pomenopauzalne
Leukocyty [$10^3/\mu\text{l}$]	Zdrowe/SHAM	$6,8 \pm 1,2^*$	$14,5 \pm 13,5^*$	$6,8 \pm 1,2$	$4,7 \pm 2,1^*$
	Kontrola	$143,8 \pm 87,4$	$181,7 \pm 132,5$	$6,4 \pm 2,1$	$7,9 \pm 2,1$
	Kalcytriol	$212,8 \pm 165,5$	$226,9 \pm 136,0$	$6,6 \pm 1,8$	$7,4 \pm 2,0$
	Takalcyto	$238,7 \pm 138,6^*$	$201,4 \pm 125,4$	$4,9 \pm 1,5^*$	$6,8 \pm 1,7$
Limfocyty [$10^3/\mu\text{l}$]	Zdrowe/SHAM	$5,7 \pm 1,0^*$	$11,5 \pm 10,9^*$	$5,7 \pm 1,0$	$3,8 \pm 1,8^*$
	Kontrola	$27,4 \pm 9,9$	$27,1 \pm 11,0$	$4,8 \pm 1,4$	$5,5 \pm 1,4$
	Kalcytriol	$22,8 \pm 5,5$	$35,2 \pm 14,4$	$5,1 \pm 1,9$	$5,0 \pm 1,3$
	Takalcyto	$40,0 \pm 17,3^*$	$31,4 \pm 12,8$	$3,9 \pm 1,0$	$4,5 \pm 1,1$
Monocyty [$10^3/\mu\text{l}$]	Zdrowe/SHAM	$0,3 \pm 0^*$	$0,8 \pm 0,6^*$	$0,3 \pm 0^*$	$0,4 \pm 0,2^*$
	Kontrola	$19,6 \pm 9,6$	$20,0 \pm 12,1$	$0,7 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$
	Kalcytriol	$29,8 \pm 19,7$	$27,4 \pm 13,7$	$0,8 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$
	Takalcyto	$33,6 \pm 18,7^*$	$26,0 \pm 13,5$	$0,6 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$
Granulocyty [$10^3/\mu\text{l}$]	Zdrowe/SHAM	$0,7 \pm 0,1^*$	$2,1 \pm 2,1^*$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,4^*$
	Kontrola	$87,0 \pm 58,8$	$113,9 \pm 79,2$	$1,0 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,7$
	Kalcytriol	$147,6 \pm 125,2$	$158,6 \pm 104,6$	$1,0 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,8$
	Takalcyto	$161,6 \pm 98,7^*$	$144,0 \pm 101,2$	$0,6 \pm 0,4^*$	$1,6 \pm 0,8$
Erytrocyty [$10^6/\mu\text{l}$]	Zdrowe/SHAM	$8,7 \pm 0,1$	$19,1 \pm 13,4^*$	$8,7 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,8$
	Kontrola	$10,0 \pm 2,0$	$9,8 \pm 2,4$	$8,1 \pm 1,1$	$7,8 \pm 0,8$
	Kalcytriol	$10,8 \pm 2,8$	$11,0 \pm 1,4$	$8,4 \pm 0,7$	$7,6 \pm 0,8$
	Takalcyto	$10,5 \pm 2,2$	$11,1 \pm 1,7$	$8,6 \pm 1,4$	$7,3 \pm 0,7$
Hemoglobina [g/dl]	Zdrowe/SHAM	$16,4 \pm 0,3$	$35,1 \pm 23,9^*$	$16,4 \pm 0,3$	$14,9 \pm 1,4$
	Kontrola	$17,3 \pm 5,9$	$19,5 \pm 4,7$	$15,3 \pm 2,2$	$15,0 \pm 1,3$
	Kalcytriol	$19,1 \pm 7,9$	$21,3 \pm 2,7$	$15,5 \pm 1,2$	$14,5 \pm 1,6$

Parametr	Nazwa grupy	Model nowotworowy/ grupa wiekowa			
		4T1 przedmenopauzalne	4T1 pomenopauzalne	67NR przedmenopauzalne	67NR pomenopauzalne
krwi	Takalcytol	18,1 ± 6,2	21,1 ± 3,7	15,1 ± 1,2	14,1 ± 1,2
	Zdrowe/ SHAM	209,0 ± 77,7*	532,3 ± 379,6	209,0 ± 77,7*	317,8 ± 122,4
	Kontrola	502,5 ± 146,9	551,2 ± 113,0	343,6 ± 134,0	418,1 ± 115,7
	Kalcytrol	544,8 ± 141,7	541,4 ± 161,7	355,0 ± 120,4	410,6 ± 109,1
	Takalcytol	505,8 ± 127,2	581,6 ± 158,6	301,5 ± 100,7	392,2 ± 134,8
Płytki [g/dl]	Zdrowe/ SHAM	84,1 ± 2,6*	79,2 ± 3,6*	84,3 ± 2,6*	79,2 ± 3,4*
	Kontrola	22,1 ± 6,5	18,0 ± 4,8	71,0 ± 15,7	70,4 ± 5,5
	Kalcytrol	18,0 ± 4,2*	18,6 ± 4,5	61,8 ± 22,2	68,7 ± 5,7
	Takalcytol	17,8 ± 2,0*	18,1 ± 5,0	76,3 ± 10,9	66,8 ± 9,7
Limfocyty [%]	Zdrowe/ SHAM	5,3 ± 1,1*	8,0 ± 3,5*	5,3 ± 1,4*	9,3 ± 3,2
	Kontrola	14,6 ± 3,4	12,9 ± 3,5	12,1 ± 4,0	9,7 ± 1,9
	Kalcytrol	15,4 ± 3,6	13,7 ± 2,5	13,7 ± 3,7	10,8 ± 2,5
	Takalcytol	14,6 ± 1,8	13,6 ± 2,2	12,3 ± 3,2	11,2 ± 2,3
Monocyty [%]	Zdrowe/ SHAM	10,6 ± 2,4*	13,4 ± 3,4*	10,6 ± 2,4	12,3 ± 2,7*
	Kontrola	63,3 ± 8,9	67,7 ± 10,3	13,9 ± 6,4	19,9 ± 5,9
	Kalcytrol	67,0 ± 6,7	67,7 ± 6,6	15,3 ± 7,4	20,5 ± 6,3
	Takalcytol	67,5 ± 3,8	67,9 ± 7,2	12,2 ± 8,3	22,0 ± 8,8
Granulocyty [%]	Zdrowe/ SHAM	35,7 ± 0,6*	140,1 ± 9,4*	35,7 ± 0,6	35,9 ± 3,3
	Kontrola	47,9 ± 8,4	47,5 ± 12,2	35,3 ± 3,3	36,9 ± 2,7
	Kalcytrol	51,0 ± 14,1	52,2 ± 6,1	36,9 ± 3,2	35,6 ± 3,5
	Takalcytol	50,6 ± 10,3	50,6 ± 9,3	36,9 ± 2,7	34,6 ± 2,8*
Hematokryt [%]	Zdrowe/ SHAM				
	Kontrola				
	Kalcytrol				
	Takalcytol				

8.2 Ocena wybranych parametrów biochemicznych wobec działania kalcytrolu i takalcytolu

Parametry biochemiczne stanowią istotny czynnik prognostyczny, dający możliwość oceny stanu poszczególnych narządów. w badaniu określono poziom ALT (aminotransferaza alaninowa) i AST (aminotransferaza asparaginianowa) oraz wskaźnika de Ritisa, markera zaawansowanego uszkodzenia wątroby [254]. Wskaźnik de Ritisa wyliczono na podstawie stosunku wartości poziomu AST do ALT. W analizie biochemicznej określono również stężenie wapnia, który może być regulowany działaniem obu form witaminy D oraz poziom kreatyniny umożliwiający ocenę pracy nerek.

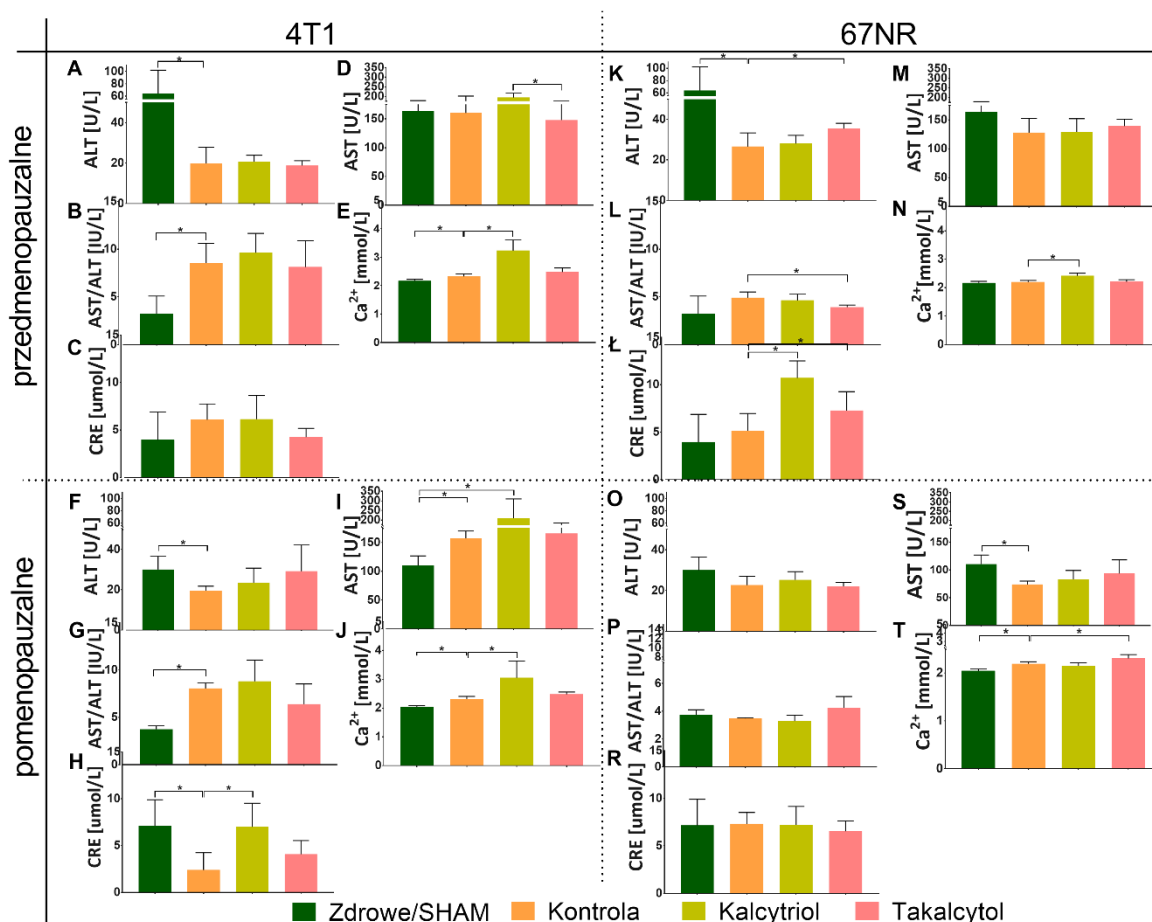
Analiza osocza pochodzącego od myszy młodych obarczonych guzami 4T1 wskazała na istotnie wyższy poziom ALT u myszy zdrowych względem grupy kontrolnej.

Z kolei wskaźnik de Ritisa oraz poziom wapnia były znacząco niższe u myszy zdrowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Działanie kalcytriolu powodowało u myszy w tej grupie zwiększenie stężenia wapnia w osoczu w porównaniu do grupy myszy kontrolnych. Nie obserwowano istotnych zmian między grupami w poziomie kreatyniny (Rycina 15A-C).

Analogiczną analizę wykonano dla mysiego modelu pomenopauzalnego myszy obarczonych guzem 4T1. Poziom wskaźnika ALT był istotnie niższy zaś AST istotnie wyższy w kontroli względem grupy SHAM. Obecność nowotworu u myszy z grupy kontrolnej spowodowała istotny wzrost wartości wskaźnika de Ritisa porównując do grupy SHAM. Stężenie wapnia było niższe w grupie SHAM oraz podwyższone w grupie traktowanej kalcytriolem. Z kolei, poziom kreatyniny był wyższy zarówno w grupie SHAM jak i leczonej kalcytriolem względem myszy z grupy kontrolnej (Rycina 15F-H).

U myszy w modelu przedmenopauzalnym, obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR zauważono wyraźnie wyższe stężenie ALT w grupie myszy zdrowych oraz traktowanych takalcytolem względem grupy kontrolnej. Drugi parametr wątrobowy – AST w tym mysim modelu nie różnił się między leczonymi grupami. Spadek wskaźnika uszkodzenia wątroby u młodych myszy tego modelu odnotowano dla grupy traktowanej takalcytolem względem grupy kontrolnej. Leczenie myszy aktywną formą witaminy D – kalcytriolem spowodowało podwyższenie poziomu wapnia oraz kreatyniny w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, leczenie takalcytolem powodowało wzrost stężenia kreatyniny względem grupy kontrolnej (Rycina 15K-L).

Wyższy poziom AST stwierdzono w grupie myszy SHAM porównując do grupy kontrolnej, przy czym drugi parametr wątrobowy oraz wskaźnik de Ritisa nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami w modelu pomenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR. Odnotowano niższe stężenie wapnia w osoczu względem grupy kontrolnej w grupie SHAM oraz podwyższenie jego stężenia w grupie, której podawany był takalcytol. Stężenie kreatyniny pozostawało bez zmian niezależnie od obecności nowotworu i sposobu leczenia (Rycina 15O-R).

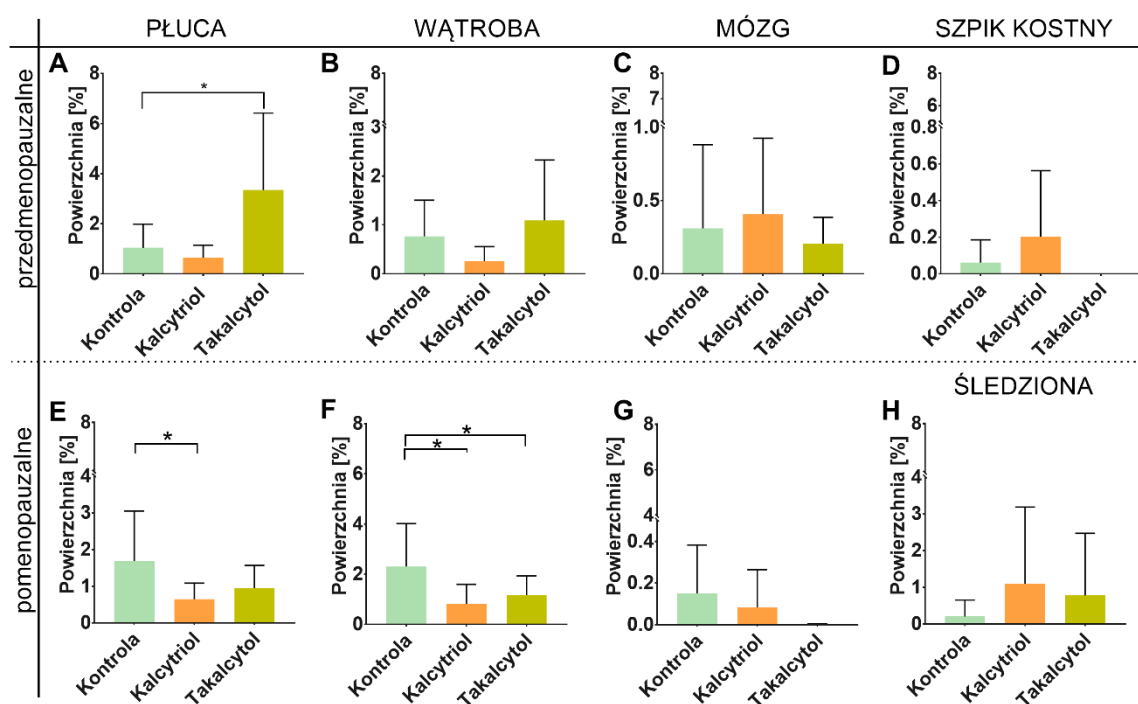


Rycina 15. Analiza wybranych parametrów biochemicznych w osoczu u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR traktowanych kalcytriolem lub takalcytolem w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym. A-E parametry biochemiczne oznaczone w osoczu myszy w modelu przedmenopauzalnego 4T1. F-J parametry biochemiczne oznaczone w osoczu myszy w modelu pomenopauzalnego 4T1. K-L parametry biochemiczne oznaczone w osoczu myszy w modelu przedmenopauzalnego 67NR. O-R parametry biochemiczne oznaczone w osoczu myszy w modelu pomenopauzalnego 67NR. Do analizy danych pochodzących od myszy w modelu przedmenopauzalnego włączono wyniki z analiz pochodzących od myszy zdrowych, pozbawionych nowotworu, z kolei do analiz myszy w modelu pomenopauzalnego jako dodatkową kontrolę włączono wyniki pochodzące od myszy SHAM, poddanych pozorowanej ovariectomi, pozbawionych nowotworu. N=5. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowego ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a oraz testu t-Studenta dla pojedynczych porównań grup kontrolnej oraz myszy zdrowych/SHAM. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

8.3 Ocena aktywności przeciwpierzutowej kalcytriolu i takalcytolu w modelu mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1

Zdolność komórek 4T1 do tworzenia przerzutów została zbadana za pomocą testu klonogenego. Traktowanie myszy takalcytolem, spowodowało zwiększoną zdolność komórek do tworzenia kolonii w płucach. Kalcytriol i takalcytol nie wpłynęły na proces przerzutowania do wątroby, mózgu oraz szpiku kostnego. Analizę przeprowadzono również w śledzionie i węzłach chłonnych, w których nie odnotowano obecności komórek nowotworowych u myszy młodych (Rycina 16A-D).

Liczba przerzutów w płucach u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 z modelu pomenopauzalnego i traktowanych kalcytriolem była istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobnie, traktowanie myszy kalcytriolem i takalcytolem powodowało spadek potencjału przerzutowego komórek, wyrażony obniżoną kolonią w wątrobach w stosunku do grupy kontrolnej. Leczenie kalcytriolem i takalcytolem nie wpłynęło na proces przerzutowania do mózgu i śledziony. Zdolność komórek 4T1 do tworzenia przerzutów odległych badano również w szpiku kostnym oraz węzłach chłonnych, gdzie nie stwierdzono obecności komórek nowotworowych niezależnie od sposobu leczenia myszy pomenopauzalnych (Rycina 16E-H). Reprezentatywne zdjęcia z hodowli komórek pochodzących z poszczególnych tkanek załączono w suplemencie (Rycina S - 1).



Rycina 16. Ocena zdolności komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1 do tworzenia przerzutów odległych. A-D analiza zdolności komórek z płuc, wątroby, mózgu i szpiku kostnego do tworzenia przerzutów w modelu przedmenopauzalnym 4T1. E-H analiza zdolności komórek z płuc, wątroby, mózgu i śledziona do tworzenia przerzutów w modelu pomenopauzalnym 4T1. Analizę przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach dla myszy młodych w płucach; dwóch dla myszy starych w płucach; trzech dla myszy młodych w wątrobie; dwóch dla myszy starych w wątrobie; po jednym eksperymencie dla myszy młodych i starych w mózgu, szpiku i węzłach chłonnych oraz jeden niezależny eksperyment dla myszy zdrowych i SHAM. N=5/1 niezależny eksperyment. Wynik testu klonogennego stanowi procent powierzchni zajętej przez kolonie utworzone przez komórki nowotworowe. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowego ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

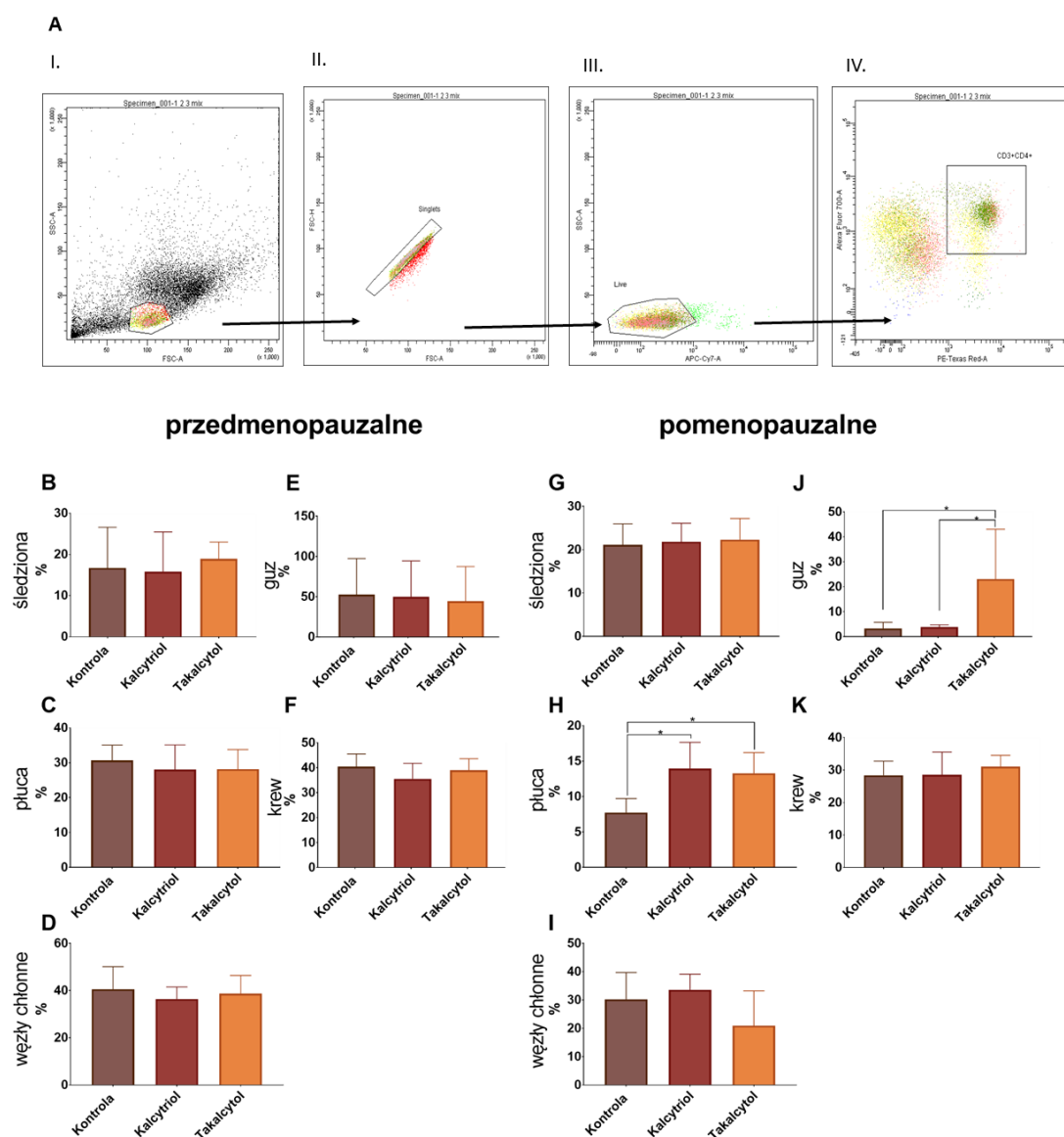
8.4 Ocena fenotypowa limfocytów T pomocniczych wobec działania kalcyttriolu i takalcytolu

Wpływ traktowania myszy kalcyttriolem i takalcytolem na limfocyty T pomocnicze, w tkankach takich jak śledziona, płuca, węzły chłonne, guz i krew (frakcja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej – PBMC), oceniono wykorzystując technikę

cytometrii przepływowej. Populacja komórek CD3⁺CD4⁺ została wyselekcjonowana zgodnie ze schematem bramkowania przedstawionym na Rycinie 17A. Odsetek komórek identyfikowanych jako limfocyty T pomocnicze wyznaczony został jako procentowy udział komórek o fenotypie CD3⁺CD4⁺. Analizie poddano komórki pochodzące z wyszczególnionych wyżej tkanek od myszy z modelu nowotworowego 4T1 oraz śledzion, płuc i guzów od myszy reprezentujących model przed- i pomenopauzalny myszy obciążonych guzem 67NR.

Ilościowe oznaczenie komórek T pomocniczych w poszczególnych tkankach i narządach u myszy obciążonych guzami 4T1 w modelu przedmenopauzalnym nie wykazało różnic w intensywności nacieku (Rycina 17B-F).

Wyraźny wzrost liczby komórek T pomocniczych odnotowano w modelu pomenopauzalnym myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1, w grupie traktowanej takalcytolem w guzie oraz w grupie myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem w płucach. W śledzionie, węzłach chłonnych i krwi nie odnotowano istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi (Rycina 17G-K).



Rycina 17. Analiza odsetka komórek stanowiących frakcję limfocytów T pomocniczych ($CD3^+CD4^+$) w komórkach pochodzących ze śledziony (B i G), płuc (C i H), węzłów chłonnych (D i I), guza (E i J) oraz krwi (F i K) z modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 u myszy reprezentujących grupę przed- i pomenopauzalną. Schemat bramkowania komórek w analizie cytometrycznej (A) dotyczy wyodrębnienia komórek frakcji limfocytarnej (I, oś x FSC-A, oś Y SSC-A), oddzielenie pojedynczych komórek od zlepek komórkowych (II, oś x FSC-A, oś Y SSC-H), kolejno komórek żywych (III, oś x APC-Cy7-A, oś Y SSC-A), wyodrębnienie frakcji komórek $CD3^+CD4^+$ (IV, oś x Pe-TexasRed-A, oś Y AlexaFluor700-A), określanej jako frakcja limfocytów T pomocniczych (Th). Oznaczenia dotyczące krwi zostały przeprowadzone na frakcji mononuklearnej (PBMC). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej

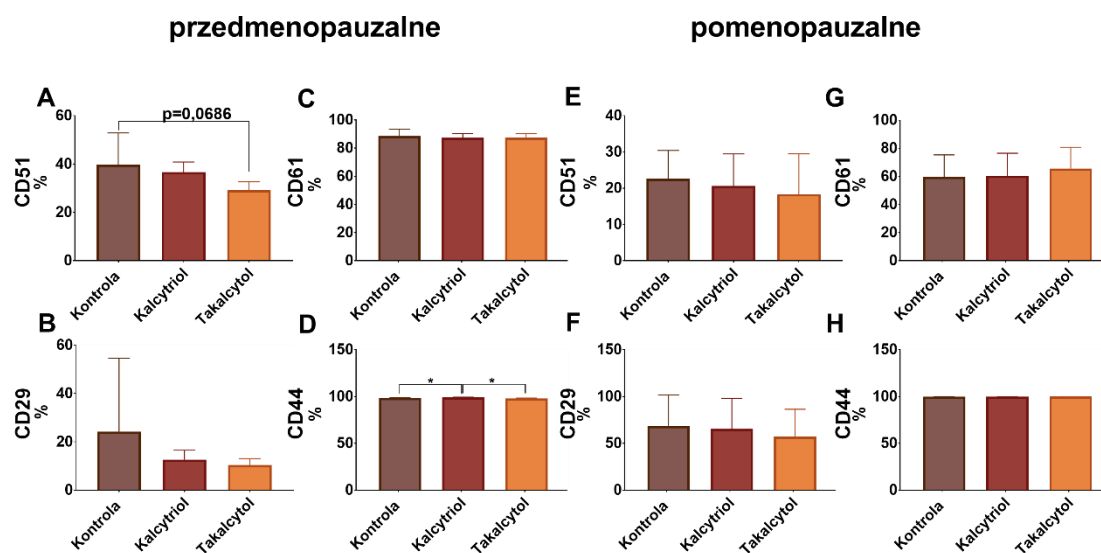
ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Naciek limfocytów T pomocniczych do guza, śledziony i płuc nie różnił się istotnie między leczonymi grupami w modelu przed- i pomenopauzalnym raka gruczołu sutkowego 67NR (Rycina S - 3A-F).

8.4.1 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących ze śledziony

Celem określenia wpływu kalcytriolu i takalcytolu na zmiany ekspresji receptorów dla OPN w komórkach śledziony, przeprowadzono wieloparametryczną analizę cytometryczną.

Wykazała ona, że zastosowanie kalcytriolu w modelu przedmenopauzalnym myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 powoduje statystycznie znamienne wzrost odsetka komórek wykazujących ekspresję CD44. W modelu pomenopauzalnym nie odnotowano istotnych różnic między grupami (Rycina 18).



Rycina 18. Identyfikacja receptorów dla OPN na powierzchni komórek pochodzących ze śledziony u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z OPN ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th,

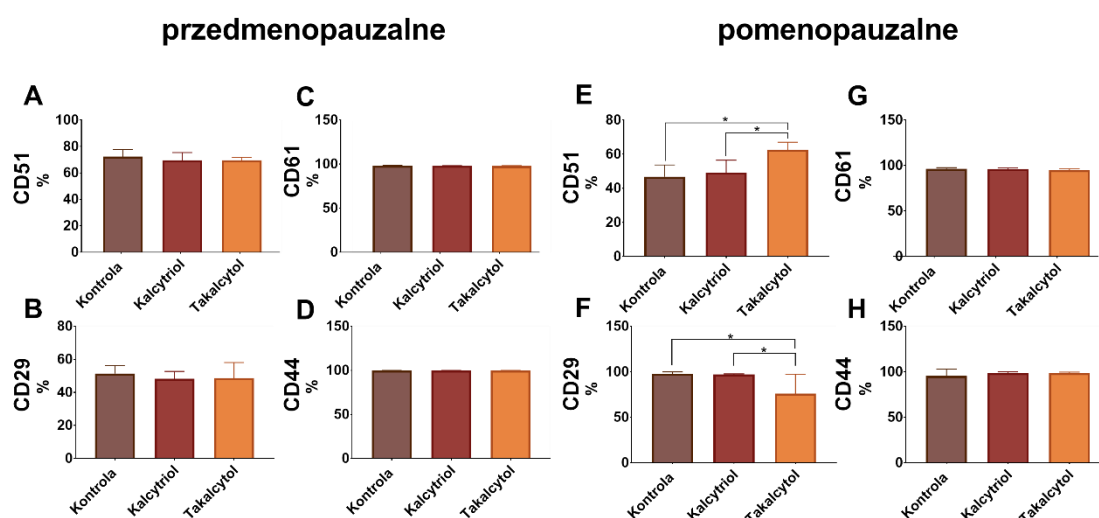
CD3⁺CD4⁺). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Nie zaobserwowano istotnego wpływu kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję receptorów dla OPN w modelu nowotworowym 67NR (Rycina S - 4A-H).

8.4.2 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z guza

Analiza cytometryczna nie wykazała wpływu kalcytriolu i takalcytolu na poziom wybranych receptorów dla OPN w modelu przedmenopauzalnym myszy obciążonych guzem 4T1 (Rycina 19A-D).

W modelu pomenopauzalnym myszy obciążonych guzem 4T1 w efekcie traktowania takalcytolem dochodziło do istotnego statystycznie, półtorakrotnego zwiększenia liczby komórek posiadających receptor CD51 ($p=0,0020$) oraz półtorakrotnego zmniejszenia liczby komórek ekspresjonujących receptor CD29 ($p=0,0165$) (Rycina 19E-F). Nie odnotowano wpływu witaminy D na odsetek komórek posiadających receptor CD61 i CD44 u tych myszy (Rycina 19G-H).

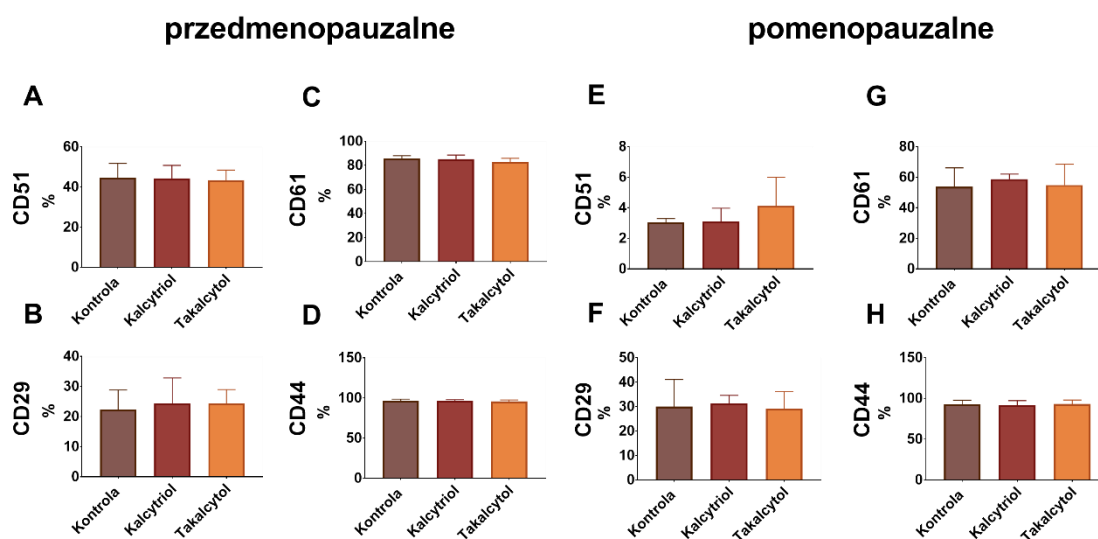


Rycina 19. Analiza poziomu receptorów dla OPN na powierzchni komórek pochodzących z guza od myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z OPN ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3⁺CD4⁺). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Zastosowanie kalcytriolu i jego analogu u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR, zarówno w modelu przed- i pomenopauzalnym nie miało istotnego wpływu na ekspresję CD29, CD61, CD44 oraz CD51 (Rycina S - 5A-H).

8.4.3 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z płuc

Poziom ekspresji wybranych receptorów oddziałujących z OPN w modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR oceniono w tkance płucnej. Zastosowane analogi nie wykazały wpływu na ekspresję receptorów dla OPN w komórkach płuc myszy w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym raka gruczołu sutkowego 4T1 (Rycina 20A-D, Rycina 20E-H) i 67NR (Rycina S - 6).



Rycina 20. Analiza poziomu receptorów dla OPN w komórkach pochodzących z płuc od myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z OPN ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3⁺CD4⁺). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.

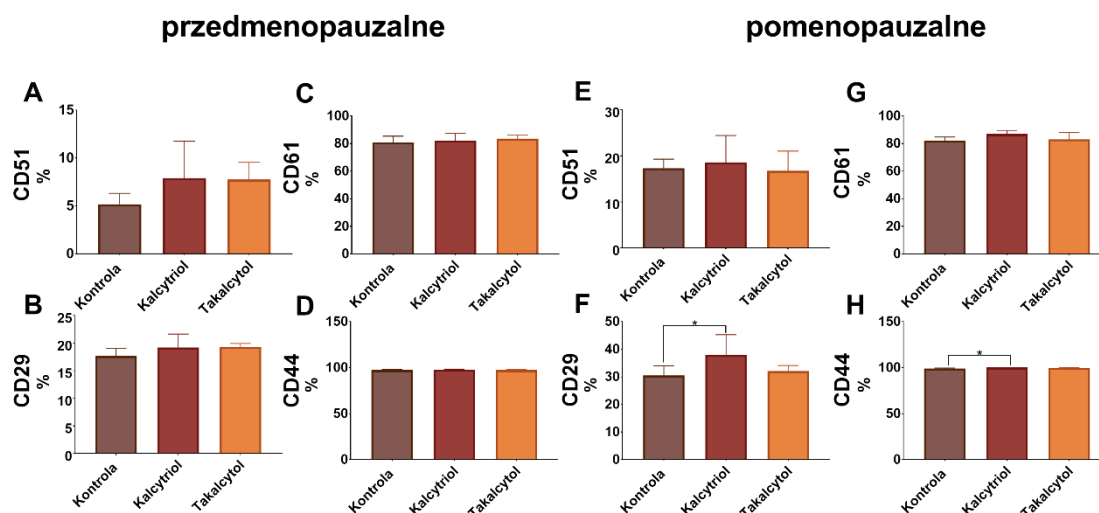
8.4.4 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z krwi

Wieloparametrowa analiza cytometryczna przeprowadzona została na frakcji stanowiącej komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, pochodzącej od myszy z modelu raka gruczołu sutkowego 4T1.

Oceniając ekspresję poszczególnych markerów na powierzchni badanych komórek stwierdzono, że działanie kalcytriolu i takalcytolu nie wpływało na obecność receptorów CD29, CD44, CD51 i CD61 w modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 w grupie myszy młodych (Rycina 21A-D).

W grupie myszy starych, poddanych owariektomii, działanie kalcytriolu spowodowało istotny wzrost ekspresji receptora CD29 ($p=0,0345$) oraz receptora CD44

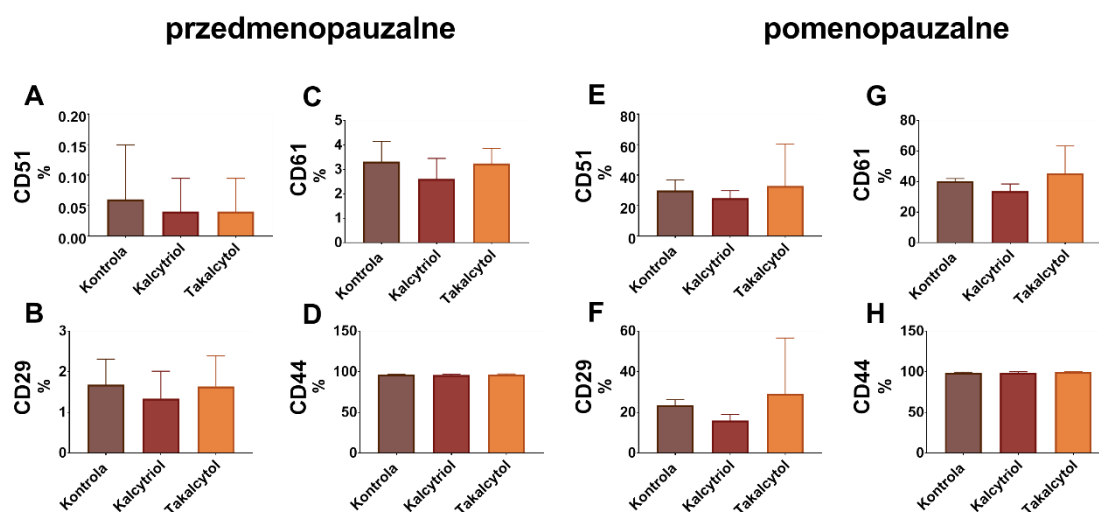
($p=0,0145$) (Rycina 21F i H). W przypadku receptorów CD51 i CD61, analiza nie wykazała istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami (Rycina 21E i G).



Rycina 21. Ocena poziomu receptorów dla OPN w komórkach pochodzących z krwi myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z OPN ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, $CD3^+CD4^+$). Analiza przeprowadzona została na frakcji mononuklearnej krwi obwodowej. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. $N=5-10$. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p<0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

8.4.5 Poziom ekspresji receptorów dla osteopontyny w komórkach pochodzących z węzłów chłonnych dla modelu nowotworowego 4T1

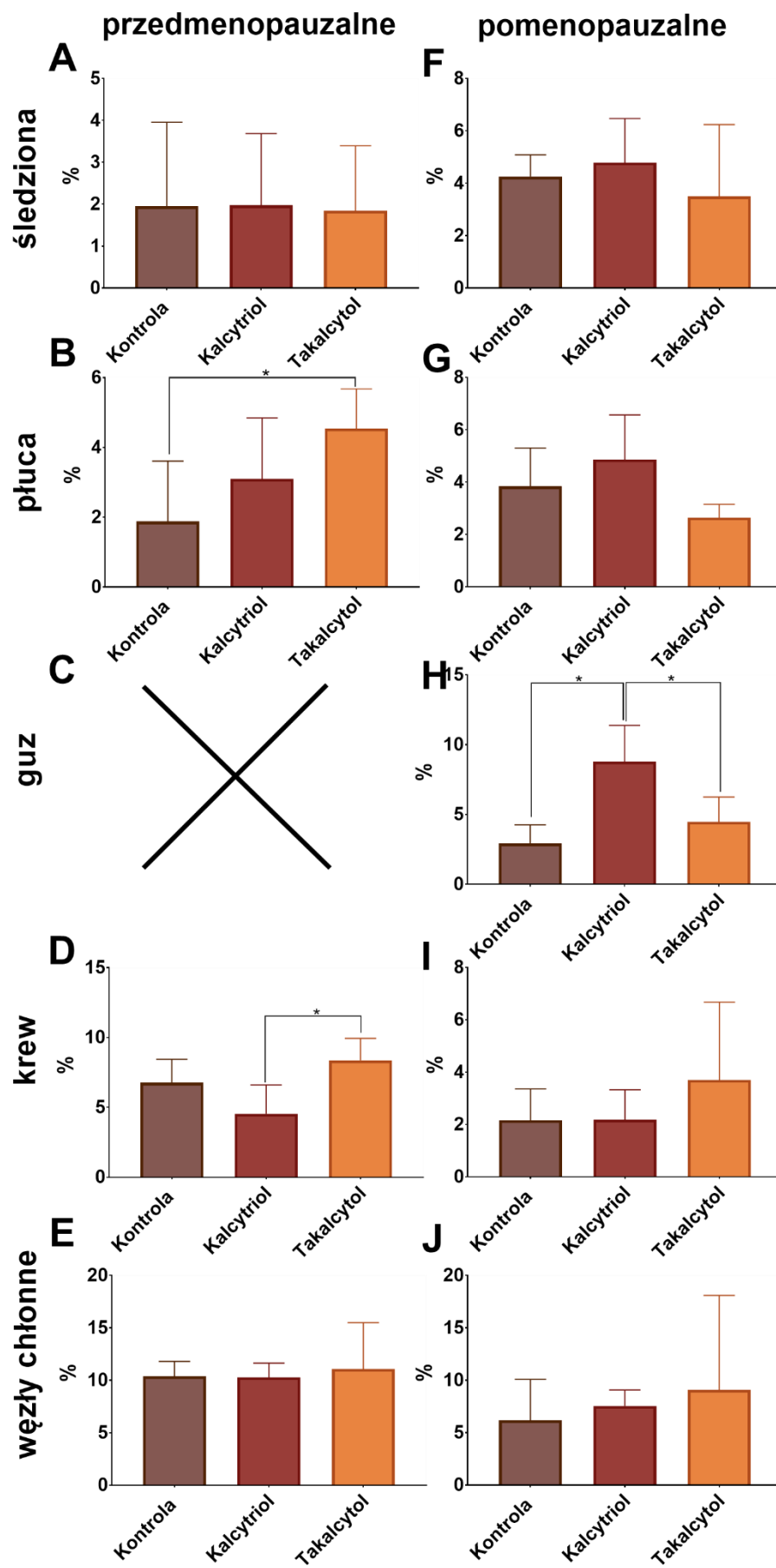
Analiza przeprowadzona na komórkach pochodzących z węzłów chłonnych myszy obarczonych rakiem 4T1, nie wykazała znaczących zmian w ekspresji receptorów dla OPN – CD51, CD29, CD61 i CD44 na powierzchni tych komórek (Rycina 22).



Rycina 22. Ocena poziomu receptorów dla OPN w komórkach pochodzących z węzłów chłonnych u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z OPN ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3⁺CD4⁺). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których

8.4.6 Wpływ kalcytriolu i takalcytolu na odsetek komórek IL-17⁺ pochodzących z śledziony, guza, płuc, krwi i węzłów chłonnych

Analiza cytometryczna przeprowadzona na komórkach pochodzących od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 wykazała znaczący wzrost odsetka komórek IL-17⁺ w grupie traktowanej takalcytolem w modelu przedmenopauzalnym w płucach oraz w grupie traktowanej kalcytriolem w modelu pomenopauzalnym w komórkach guza w porównaniu do grupy kontrolnej. W śledzionie, krwi oraz węzłach chłonnych modelu przed- i pomenopauzalnego oraz płucach w modelu pomenopauzalnym nie zaobserwowano znaczących różnic między grupami eksperymentalnymi (Rycina 23). Odsetek komórek IL-17⁺ z guza dla modelu przedmenopauzalnego 4T1 był niemożliwy do określenia, z powodu braku populacji CD3⁺CD4⁺ po 4-godzinnej stymulacji PMA, jonomycyną i brefeldyną.



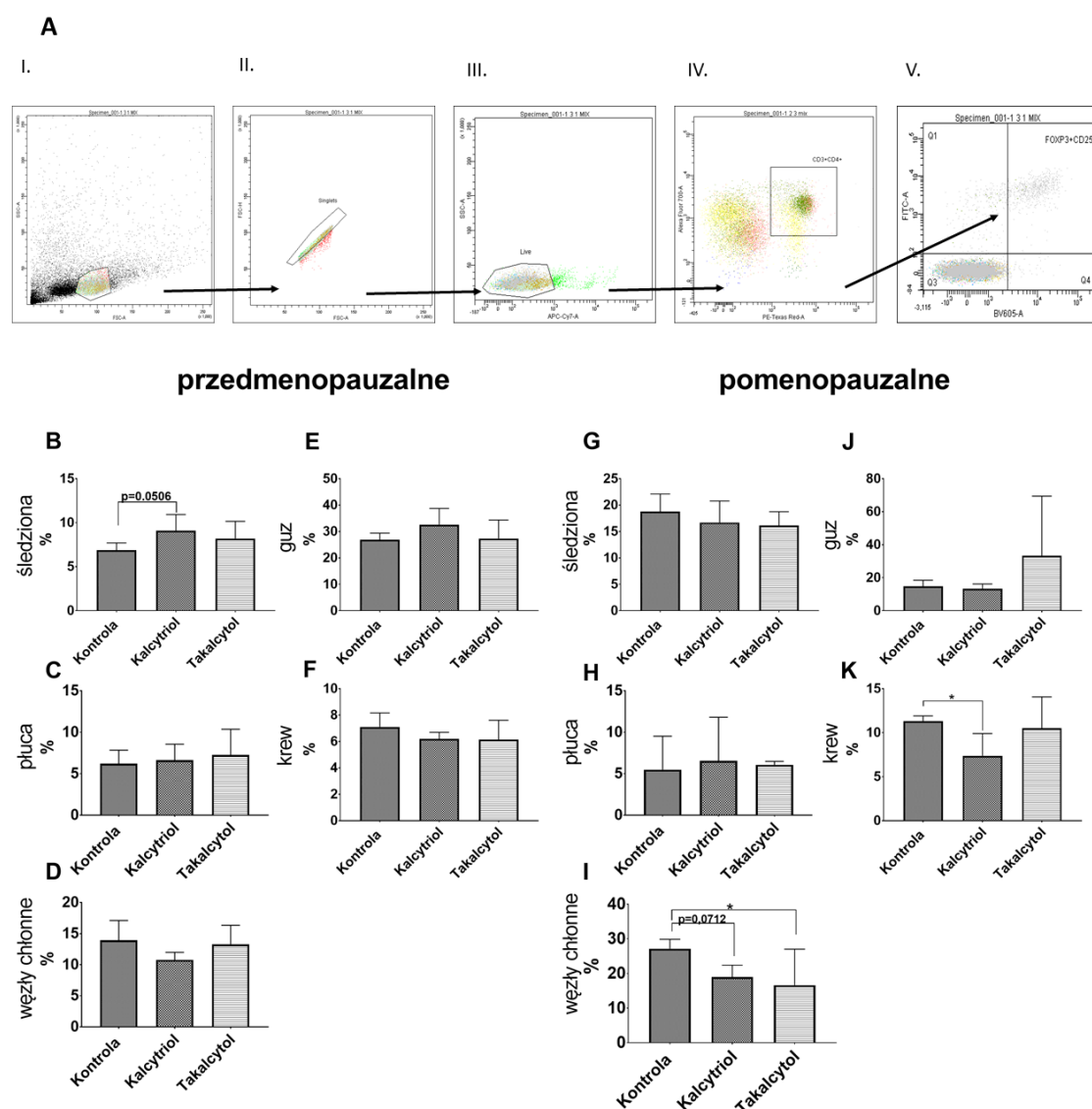
Rycina 23. Ocena odsetka komórek IL-17⁺ pochodzących z komórek (A i F) śledziony, (B i G) płuc, (C i H) guza, (D i I) krwi i (E i J) węzłów chłonnych poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA, jonomycyną i brefeldyną, w modelu przed- i pomenopauzalnym u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Analizie cytometrycznej poddano komórki pozytywne pod względem IL-17 spośród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3⁺CD4⁺). Oznaczenia dotyczące krwi zostały przeprowadzone na frakcji mononuklearnej (PBMC). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których *p<0,05 w porównaniu do grupy kontrolnej.

Oznaczenie odsetka komórek IL-17⁺ pochodzących od myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego 67NR przeprowadzono na komórkach wyizolowanych ze śledziony, płuc i guza. Analiza nie wykazała istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi (Rycina S - 9).

8.5 Ocena fenotypowa limfocytów T regulatorowych wobec działania kalcytriolu i takalcytolu

Celem określenia zdolności limfocytów T regulatorowych (Foxp3⁺CD25⁺) do infiltrowania narządów i tkanek takich jak śledziona, płuca, węzły chłonne, guz i krew, wyizolowane z nich komórki wyznakowano z użyciem przeciwciała anty-CD25 i przeanalizowano metodą cytometrii przepływowej. Zgodnie z modyfikacją genetyczną myszy opisaną w podrozdziale 5.2, komórki z ekspresją białka Foxp3 wykazywały ekspresję białka zielonej fluorescencji, umożliwiając określenie poziomu tego białka bez potrzeby jego dodatkowego znakowania. Rycina 24A przedstawia schemat analizy cytometrycznej i bramkowania komórek celem wyodrębnienia badanej populacji. Analizie poddano komórki pochodzące z wyżej wymienionych tkanek pochodzących od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 oraz komórki ze śledziony, płuc i guza od myszy obarczonych rakiem 67NR w modelach przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym.

Znaczący spadek odsetka komórek Foxp3⁺CD25⁺ względem grupy kontrolnej wykazano we krwi na skutek działania kalcytriolu oraz w węzłach chłonnych wskutek traktowania myszy takalcytolem u myszy z modelu pomenopauzalnego (Rycina 24**Błąd!**
Nie można odnaleźć źródła odwołania.).



Rycina 24. Analiza odsetka komórek stanowiących frakcję limfocytów T regulatorowych (Foxp3⁺CD25⁺) w śledzionie (B i G), płucach (C i H), węzłach chłonnych (D i I), guzie (E i J) oraz krwi (F i K) pochodzących od myszy obarczonych guzami 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Schemat bramkowania komórek w analizie cytometrycznej (A) przedstawia wyodrębnienie komórek frakcji limfocytarnej (I, oś x FSC-A, oś Y SSC-A), oddzielenie pojedynczych komórek od agregatów komórkowych (II, oś x FSC-A, oś Y SSC-H), następnie komórek żywych (III, oś x APC-Cy7-A, oś Y SSC-A), wyodrębnienie frakcji komórek CD3⁺CD4⁺ (IV, oś x Pe-TexasRed-A, oś Y AlexaFluor700-A), wśród których pozytywna, podwójna selekcja pod względem markera CD25 oraz Foxp3 (V, oś x BV605-A, oś Y FITC-A) pozwoliła na identyfikację komórek T regulatorowych. Oznaczenia dotyczące krwi zostały przeprowadzone na frakcji mononuklearnej (PBMC). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą

testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

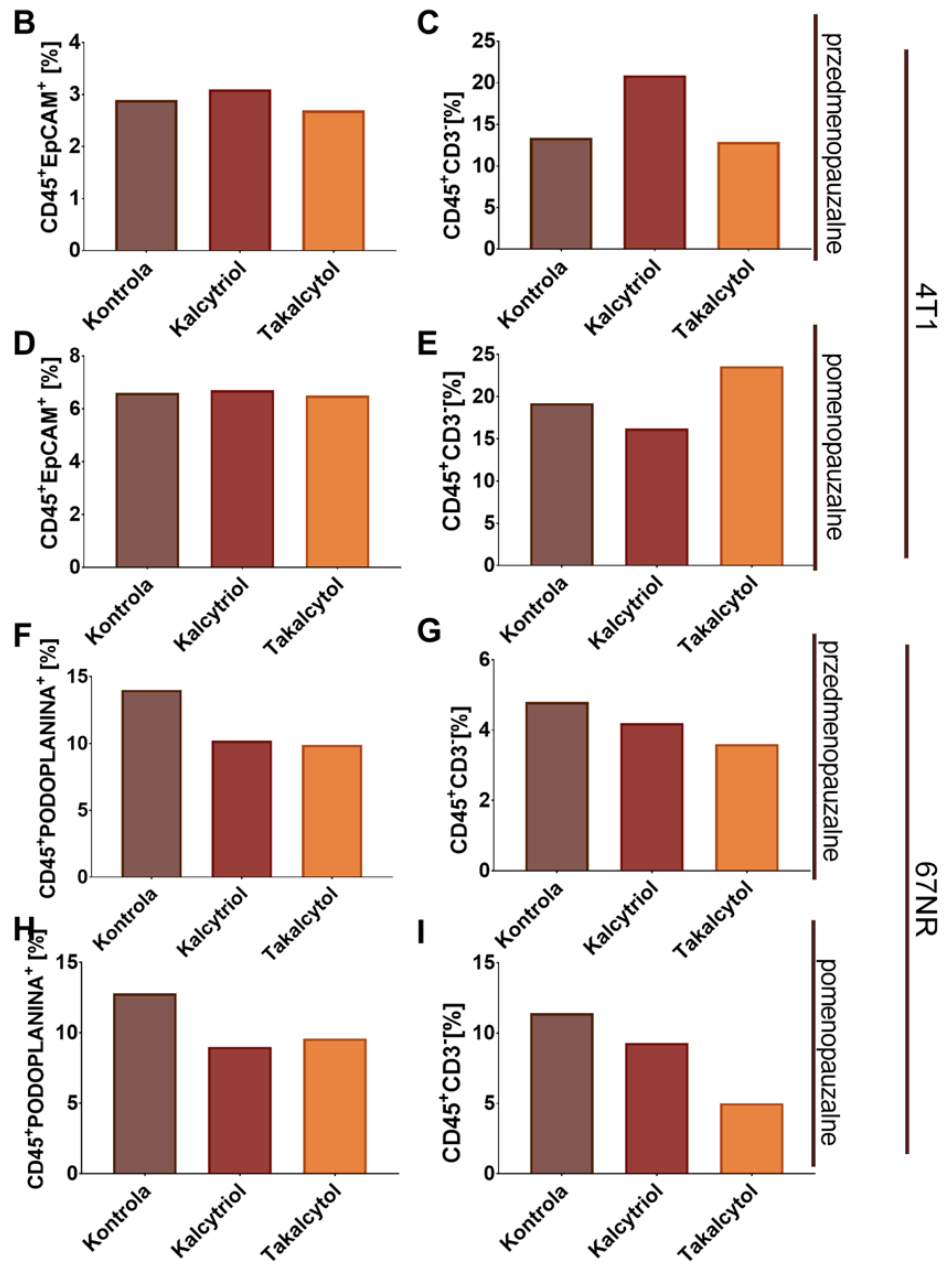
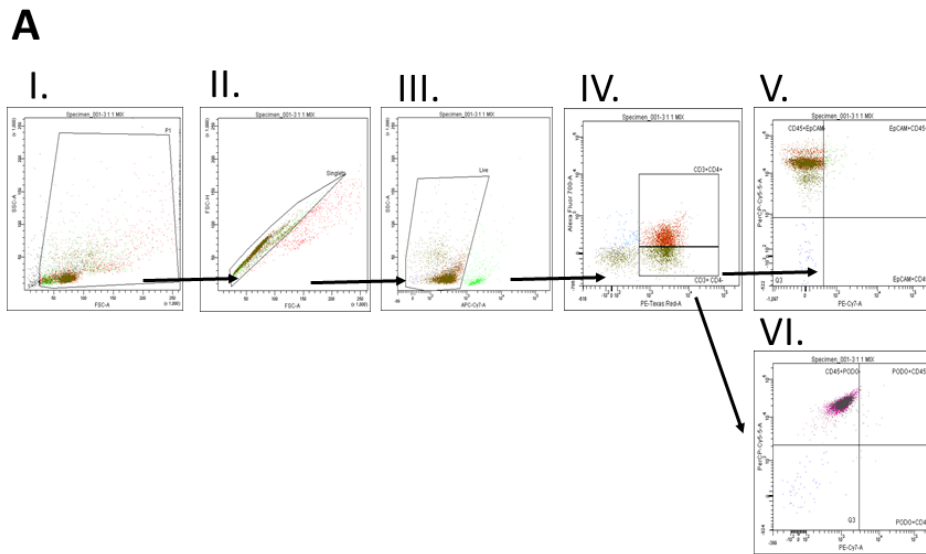
Odsetek frakcji komórek T regulatorowych w modelu przed- i pomenopauzalnym u myszy obarczonych guzem 67NR nie różnił się istotnie między grupą kontrolną a grupami traktowanymi kalcytriolem i takalcytolem (Rycina S - 2A-F).

8.6 Ocena czystości izolacji frakcji komórkowej CD4⁺

Analizy ekspresji genów i białek opisane w kolejnych podrozdziałach przeprowadzano na komórkach CD4⁺ izolowanych magnetycznie na zasadzie selekcji pozytywnej. Po każdym niezależnym eksperymencie, którego efektem było wyizolowanie frakcji komórek T pomocniczych, wykonywano oznaczenie czystości uzyskanej frakcji komórek w celu sprawdzenia, czy podczas separacji magnetycznej, nie doszło do przedostania się komórek pochodzenia nabłonkowo – nowotworowego (EpCAM⁺ lub podoplanina) czy immunologicznego innego niż limfocyty T (CD45⁺CD3⁻), a jeśli tak, to w jakiej ilości. Ocenę czystości wyizolowanego preparatu oznaczano w komórkach pochodzących ze śledzion myszy, w obu badanych modelach wiekowych i nowotworowych. Strategia bramkowania komórek w analizie cytometrycznej polegała na oddzieleniu zlepow komórkowych od pojedynczych komórek, następnie analizowano pojedyncze, żywe komórki, z których wyodrębniono populację komórek CD3⁺CD4⁺. We frakcji komórek T pomocniczych oznaczano markery EpCAM lub podoplaninę i CD45, identyfikując obecność poszczególnych grup komórek (Rycina 25A).

Analiza cytometryczna wykazała, że zanieczyszczenie komórkami pochodzenia nabłonkowo-nowotworowego próbki pochodzącej od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 dla grupy kontrolnej, traktowanej kalcytriolem i takalcytolem wynosiło kolejno, średnio 2,9%, 3,1%, 2,7% dla modelu przedmenopauzalnego (Rycina 25B) oraz 6,6%, 6,7%, 6,5% dla modelu pomenopauzalnego (Rycina 25D). Ten sam parametr badany na komórkach pochodzących od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR wykazał, że poziom zanieczyszczenia preparatu komórkami pochodzenia nabłonkowo-nowotworowego w grupie kontrolnej, kalcytriolowej i takalcytolowej wyniósł kolejno, średnio 14%, 10,2%, 9,9% u myszy młodych (Rycina 25F) oraz 12,8%, 9%, 9,6% w modelu pomenopauzalnym (Rycina 25H).

Celem identyfikacji w separowanej próbce odsetka komórek pochodzenia immunologicznego innego niż limfocyty Th, oznaczono komórki poddane pozytywnej, magnetycznej separacji, spośród których badane komórki stanowiły frakcję komórek CD45⁺CD3⁻. Analiza cytometryczna dowiodła, że wspomniane komórki, CD45⁺CD3⁻ w modelu nowotworu 4T1 dla grup eksperymentalnych – kontrolnej, traktowanej kalcytriolem i takalcytolem stanowiły kolejno, średnio 13,4%, 20,9% i 12,9% u myszy młodych (Rycina 25C) oraz 19,2%, 16,2% i 23,6% u myszy w modelu pomenopauzalnym (Rycina 25E). Odsetek badanej frakcji komórkowej w mysim modelu raka 67NR, w grupie kontrolnej, leczonej kalcytriolem i takalcytolem wyniósł kolejno średnio 4,8%, 4,2% i 3,6% w modelu przedmenopauzalnym oraz 11,4%, 9,3% i 5% u myszy w modelu pomenopauzalnym.



Rycina 25. Analiza czystości izolacji magnetycznej komórek CD4⁺. Przeanalizowane zostały komórki poddane pozytywnej selekcji magnetycznej, spośród których oceniano poziom niepożądanych komórek (B i D) EpCAM⁺/ (F i H) PODOPLANINA⁺, (C, E, G, I) CD45⁺CD3⁻. Komórki w trakcie analizy cytometrycznej poddano bramkowaniu (A), gdzie wyodrębniono komórki frakcji limfocytarnej (I, oś x FSC-A, oś Y SSC-A), oddzielono pojedyncze komórki od agregatów komórkowych (II, oś x FSC-A, oś Y SSC-H), następnie komórki żywe (III, oś x APC-Cy7-A, oś Y SSC-A), wyodrębniono frakcję komórek CD3⁺CD4⁺ (IV, oś x Pe-TexasRed-A, oś Y AlexaFluor700-A), wśród których analizowano komórki CD45⁺EpCAM⁺ (V, oś x PeCy7-A, oś Y PerCP-Cy5.5-A) lub CD45⁺PODOPLANINA⁺ (V, oś x PeCy7-A, oś Y PerCP-Cy5.5-A). Wykresy przedstawiają reprezentatywne wyniki pochodzące z separacji komórek ze śledziony myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego obarczonych guzami 4T1 i 67NR.

8.7 Badanie wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję genów kluczowych dla różnicowania limfocytów T metodą real-time PCR

Celem określenia wpływu kalcytriolu i takalcytolu na poziom wybranych genów, kluczowych w procesie regulacji komórek T, przeprowadzono analizę real-time PCR na separowanych komórkach CD4⁺ pochodzenia śledzionowego, które poddano 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną. Analizie poddane zostały komórki pochodzące od myszy obarczonych guzami 4T1 i 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym (Rycina 26).

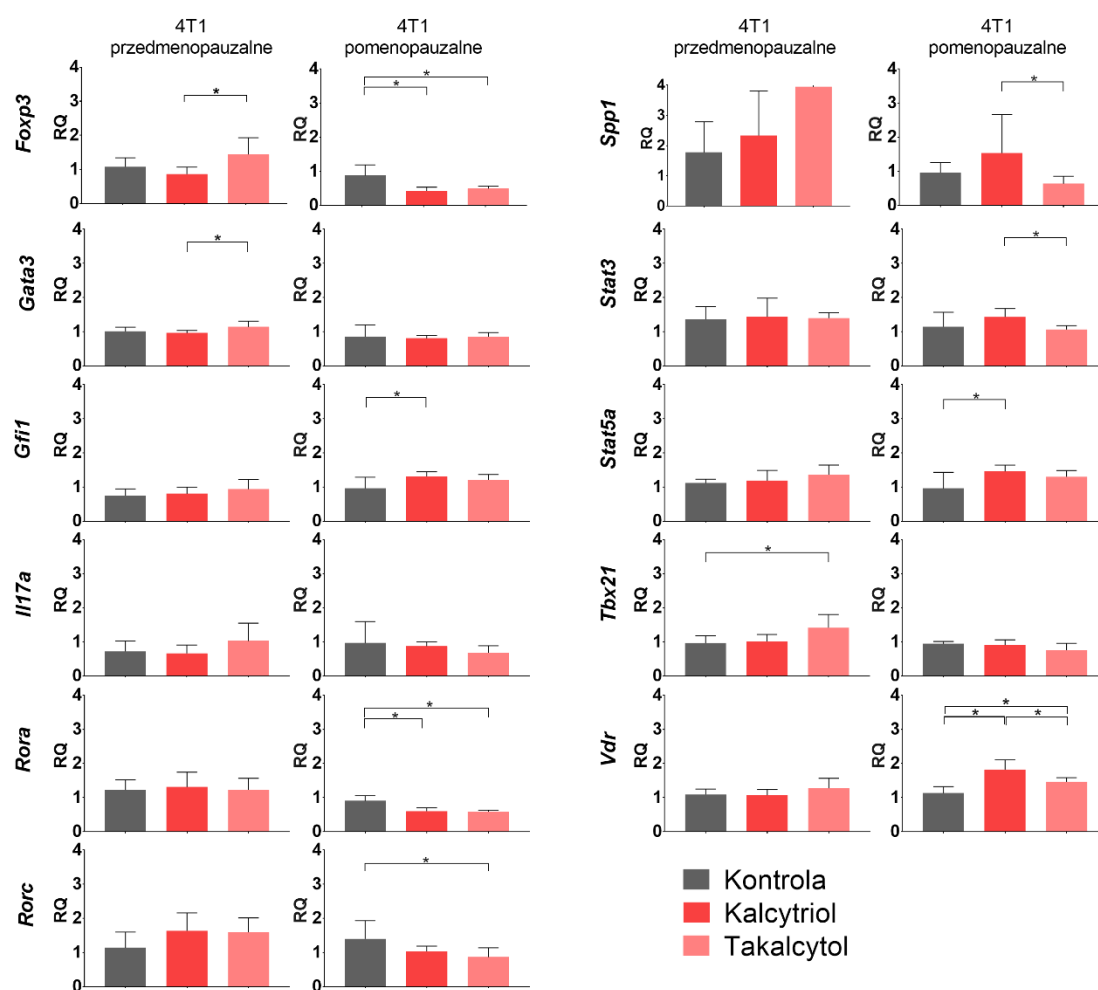
Analiza real-time PCR w modelu przedmenopauzalnym w grupie myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 wykazała znaczące podwyższenie ekspresji genu *Tbx21* w grupie traktowanej takalcytolem ($p=0,0126$) względem grupy kontrolnej. W przypadku genów *Rora*, *Gfi1*, *Rorc*, *Spp1*, *Stat3*, *Stat5a*, *Foxp3*, *Gata3*, *Il17a* oraz *Vdr* nie zaobserwowano różnic między grupami (Rycina 26).

Dla tego samego modelu, lecz myszy reprezentujących grupę pomenopauzalną wykazano istotne statystycznie obniżenie ekspresji genów *Foxp3* oraz *Rora* w grupach taktowanych kalcytriolem i takalcytolem (odpowiednio $p=0,0008$ i $p=0,0022$ dla genu *Foxp3*; oraz $p=0,0002$ i $p<0,0001$ dla genu *Rora*) w porównaniu do grupy kontrolnej. Zastosowanie takalcytolu spowodowało istotny spadek ekspresji genu *Rorc* w grupie myszy starych ($p=0,0158$) względem grupy kontrolnej. Kalcytriol podnosił ekspresję genów *Gfi1* oraz *Stat5a* w śledzionowych komórkach CD4⁺ (odpowiednio $p=0,0161$ i $p=0,0117$) w porównaniu do kontroli. Stymulację ekspresji spowodowaną działaniem

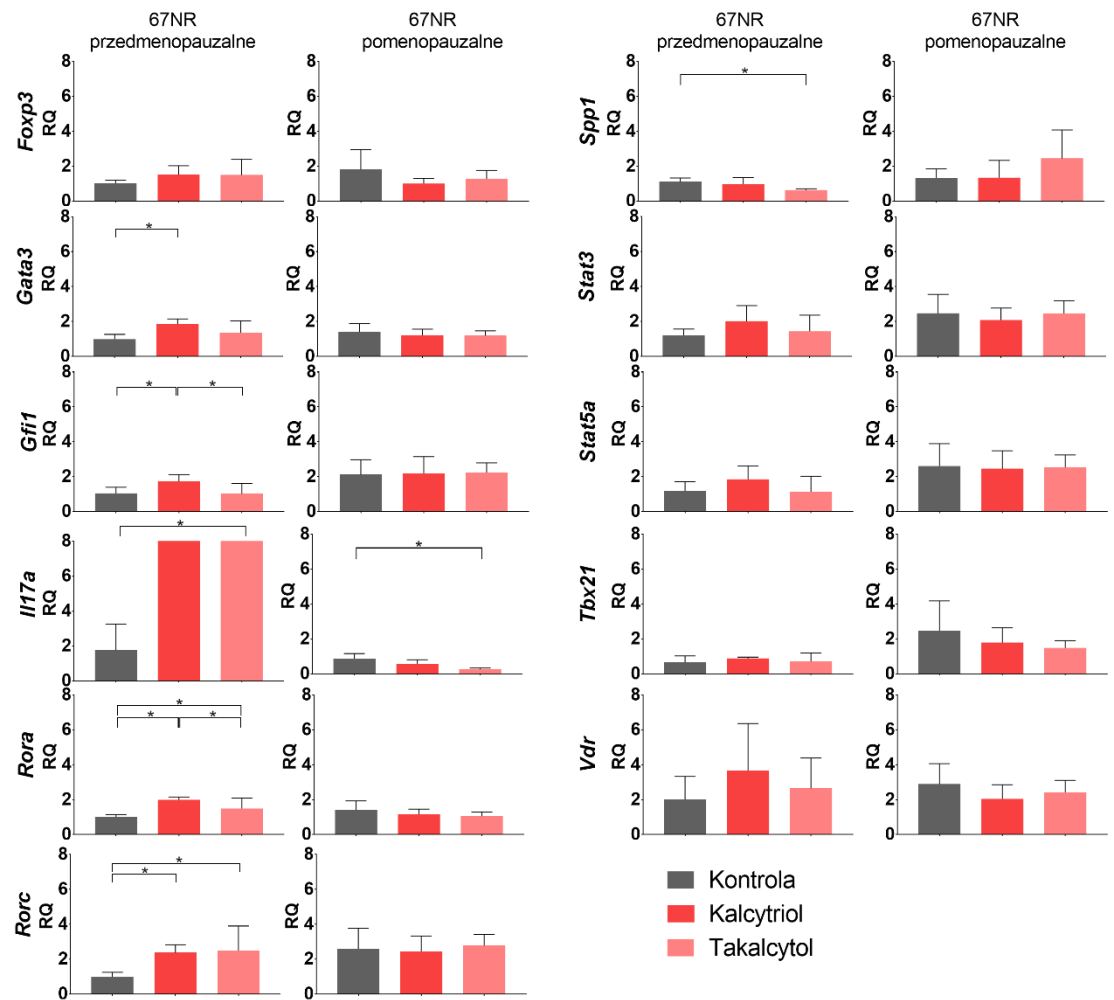
zarówno kalcytriolu i takalcytolu zaobserwowano dla genu *Vdr* (kolejno $p=0,0001$ i $p=0,0230$). Traktowanie myszy kalcytriolem i takalcytolem nie wpłynęło na zmiany w ekspresji genów *Gata3*, *Il17a*, *Spp1*, *Stat3* oraz *Tbx21* (Rycina 26).

Analogiczną analizę przeprowadzono dla tych samych genów dla komórek pochodzących ze śledziony myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR. W modelu przedmenopauzalnym odnotowano istotny wzrost ekspresji genów *Gata3* i *Gfi1* wskutek działania kalcytriolu (kolejno $p=0,0055$ i $p=0,0217$). Wyraźny i statystycznie istotny wzrost ekspresji w odpowiedzi na takalcytol wykazano dla genu *Il17a* ($p=0,0473$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Stymulujący ekspresję wpływ kalcytriolu i takalcytolu zaobserwowano w przypadku genów *Rora* i *Rorc* (odpowiednio $p=0,0003$ i $p=0,0264$ dla genu *Rora* oraz $p=0,0204$ i $p=0,0137$ dla genu *Rorc*). Obniżenie ekspresji genu *Spp1* wykazano dla grupy myszy traktowanych takalcytolem ($p=0,0077$) względem kontroli. Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami eksperymentalnymi dla genów *Foxp3*, *Stat3*, *Stat5a*, *Vdr*, *Tbx21* (Rycina 27).

W mysim pomenopauzalnym modelu raka 67NR, badanie ekspresji genów pokazało, iż takalcytol w istotny sposób obniża ekspresję genu *Il17a* ($p=0,0020$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano wpływu zastosowanego traktowania na ekspresję genów *Foxp3*, *Gata3*, *Gfi1*, *Rora*, *Stat5a*, *Tbx21*, *Spp1*, *Stat3*, *Vdr* oraz *Rorc* (Rycina 27).



Rycina 26. Analiza real-time PCR wybranych genów w komórkach CD4⁺, poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną, pochodzących ze śledzion myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizę przeprowadzono na materiale z dwóch niezależnych eksperymentów dla każdego modelu nowotworowego. Analizę wykonano z zastosowaniem metody $\Delta\Delta C_t$ jako kalibrator stosując próbkę z grupy kontrolnej. Uzyskane wartości stanowią krotność zmian ekspresji (RQ). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-8. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a lub testu Kruskal-Wallis'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina 27. Analiza real-time PCR wybranych genów w komórkach CD4⁺, poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną, pochodzących ze śledzion myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizę przeprowadzono na materiale z dwóch niezależnych eksperymentów dla każdego modelu nowotworowego. Analizę wykonano z zastosowaniem metody $\Delta\Delta C_t$ jako kalibrator stosując próbkę z grupy kontrolnej. Uzyskane wartości stanowią krotność zmian ekspresji (RQ). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-8. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a lub testu Kruskal-Wallis'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p<0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

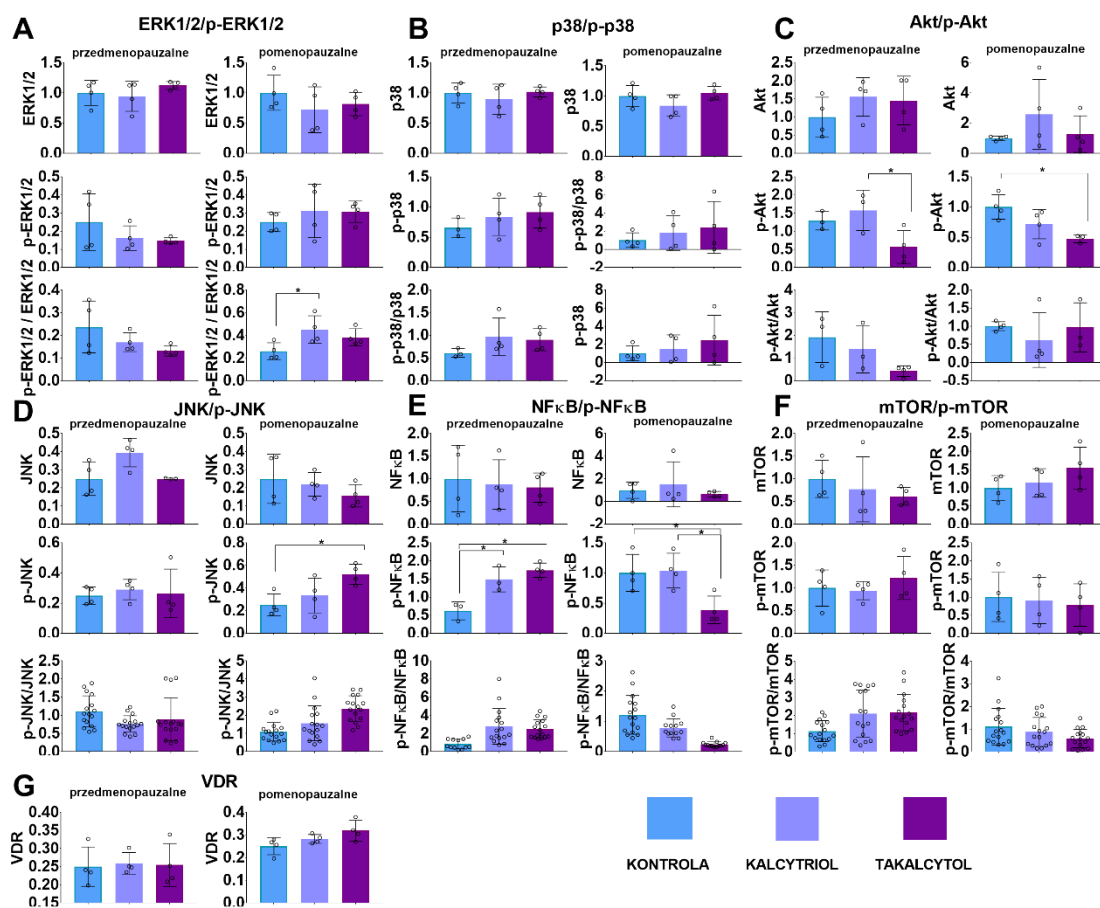
8.8 Badanie wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję białek szlaków sygnałowych ważnych dla różnicowania komórek Th17 metodą Jess Simple Western

W komórkach CD4⁺ pochodzących ze śledzion myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym, poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną, zbadano poziom wybranych białek, które według piśmiennictwa odpowiadają za regulację procesu różnicowania komórek Th17: ERK1/2, p38, Akt, JNK, NFκB, mTOR oraz ich fosforylowane formy. Dodatkowo, w tych samych komórkach oznaczeniu poddano poziom receptora dla witaminy D – VDR. Ponadto, zbadano poziom OPN w całej populacji nieseparowanych komórek pochodzących z mysich guzów. Wykorzystanie metody Jess Simple Western umożliwiło oznaczenie określonych białek w bardzo niewielkiej ilości próbki jaką dysponowano w tym eksperymencie, niemniej jednak niewielka ilość materiału, w przypadku oznaczenia białek JNK, NFκB, mTOR (dla 4T1) i Akt, JNK, NFκB, mTOR (dla 67NR) oraz ich fosforylowanych form uniemożliwiła oznaczenie ich obu form w komórkach pochodzących od tej samej myszy. Wobec tego, zdecydowano się dokonać oznaczenia tych białek (formy niefosforylowanej i fosforylowanej) w komórkach pochodzących od myszy z dwóch, niezależnych eksperymentów. W związku z tym, w analizie statystycznej stosunku formy fosforylowanej do niefosforylowanej białek JNK, NFκB, mTOR (dla 4T1) i Akt, JNK, NFκB, mTOR (dla 67NR) zastosowano wyniki poddane permutacji i z tego powodu nie wykonywano testów statystycznych umożliwiających określenie istotności statystycznej, a omawiane wyniki dotyczą wyłącznie tendencji.

W przypadku zastosowania kalcytriolu i takalcytolu w modelu przedmenopauzalnym odnotowano tendencję do spadku aktywności białka JNK (Rycina 28D), z kolei dla białek NFκB, mTOR (Rycina 28E i F) efekt był odwrotny - stwierdzono tendencję do stymulowania aktywności tych białek. Traktowanie kalcytriolem i takalcytolem nie wpłynęło na zmiany w ekspresji białka VDR (Rycina 28G) oraz aktywacji białek ERK1/2, Akt, p38 (Rycina 28A, B, C).

W tym samym modelu nowotworowym, lecz u myszy z modelu pomenopauzalnego wykazano aktywację białka ERK1/2 (Rycina 28A) po zastosowaniu kalcytriolu. Tendencję do spadku aktywności po traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem

wykazano dla białek NFκB, mTOR i wzrost aktywności dla białka JNK (Rycina 28E, F, D).

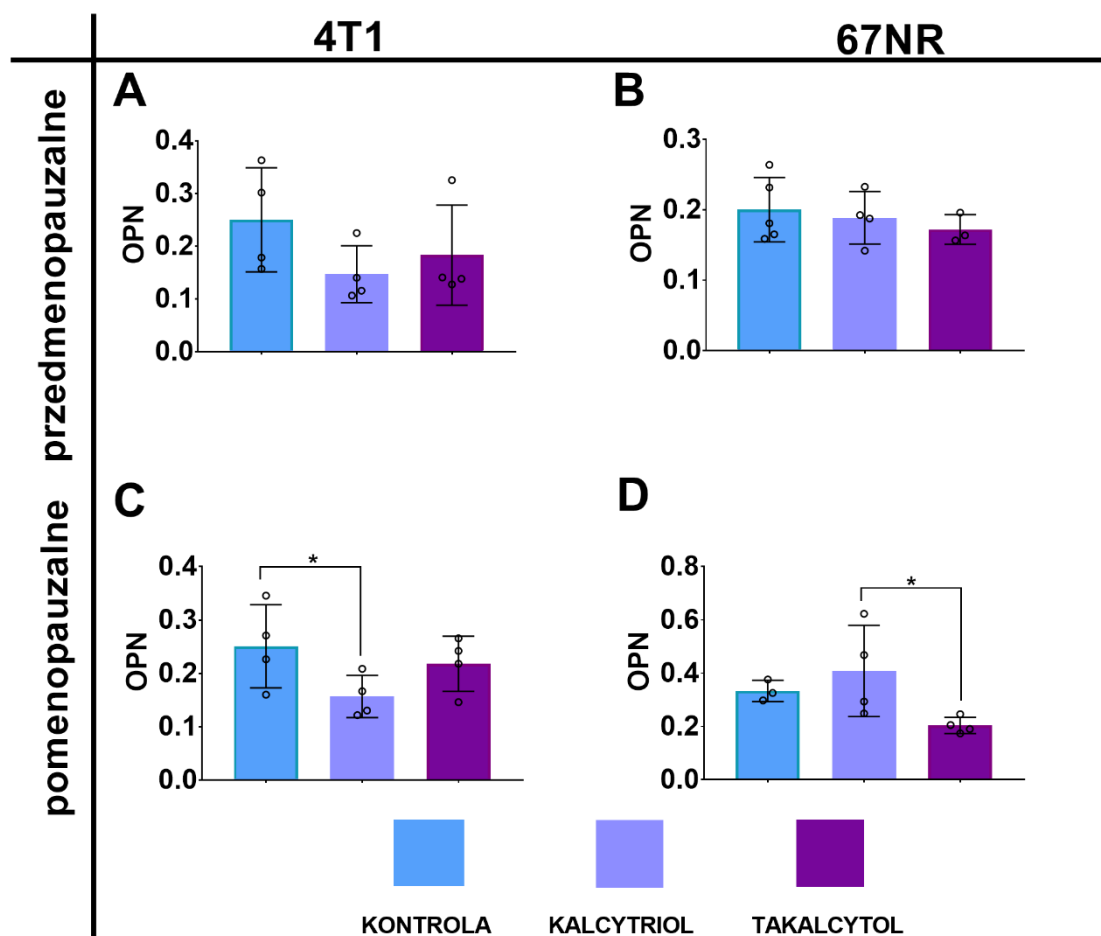


Rycina 28. Analiza Jess Simple Western wybranych białek, kluczowych w procesie różnicowania limfocytów Th17 w komórkach CD4⁺ pochodzących ze śledziony u myszy z modelu 4T1, przed- i pomenopauzalnym. Białka poddane analizie stanowiły (A) ERK1/2/p-ERK1/2, (B) p38/p-p38, (C) Akt/p-Akt, (D) JNK/p-JNK, (E) NFκB/p-NFκB, (F) mTOR/p-mTOR, (G) VDR. Komórki CD4⁺ wyizolowane ze śledziony poddano 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną. Wyniki normalizowano względem ekspresji białka całkowitego i grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizie poddano stosunek poziomu białka fosforylowanego do niefosforylowanego. N=4-5. Analizę białek JNK, p-JNK, NFκB, p-NFκB, mTOR, p-mTOR przeprowadzono na dwóch niezależnych eksperymentach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których *p<0,05 w porównaniu do grupy kontrolnej.

W przypadku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przedmenopauzalnym nie odnotowano istotnych zmian w aktywacji białek ERK1/2 i p38 (Rycina S - 8A, B). Tendencję w kierunku aktywacji białek JNK, mTOR i Akt (Rycina S - 8D, F, C) zaobserwowano dla grupy, w której myszy traktowane były takalcytolem. Z kolei, zastosowanie obu analogów powodowało aktywację białka NFκB (Rycina S - 8E). Istotny wzrost ekspresji VDR względem grupy kontrolnej dowiedziono w grupie traktowanej takalcytolem (Rycina S - 8G).

U myszy obarczonych guzem 67NR w modelu pomenopauzalnym traktowanie myszy zarówno kalcytriolem i takalcytolem spowodowało tendencję do spadku stymulacji białek JNK, mTOR, Akt i NFκB w modelu 67NR (Rycina S - 8D, F, C, E). Traktowanie myszy kalcytriolem i takalcytolem nie wpłynęło na zmianę aktywności białek p38 i ERK1/2 oraz ekspresji VDR (Rycina S - 8A, B, G, H).

Analiza poziomu OPN w całej populacji komórek pochodzących z guza wykazała obniżenie ekspresji tego białka w grupie traktowanej kalcytriolem w modelu pomenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (Rycina 29C).



Rycina 29. Analiza Jess Simple Western białka OPN w pełnej populacji komórek pochodzących z guza u myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego 4T1 (A i C) i 67NR (B i D). Komórki pochodzące z guza stanowią zawiesinę wszystkich komórek tej tkanki. Wyniki normalizowano względem ekspresji białka całkowitego i grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej $\pm$ błąd standardowy średniej. N=4-5. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

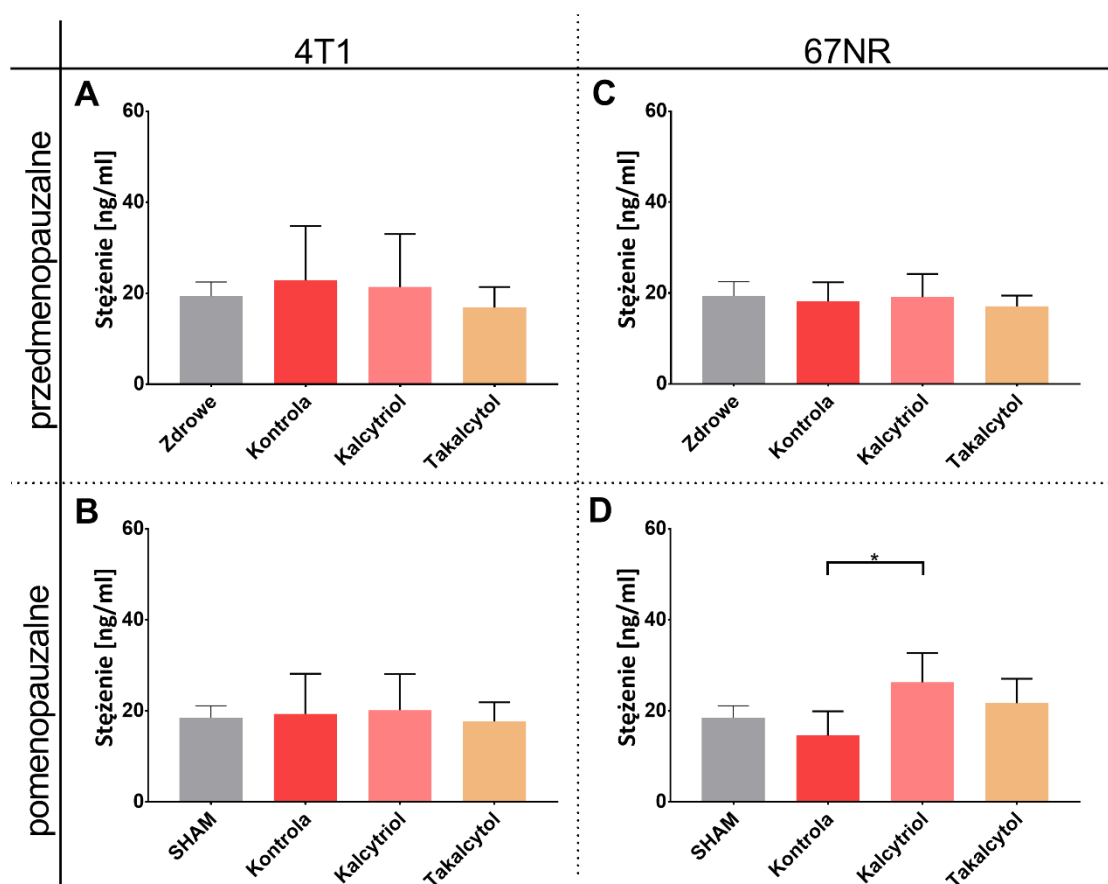
Rycina S - 6

8.9 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom 25(OH)D₃ w mysim osoczu

Analiza osocza pod względem poziomu 25(OH)D₃ uwzględnia grupę myszy zdrowych (model przedmenopauzalny) oraz grupę myszy SHAM (model pomenopauzalny), którym nie wszczepiono nowotworu oraz myszy traktowane kalcytriolem i takalcytolem w grupie wiekowej przedmenopauzalnej i pomenopauzalnej.

Przeprowadzona analiza nie wykazała wpływu traktowania kalcytriolem i takalcytolem na poziom 25(OH)D₃ w osoczu myszy obarczonych guzem 4T1, w obu grupach wiekowych (Rycina 30A-B).

W grupie wiekowej pomenopauzalnej myszy obarczonych guzem 67NR zaobserwowano znaczący wzrost stężenia 25(OH)D₃ u myszy, którym podawany był kalcytriol. Analiza nie wykazała znamiennych różnic pomiędzy grupami u myszy młodych (Rycina 30C-D).



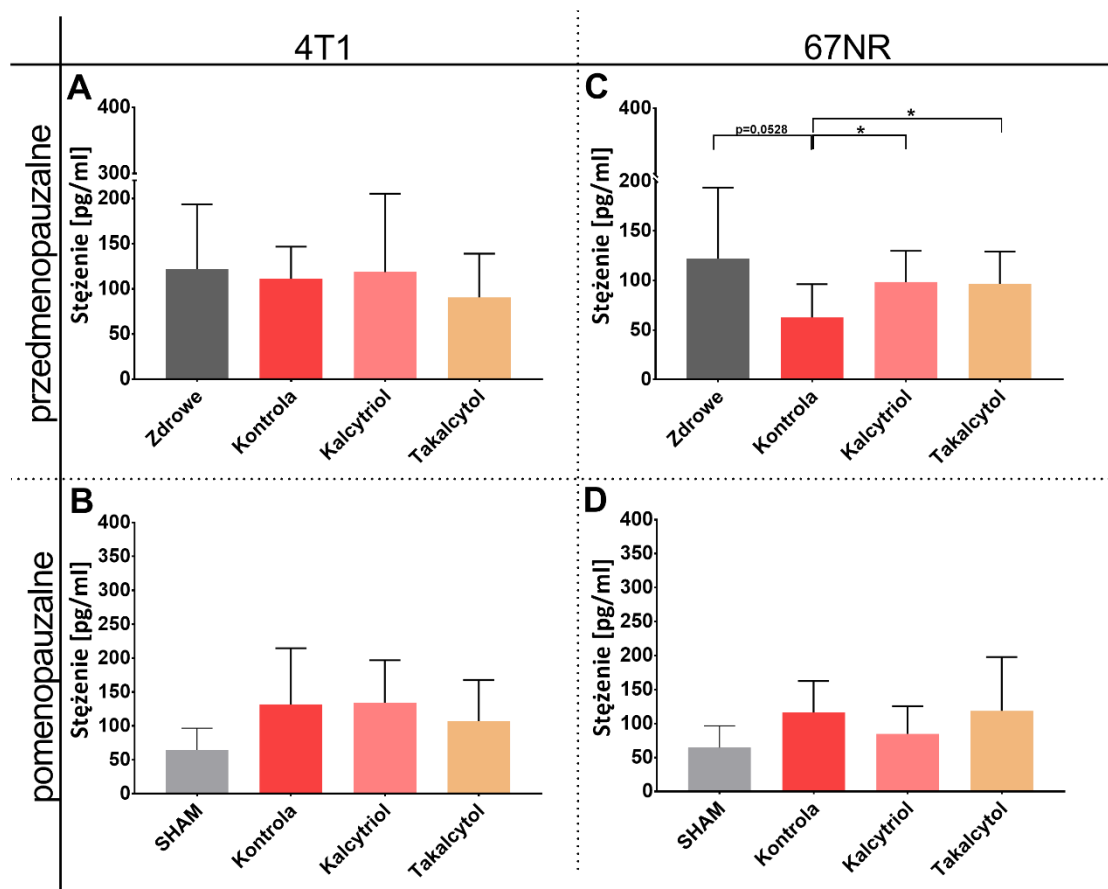
Rycina 30. Analiza stężenia 25(OH)D₃ w osoczu myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (A i B) i 67NR (C i D) w grupie wiekowej przedmenopauzalnej i pomenopauzalnej przy użyciu testu ELISA. Stężenie badanego białka oszacowano w oparciu o krzywą z wykorzystaniem oprogramowania CutveExpert 1.4. Analizę przeprowadzono w dwóch niezależnych eksperymentach dla każdego modelu nowotworowego oraz jednego niezależnego eksperymentu dla myszy zdrowych i SHAM. N=5/1 niezależny eksperyment. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a oraz testu t-Studenta dla pojedynczych porównań grup kontrolnej oraz myszy

zdrowych/SHAM. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

8.10 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom VEGF w mysim osoczu

Stężenie VEGF w osoczu zbadano z użyciem testu ELISA. W modelu przed- i pomenopauzalnym myszy obarczonych guzami 4T1 nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi (Rycina 31A, B).

W wyniku analizy poziomu VEGF w osoczu myszy reprezentujących model przedmenopauzalny raka 67NR, stwierdzono, iż stężenie badanego analitu w grupie myszy zdrowych jest wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, zastosowanie kalcytriolu i takalcytolu powodowało istotne zwiększenie stężenia VEGF względem grupy kontrolnej (Rycina 31C). W modelu pomenopauzalnym nie odnotowano istotnych zmian poziomu VEGF w osoczu myszy (Rycina 31D).



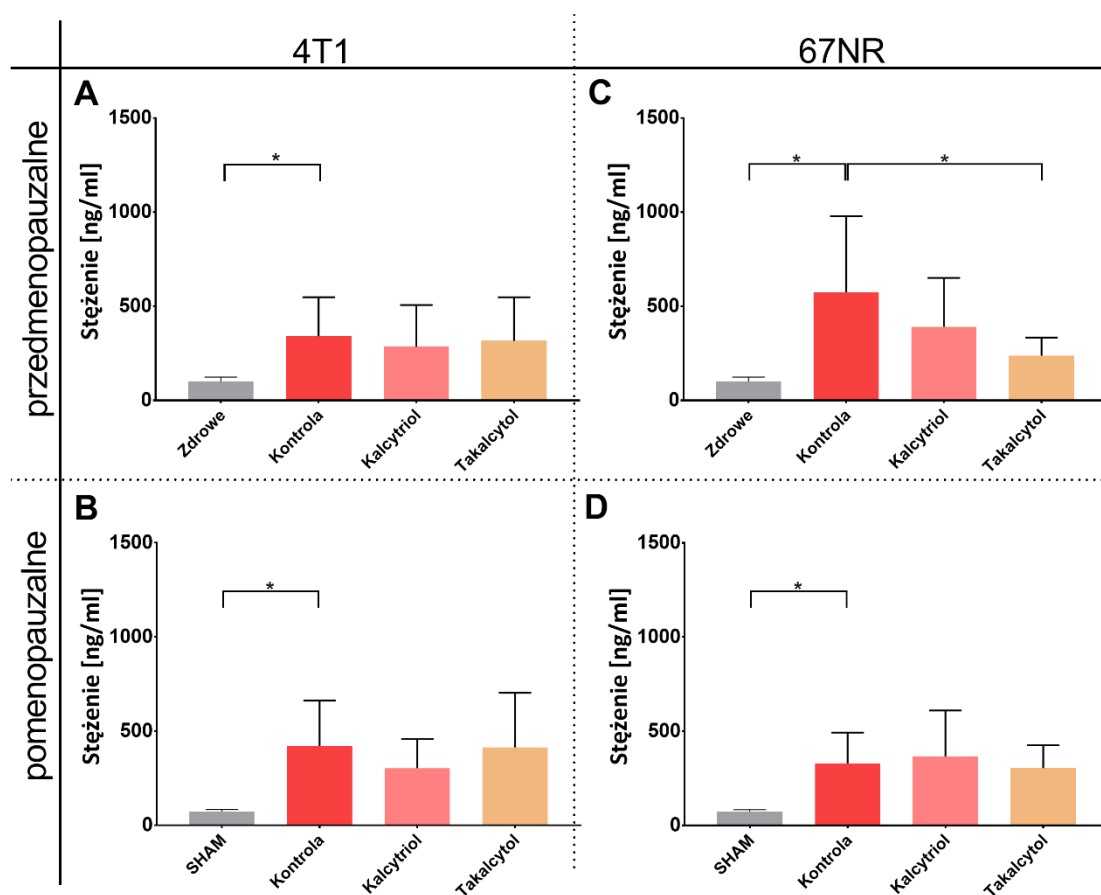
Rycina 31. Analiza stężenia VEGF w osoczu myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (A i B) i 67NR (C i D) w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym przy pomocy testu ELISA. Poziom badanego białka oszacowano w oparciu o krzywą z wykorzystaniem oprogramowania CutveExpert 1.4. Analizę przeprowadzono na dwóch niezależnych eksperymentach dla każdego modelu nowotworowego oraz jednym niezależnym eksperymencie dla myszy zdrowych i SHAM. N=5/1 niezależny eksperyment. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a oraz testu t-Studenta dla pojedynczych porównań grup kontrolnej oraz myszy zdrowych/SHAM. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których *p<0,05 w porównaniu do grupy kontrolnej.

8.11 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom osteopontyny w mysim osoczu

Do oceny poziomu OPN w osoczu myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 lub 67NR w obu modelach wiekowych wykorzystano test ELISA.

Istotnie niższe stężenie OPN w osoczu względem kontroli zauważono w grupie myszy zdrowych i SHAM, bez wszczepionego nowotworu 4T1 zarówno u myszy w modelu przed- jak i pomenopauzalnym (Rycina 32A-B).

Analogiczna obserwacja miała miejsce w przypadku stężenia OPN w osoczu myszy w modelu przed- i pomenopauzalnym raka 67NR, przy czym dodatkowo traktowanie myszy młodych takalcytolem powodowało spadek poziomu OPN w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 32C-D).



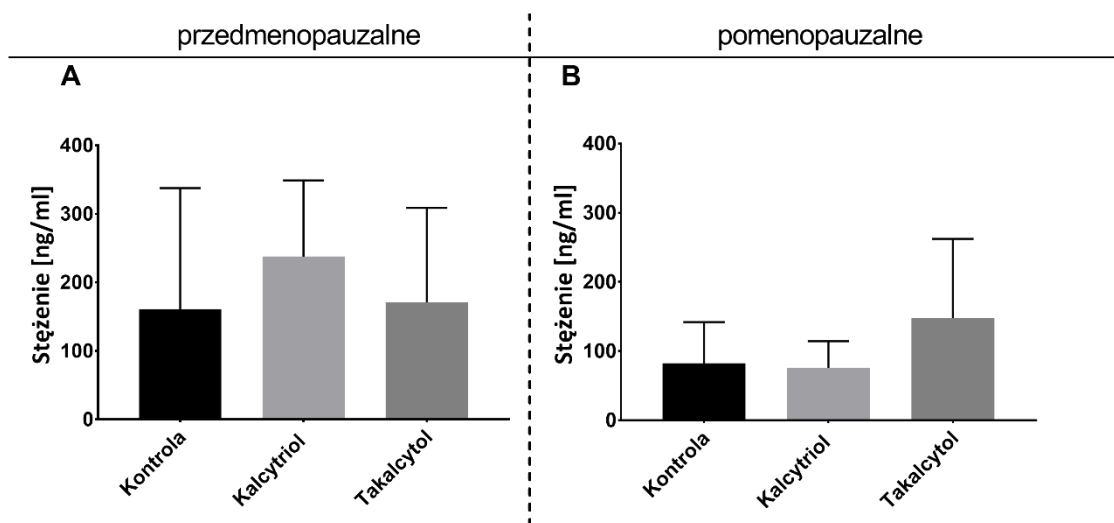
Rycina 32. Analiza poziomu OPN w osoczu myszy obarczonych nowotworem gruczołu sutkowego (A i B) i 67NR (C i D) w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym z wykorzystaniem testu ELISA. Poziom badanego białka oszacowano w oparciu o krzywą z wykorzystaniem oprogramowania CurveExpert 1.4. Analizę przeprowadzono na dwóch niezależnych eksperymentach dla każdego modelu nowotworowego oraz jednym niezależnym

eksperymentcie dla myszy zdrowych i SHAM. N=5/1 niezależny eksperyment. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a oraz testu t-Studenta dla pojedynczych porównań grup kontrolnej oraz myszy zdrowych/SHAM. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $*p<0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

8.12 Analiza wpływu stosowania kalcytriolu i takalcytolu na poziom osteopontyny w supernatantach z nad stymulowanych komórek CD4⁺

Z pochodzących ze śledzion, separowanych komórek CD4⁺, izolowanych od myszy obciążonych guzami 4T1, podanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną zabezpieczano media z nad hodowli komórkowej.

Nie wykazano znaczących różnic w poziomie OPN między grupami eksperymentalnymi, zarówno w modelu przed- jak i pomenopauzalnym (Rycina 33).

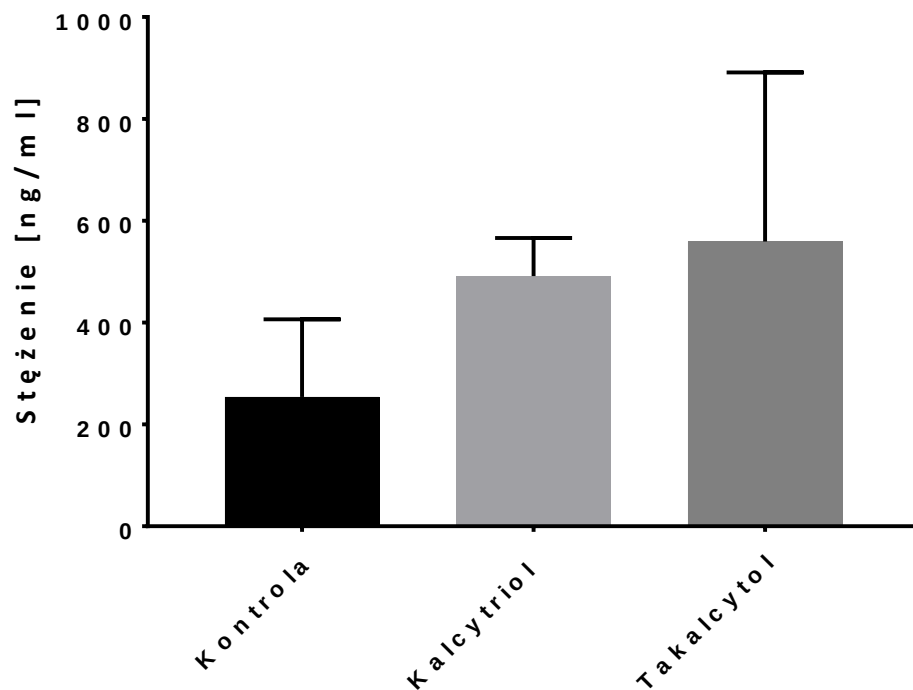


Rycina 33. Analiza stężenia OPN w medium hodowlanym z nad komórek CD4⁺ poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną u myszy reprezentujących model przedmenopauzalny (A) i pomenopauzalny (B) obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 przy użyciu testu ELISA. Poziom badanego analitu oszacowano w oparciu o krzywą z wykorzystaniem oprogramowania CurveExpert 1.4. N=5. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a.

8.13 Analiza wpływu kalcytriolu i takalcytolu na poziom osteopontyny w supernatantach z nad różnicowanych komórek Th17

Wykorzystując test ELISA, oznaczono poziom OPN w nadsączach z hodowli indukowanych *ex vivo* limfocytów Th17 (iTh17) pochodzących od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 z modelu przedmenopauzalnego. Zabezpieczono również supernatanty z nad hodowli limfocytów Th17 pochodzących od myszy z modelu pomenopauzalnego. Analiza cytometryczna, w której przeanalizowano żywotność komórek wskazała na bardzo niski odsetek żywych komórek po różnicowaniu (Rycina S - 7), stąd zdecydowano się zrezygnować z analizy supernatantów pochodzących od myszy z modelu pomenopauzalnego. Wyseparowane magnetycznie komórki CD4⁺ poddane różnicowaniu w kierunku Th17 (proces różnicowania opisany został w podrozdziale 5.4.12), ostatniego dnia różnicowania poddano 4-godzinnej stymulacji z użyciem PMA i jonomycyny, celem pobudzenia komórek do wyrzutu cytokin.

Przeprowadzone oznaczenie wykazało, że poziom OPN nie uległ istotnej zmianie na skutek traktowania myszy kalcytriolem i takalcytolem (Rycina 34).



Rycina 34. Analiza stężenia OPN w supernatantach zbadanych komórek Th17 u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przedmenopauzalnym. Poziom badanego analitu oszacowano w oparciu o krzywą z wykorzystaniem oprogramowania CurveExpert 1.4. N=5. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a.

8.14 Wpływ zablokowania receptorów dla osteopontyny na proces różnicowania komórek Th17 izolowanych od myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 traktowanych kalcytriolem i takalcytolem

Na podstawie wcześniejszych analiz cytometrycznych do dalszych badań wybrano integryny CD51 i CD29 oraz cząsteczkę CD44. Wpływ zablokowania tych receptorów na proces różnicowania się komórek Th17 oraz ekspresję IFN- γ zbadano z zastosowaniem analizy cytometrycznej na komórkach CD4⁺ ze śledziony myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 5.4.12.1. Zróżnicowane komórki analizowano poprzez zabramkowanie populacji limfocytów, następnie oddzielenie

pojedynczych komórek od zlepow komórkowych, wyodrębnienie populacji żywych komórek, a następnie populacji komórek CD3⁺CD4⁺, spośród której analizie poddano komórki IL-17⁺ IFN- γ ⁻ reprezentujące populację Th17 oraz IL-17⁻ IFN- γ ⁺ reprezentujące populację Th1 (Rycina 36A). Do analizy włączono również komórki pochodzące od myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem. Dodatkowo analizie poddano komórki pochodzące ze śledziony, które nie były poddane separacji. Komórki te stymulowano PMA i jonomycyną i analizowano zgodnie z opisem zawartym w podrozdziale 5.4.8, w celu oznaczenia odsetka komórek IL-17⁺. Otrzymany wynik porównano z odsetkiem komórek Th17 po różnicowaniu.

Analiza przeprowadzona na komórkach pochodzących od myszy obarczonych guzem 4T1 w grupie przedmenopauzalnej wykazała, iż odsetek komórek śledzionowych iTh17 (IL17⁺) istotnie wzrasta na skutek indukcji różnicowania Th17 w warunkach *in vitro*: w grupie kontrolnej ośmiokrotnie, traktowanej kalcytriolem siedmiokrotnie i traktowanej takalcytolem czternastokrotnie (kolejno $p=0,0053$, $p=0,0017$, $p=0,0049$) (Rycina 35 B).

Analiza cytometryczna przeprowadzona na komórkach od myszy młodych udowodniła, że różnicowanie komórek Th17, niepoddanych blokowaniu nie różniło się między grupami traktowanymi kalcytriolem i takalcytolem od grupy kontrolnej. Stwierdzono natomiast trzykrotny wzrost odsetka limfocytów Th17 w grupie kontrolnej względem myszy zdrowych (Rycina 36A, B, C).

Zablokowanie receptora CD51 spowodowało trzykrotny spadek różnicowania komórek Th17 w grupie kontrolnej względem kontroli nieblokowanej (Rycina 36B). Przeciwny efekt zaobserwowano po zablokowaniu CD29, gdzie odsetek komórek Th17 wzrósł półtorakrotnie w grupie kontrolnej względem nieblokowanej kontroli (Rycina 36C).

W efekcie zablokowania CD44 nastąpił kolejno dwukrotny i czterokrotny wzrost liczby komórek Th17 w grupach traktowanych kalcytriolem i takalcytolem w stosunku do grupy kontrolnej (Rycina 36A).

Po zablokowaniu receptora CD51, odnotowano istotny wzrost odsetka komórek Th17 w grupie traktowanej kalcytriolem (trzykrotny wzrost) i takalcytolem (dwukrotny wzrost) (Rycina 36B).

Zablokowanie receptora CD29 prowadziło do wzrostu odsetka komórek Th17 w grupie kontrolnej względem myszy zdrowych (czterokrotny wzrost). Z kolei

w grupach traktowanych kalcytriolem i takalcytolem zaobserwowano dwukrotne obniżenie owego odsetka w stosunku do grupy kontrolnej (Rycina 36C).

Analiza odsetka populacji komórek IL-17-IFN- γ^+ pozwoliła ocenić, jak zablokowanie receptorów dla OPN w warunkach charakterystycznych dla różnicowania limfocytów Th17, wpłynie na współróżnicowanie komórek Th1.

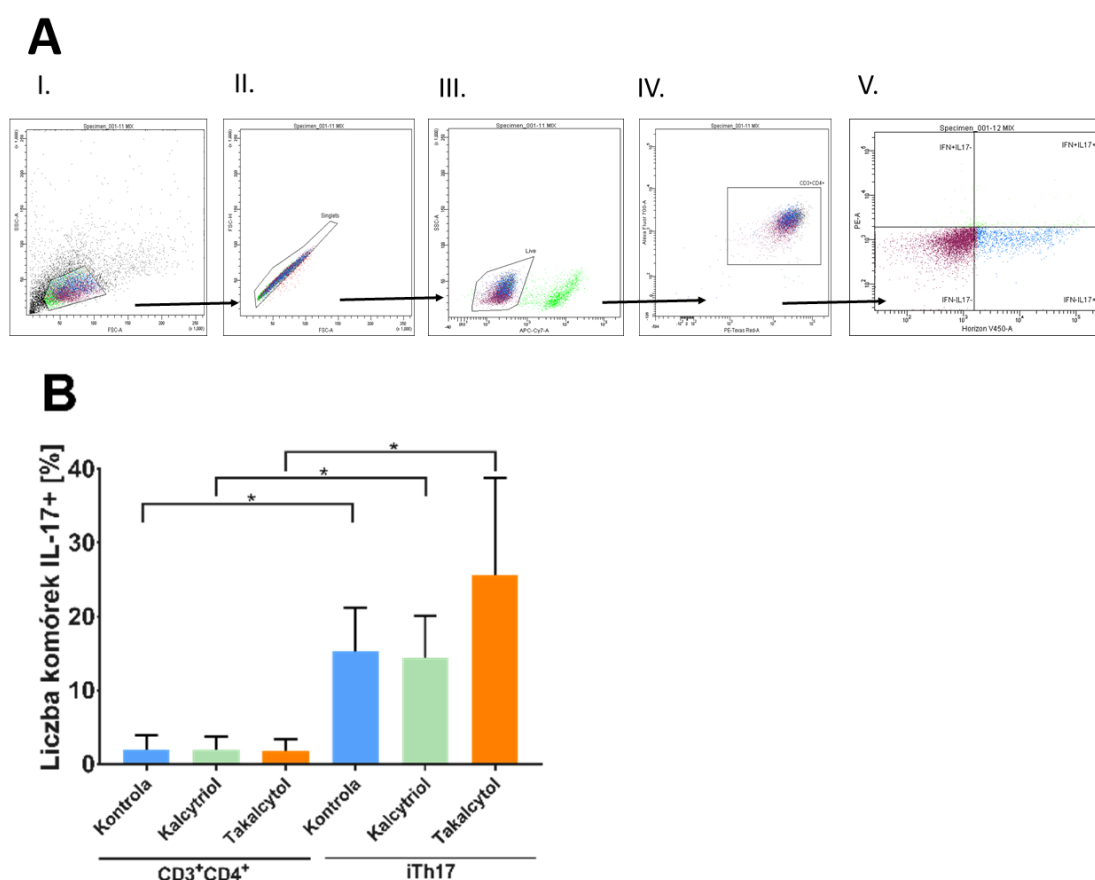
Wyniki analizy cytometrycznej pokazują, że w warunkach nieblokowania receptorów komórkowych, odsetek populacji IL-17-IFN- γ^+ był istotnie wyższy w grupie myszy zdrowych oraz grupie traktowanej kalcytriolem w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 36D, E, F).

Zablokowanie receptora CD44 i CD29 powodowało wzrost różnicowania komórek Th1 w grupie kontrolnej względem kontroli nieblokowanej (Rycina 36D i F). Efektem zablokowania receptorów CD51 i CD29 był istotny wzrost odsetka komórek IL-17-IFN- γ^+ w grupie traktowanej takalcytolem względem tej samej grupy, ale przy braku blokowania receptora (Rycina 36E i F). Zaobserwowano również, iż zablokowanie receptora CD29 powodowało wzrost odsetka komórek Th1 w grupie traktowanej kalcytriolem w porównaniu do tej samej grupy w warunkach braku blokowania receptora (Rycina 36F).

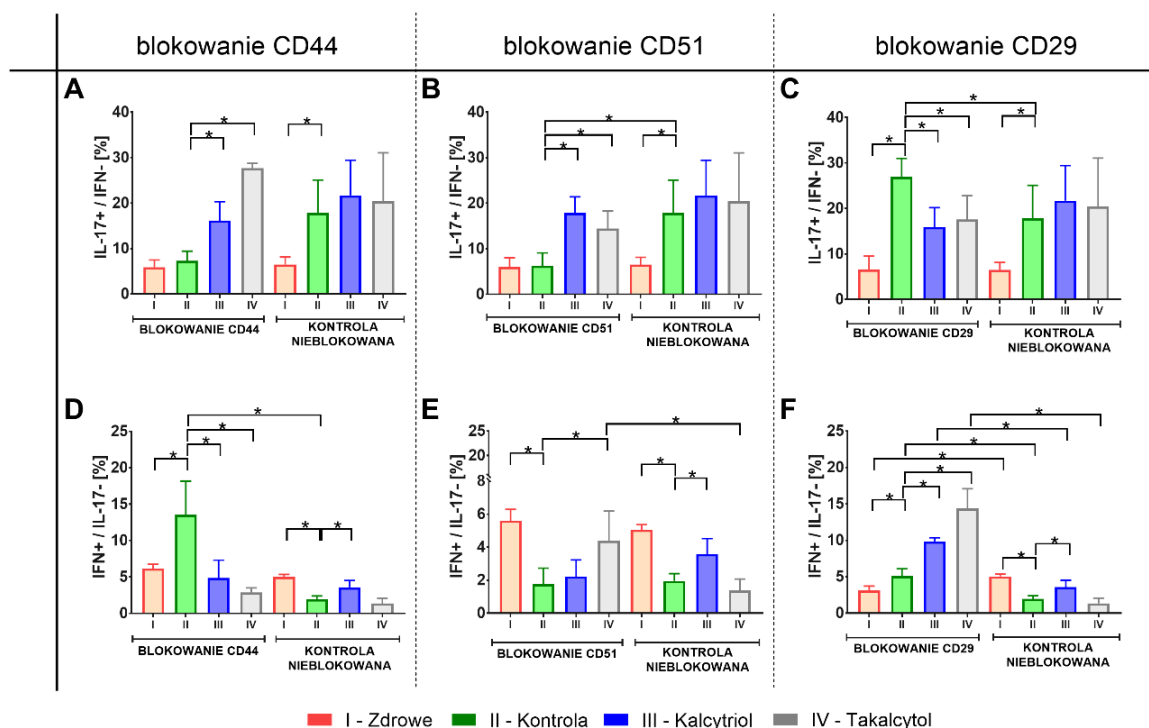
Blokowanie receptora CD44 u myszy młodych powodowało stymulację komórek Th1 w grupie kontrolnej względem myszy zdrowych (dwukrotny wzrost), natomiast działanie kalcytriolu i takalcytolu w warunkach zablokowania CD44 przyczyniło się do obniżenia odsetka komórek Th1 kolejno trzykrotnie i pięciokrotnie (Rycina 36D).

Analiza udziału procentowego komórek Th1 przy zablokowaniu receptora CD51 wskazała na znaczący, trzykrotny spadek ilości tych komórek w grupie myszy kontrolnych względem myszy zdrowych. Natomiast w tych samych warunkach blokowania, w grupie myszy traktowanych takalcytolem doszło do stymulacji komórek Th1 (trzykrotny wzrost) względem grupy kontrolnej (Rycina 36E).

Podczas oceny wpływu blokowania CD29 na odsetek komórek Th1 odnotowano, iż zablokowanie wspomnianego receptora powoduje dwukrotny wzrost odsetka Th1 w grupie kontrolnej względem myszy zdrowych. Ocena komórek w grupie traktowanej kalcytriolem i takalcytolem, przy zablokowaniu CD29 pokazała kolejno dwukrotny i trzykrotny wzrost odsetka komórek względem grupy kontrolnej (Rycina 36F).



Rycina 35. Strategia bramkowania komórek w analizie cytometrycznej blokowania receptorów (A) dla OPN w komórkach pochodzących ze śledziony oraz liczba komórek Th17 oznaczona spośród komórek CD4⁺ różnicowanych i nieróżnicowanych do limfocytów Th17 (B). Sprawdzono odsetek komórek IL-17⁺ w nieseparowanych komórkach pochodzących ze śledziony, poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną oraz w komórkach separowanych, poddanych różnicowaniu do limfocytów Th17 oraz 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną (B). W trakcie analizy cytometrycznej wyodrębniono komórki frakcji limfocytarnej (I, oś x FSC-A, oś Y SSC-A), oddzielono pojedyncze komórki od agregatów komórkowych (II, oś x FSC-A, oś Y SSC-H), następnie komórki żywe (III, oś x APC-Cy7-A, oś Y SSC-A), wyodrębniono frakcję komórek CD3⁺CD4⁺ (IV, oś x Pe-TexasRed-A, oś Y AlexaFluor700-A), wśród których analizowano komórki IL-17⁺IFN⁻ oraz IL-17⁺IFN⁺ (V, oś x HorizonV450-A, oś Y PE-A). N=5. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta dla pojedynczych porównań grup eksperymentalnych pomiędzy komórkami różnicowanymi a nieróżnicowanymi. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których *p<0,05.



Rycina 36. Wpływ zablokowania CD44, CD51 i CD29 na różnicowanie limfocytów Th17. Analiza cytometryczna przeprowadzona została na populacjach IL-17⁺ IFN-γ⁺ oraz IFN-γ⁺ IL-17⁻. Dokonano oceny odsetka komórek odpowiadających Th17 i Th1 w odpowiedzi na zablokowanie receptorów CD44 (A i D), CD51 (B i E) i CD29 (C i F) w zależności od zastosowanego traktowania myszy kalcytriolem i takalcytolem. Eksperyment blokowania przeprowadzono z zastosowaniem grupy kontrolnej (część nieblokowana) oraz grupy z zablokowanym poszczególnym receptorem (część blokowana CD44; CD51; CD29). N=5. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu dwukierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Sidak'a oraz testu t-Studenta lub Manna-Whitney'a dla pojedynczych porównań grup kontrolnej oraz myszy zdrowych. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których *p<0,05 w porównaniu do grupy kontrolnej lub tych samych grup w dwóch częściach eksperymentu (blokowanie vs nieblokowanie).

Analogiczny eksperyment przeprowadzony został na komórkach pochodzących od myszy z modelu pomenopauzalnego, obciążonych guzem 4T1. Analiza cytometryczna wykazała jednak, że komórki pochodzące z grup eksperymentalnych – kontrolnej, traktowanej kalcytriolem i takalcytolem, obumarły w trakcie różnicowania *in vitro* (Rycina S - 7A-D). Dlatego, z powodu zbyt niskiej żywotności komórek w grupach badanych, postanowiono nie analizować wyników wpływu blokowania receptorów dla

OPN na różnicowanie komórek Th17 i Th1 na komórkach pochodzących od myszy z modelu pomenopauzalnego obarczonych guzem 4T1.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Na podstawie przeprowadzonych w niniejszej rozprawie doktorskiej badań, dotyczących oceny przeciwnowotworowego efektu kalcytriolu i takalcytolu, stwierdzić można, że:

1. Objętość guza w żadnej z grup eksperymentalnych, zarówno w modelu 4T1 jak i 67NR nie różniła się po traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem.
2. W grupie myszy otrzymujących takalcytol wzrosła liczba kolonii przerzutowych w płucach w mysim przedmenopauzalnym modelu 4T1. W modelu pomenopauzalnym 4T1 odnotowano spadek liczby przerzutów do płuc po traktowaniu kalcytriolem oraz do wątroby po traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem.
3. Traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przedmenopauzalnym towarzyszył wzrost liczby naczyń krwionośnych oraz wartości PE, informującej o wartości największego wysycenia badanej tkanki kontrastem. Przeciwny efekt, spadek wartości PE, spowodowało traktowanie takalcytolem myszy z modelu postmenopauzalnego. W modelu 4T1 nie zauważono istotnych różnic w wyżej wymienionych parametrach.

Badania pozwalające na określenie toksyczności zastosowania kalcytriolu i takalcytolu wykazały, że:

1. Ostatniego dnia eksperymentu (24 dzień) masa ciała myszy z modelu przedmenopauzalnego, obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1, traktowanych kalcytriolem i takalcytolem obniżyła się dwukrotnie.
2. W modelu przedmenopauzalnym 4T1 bezwzględna liczba limfocytów, leukocytów, monocytów i granulocytów wzrosła w osoczu myszy

traktowanych takalcytolem. Z kolei odsetek limfocytów w grupie traktowanej kalcytriolem i takalcytolem istotnie obniżył się w każdej z grup eksperymentalnych. W przedmenopauzalnym modelu 67NR bezwzględna liczba leukocytów i granulocytów; a w modelu pomenopauzalnym wartość hematokrytu obniżyły się w grupie traktowanej takalcytolem.

3. Traktowanie kalcytriolem spowodowało podwyższenie w mysim osoczu poziomu Ca^{2+} w modelu przed- i pomenopauzalnym 4T1 oraz CRE w modelu pomenopauzalnym 4T1. Wskutek działania takalcytolu u myszy wzrósł poziom ALT i obniżył się wskaźnik de Ritisa w modelu przedmenopauzalnym 67NR. W grupie traktowanej kalcytriolem (model przedmenopauzalny) i takalcytolem (model pomenopauzalny) poziom Ca^{2+} wzrósł. Odnotowano wzrost poziomu CRE w grupach otrzymujących kalcytriol i takalcytol.

Badania pozwalające na scharakteryzowanie odpowiedzi immunologicznej podczas wzrostu guza, przy zastosowaniu kalcytriolu i takalcytolu wykazały, że:

1. U myszy z modelu pomenopauzalnego 4T1, liczba komórek $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ wzrosła w próbkach z guza myszy traktowanych takalcytolem oraz z płuc w grupie traktowanej kalcytriolem i takalcytolem.
2. Podwyższenie ekspresji IL-17 zaobserwowano w limfocytach CD4^+ pochodzących z płuc myszy w modelu przedmenopauzalnym 4T1, w grupie traktowanej takalcytolem. U myszy, którym podawany był kalcytriol, wykazano wzrost ekspresji CD44 w limfocytach CD4^+ ze śledziony myszy młodych. W modelu pomenopauzalnym myszy obciążonych rakiem 4T1 po traktowaniu myszy kalcytriolem odnotowano wzrost ekspresji receptorów CD29 i CD44 w mononuklearch krwi oraz wzrost poziomu IL-17 w limfocytach CD4^+ pochodzących z guza. Z kolei zastosowanie takalcytolu spowodowało spadek ekspresji CD29 i wzrost ekspresji CD51 w limfocytach CD4^+ z guza myszy z tego samego modelu.
3. W modelu pomenopauzalnym 4T1, stosowanie kalcytriolu powodowało spadek odsetka komórek Treg ($\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+$) we frakcji mononuklearnej

krwi, zaś stosowanie takalcytolu - w komórkach pochodzących z węzłów chłonnych.

4. W izolowanych limfocytach $CD4^+$ pochodzących ze śledzion myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem w modelu pomenopauzalnym 4T1, obserwowano wzrost ekspresji genu *Vdr* oraz spadek ekspresji genów *Rora* i *Foxp3*. Geny *Gfi1* i *Stat5a* w modelu pomenopauzalnym uległy nadekspresji wskutek działania kalcytriolu. W grupie traktowanej takalcytolem wykazano spadek ekspresji genu *Rorc* w modelu pomenopauzalnym oraz wzrost ekspresji genu *Tbx1* w modelu przedmenopauzalnym.
5. W limfocytach $CD4^+$ śledzionowych pochodzących z modelu przedmenopauzalnego 67NR, w grupach traktowanych kalcytriolem i takalcytolem wykazano wzrost ekspresji genów *Rorc* i *Rora*. Działanie kalcytriolu spowodowało wzrost ekspresji genów *Gfi1* oraz *Gata3*, a działanie takalcytolu – wzrost ekspresji *Il17a* i spadek *Spp1*. W modelu pomenopauzalnym, w tych samych komórkach odnotowano obniżenie ekspresji genu *Il17a* po traktowaniu takalcytolem.
6. Podawanie kalcytriolu myszom obciążonym rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu pomenopauzalnym spowodowało aktywację szlaku sygnałowego ERK w mysich splenocytach $CD4^+$ oraz obniżenie poziomu OPN w komórkach $CD4^+$ pochodzących z guza.
7. Wzrost ekspresji receptora VDR zaobserwowano w limfocytach $CD4^+$ izolowanych ze śledziony myszy traktowanych takalcytolem, w modelu przedmenopauzalnym 67NR.

Badania mające na celu wskazanie znaczenia receptorów dla OPN w procesie różnicowania komórek Th17 pod wpływem kalcytriolu i takalcytolu w modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 wykazały, że:

1. Zablockowanie receptorów CD44 i CD51 w procesie różnicowania do Th17 splenocytów $CD3^+CD4^+$ pochodzących od myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem prowadzi do wzrostu ekspresji IL-17 w tych komórkach. Odwrotny efekt obserwowany jest przy zablokowaniu CD29.

2. Komórki w grupie kontrolnej słabiej różnicują się w kierunku Th17 po zablokowaniu CD51 w stosunku do komórek nieblokowanych. Przeciwny efekt obserwowany jest przy zablokowaniu CD29.
3. W warunkach różnicowania śledzionowych komórek CD3⁺CD4⁺ w kierunku Th17, w grupie myszy otrzymujących kalcytriol odnotowano wzrost ekspresji IFN γ w tych komórkach.
4. Zablokowanie receptorów CD44 w grupie kontrolnej; CD51 w grupie myszy otrzymującej takalcytol; oraz CD29 we wszystkich badanych grupach eksperymentalnych na powierzchni śledzionowych komórek CD3⁺CD4⁺ spowodowało wzrost odsetka komórek IFN γ ⁺IL-17⁻ w stosunku do komórek nieblokowanych z tych samych grup eksperymentalnych.
5. Komórki CD3⁺CD4⁺ współróżnicują się do limfocytów IFN γ ⁺IL-17⁻ po zablokowaniu CD51 w grupie otrzymującej takalcytol oraz po zablokowaniu CD29 w grupach traktowanych kalcytriolem i takalcytalem. Odwrotny efekt obserwowany jest po zablokowaniu CD44.

DYSKUSJA

Pierwsze doniesienia dotyczące potencjalnego wpływu witaminy D na nowotwór piersi sięgają lat 90. XX wieku [255]. Wciąż przybywa dowodów wskazujących na niejednoznaczny wpływ tej witaminy na progresję nowotworu piersi u kobiet, a postrzeganie witaminy D jako związku działającego jednokierunkowo nie jest prawidłowe. Część badań przeprowadzonych na grupach chorych, wykazuje pozytywną korelację poziomu witaminy D z hamowaniem progresji raka [256], [257]. Inna część badań kohortowych dowodzi jednak braku powiązania witaminy D z rozwojem raka piersi [258]–[260]. Ważnym elementem badań nad wpływem witaminy D na rozwój raka piersi u kobiet jest wiek i status hormonalny. U kobiet po menopauzie, synteza estrogenów produkowanych przez jajniki zostaje zahamowana, a proces ten przejmuje enzym aromataza znajdująca się w innych tkankach organizmu, głównie w tkance tłuszczowej. Enzym ten, m.in. pod wpływem czynników zewnętrznych może zostać nadmiernie aktywowany, co jest jedną z przyczyn powstania raka piersi [261]. Ekspresja aromatazy może być obniżana przez kalcytriol, który w sposób bezpośredni hamuje jej transkrypcję oraz pośredni, zmniejszając aktywność oraz poziom prostaglandyny 2,

będącej czynnikiem stymulującym transkrypcję aromatazy w raku piersi. Kalcytriol zaangażowany jest również w hamowanie sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem receptora ER. Blokując połączenie się liganda z receptorem, znosi efekt w postaci nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych [262]. W przypadku układu odpornościowego, starzenie się organizmu wiąże się ze zwiększoną częstością występowania stanu zapalnego, czemu towarzyszy podwyższony poziom cytokin prozapalnych oraz zmniejszony udział limfocytów T pamięci i komórek efektorowych [263]. Rozwijający się nowotwór infiltrowany jest przez różne typy komórek, a typ tego nacieku determinuje odpowiedź całego układu odpornościowego. Odpowiedź ta charakteryzuje się infiltracją makrofagów typu 1, komórek dendrytycznych, komórek NK, cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ i pomocniczych limfocytów T CD4⁺. Wśród tych komórek istotną rolę pełnią limfocyty Foxp3⁺ (Treg), a także limfocyty Th17. Naciek komórek T regulatorowych CD4⁺Foxp3⁺ zwykle powiązany jest ze złymi rokowaniami dla pacjentów, ze względu na ich właściwości immunosupresyjne [264]. Z kolei limfocyty Th17 pomimo swej plastyczności wiążącej się z możliwością pełnienia funkcji zarówno pro- jak i przeciwnowotworowej, częściej powiązane są z promowaniem procesu zapalnego towarzyszącego nowotworowi poprzez wytwarzanie prozapalnej IL-17 [166]. Wysoka zmienność komórek Th17 może być modulowana między innymi przez OPN, która łącząc się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek CD4⁺ reguluje ich różnicowanie [197]. Biorąc pod uwagę opisane powyżej doniesienia oraz brak jednoznacznego efektu działania witaminy D w raku gruczołu sutkowego, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu aktywnej formy witaminy D jaką jest kalcytriol oraz jego analogu takalcytolu na proces różnicowania prozapalnych limfocytów Th17, przy jednoczesnym uwzględnieniu udziału OPN oraz wieku myszy w przerzutującym (4T1) i nieprzerzutującym (67NR) modelu raka gruczołu sutkowego. Uwzględniając zmienność hormonalną zależną od wieku, w badaniach zastosowano dwa modele: przed- i pomenopauzalny. W modelu pomenopauzalnym myszy poddawane były ovariectomii w celu odzwierciedlenia statusu hormonalnego pacjentek po menopauzie.

Anisiewicz i wsp. wykazali, że w modelu myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1, kalcytriol i jego pochodne mogą nasilać immunosupresję mikrośrodowiska nowotworu, poprzez napływ monocytów Ly6C^{low}, wywierając niekorzystny wpływ na progresję raka (między innymi poprzez promowanie przerzutowania) w modelu przedmenopauzalnym, jednakże efekt ten był odwrotny u

myszy w modelu pomenopauzalnym. Wynik ten pośrednio powiązano z aktywnością OPN [265]. W badaniach do niniejszej pracy wykazano, iż w komórkach guza pochodzącego od myszy młodych obarczonych rakiem 4T1, kalcytriol, nie wpływał, natomiast w modelu pomenopauzalnym obniżał poziom OPN (Rycina 37). Z kolei takalcytol powodował obniżenie poziomu OPN w osoczu myszy młodych obarczonych rakiem 67NR (Rycina 38). Analizy w niniejszej pracy prowadzone były na materiale biologicznym pobranym 24 dnia eksperymentu. Anisiewicz i wsp., w modelu przedmenopauzalnym 4T1 zaobserwowali wzrost ekspresji OPN w tkance guza od 28 dnia eksperymentu pod wpływem kalcytriolu, oraz od 14 dnia eksperymentu pod wpływem takalcytolu i PRI-2205 [196]. Zwiększony poziom OPN pod wpływem kalcytriolu odnotowano również 28 dnia eksperymentu w tkance guza pobranej od myszy młodych w modelu 4T1, karmionych dietą normalną (1000 IU + kalcytriol) i niedoborową pod względem cholekacyferolu (100 IU + kalcytriol) [266]. Poziom OPN określono także w komórkach guza pochodzących od myszy w modelu pomenopauzalnym, gdzie działanie kalcytriolu spowodowało półtorakrotne obniżenie ekspresji OPN. Podobną zależność można zaobserwować w innych badaniach dotyczących zastosowania kalcytriolu u myszy obarczonych rakiem 4T1 w modelu pomenopauzalnym, gdzie 33 dnia eksperymentu poziom OPN w tkance guza istotnie maleje [86]. Badania na mysim modelu nowotworu 4T1 przeprowadzone w poprzednich latach w naszym laboratorium wykazują zależność między poziomem OPN w tkance guza a nasileniem procesu przerzutowania. U myszy obarczonych komórkami 4T1 w modelu pomenopauzalnym traktowanie takalcytolem i PRI-2205 prowadzi do przejściowego spadku liczby przerzutów do płuc w 28 dniu eksperymentu. Jednakże 33 dnia eksperymentu aktywność przeciwp przerzutowa zanika. Wynik ten skorelowano ze spadkiem ekspresji OPN i brakiem indukcji angiogenezy w tkance guza u tych myszy [86]. W niniejszej pracy, 24 dnia eksperymentu odnotowano podobną zależność po traktowaniu myszy takalcytolem w modelu pomenopauzalnym 4T1, gdzie spadek liczby przerzutów do płuc i wątroby korelował ze spadkiem poziomu OPN w tkance guza. Co więcej, eksperyment przeprowadzony w modelu przedmenopauzalnym wykazał, iż po traktowaniu myszy takalcytolem liczba przerzutów do płuc zwiększyła się półtorakrotnie. W tym przypadku nie zauważono jednak powiązania występowania przerzutów z poziomem OPN. Niemniej jednak, Anisiewicz i wsp., w analizach na mysim modelu odpowiadającym wiekiem oraz typem nowotworu modelowi zastosowanemu w niniejszej pracy doktorskiej, dowiedli, że analogi kalcytriolu – takalcytol (28 dnia

eksperymentu) i PRI-2205 (21 dnia eksperymentu) promują proces przerzutowania u myszy młodych (około dwukrotne zwiększenie liczby przerzutów), czemu towarzyszyła zwiększona ekspresja OPN w tkance guza [86].

Powyższe eksperymenty wskazują na korelację pomiędzy czasem trwania terapii witaminą D, stopniem zaawansowania nowotworu a poziomem OPN i występowaniem przerzutów. W komórkach układu odpornościowego witamina D, podobnie jak w innych komórkach organizmu, działa za pośrednictwem swoistego receptora – VDR [267]. Celem sprawdzenia czy efekt biologiczny spowodowany otrzymywaniem przez myszy kalcytriolu i takalcytolu koreluje z poziomem receptora dla tej witaminy, wykonano analizę pozwalającą na określenie poziomu jego ekspresji na poziomie genu oraz białka w komórkach CD4⁺ izolowanych z mysich splenocytów. Wyniki niniejszej pracy doktorskiej uzyskane 24 dnia eksperymentu, wskazują na podwyższony poziom ekspresji genu *Vdr* w komórkach CD4⁺ myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem w modelu pomenopauzalnym 4T1 (Rycina 37), jak również podwyższony poziom VDR w komórkach CD4⁺ pochodzących z modelu przedmenopauzalnego myszy obciążonych rakiem 67NR i otrzymujących takalcytol (Rycina 38). W mysich splenocytarnych komórkach CD4⁺ 21 dnia eksperymentu i w komórkach pochodzących z węzłów chłonnych 28 dnia eksperymentu Pawlik i wsp. odnotowali wzrost ekspresji genu *Vdr* wskutek traktowania myszy takalcytolem lub PRI-2205, lecz w modelu przedmenopauzalnym 4T1 [189], [190]. Podobny wzrost ekspresji genu *Vdr* odnotowano w przebiegu eksperymentalnego, autoimmunologicznego zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (EAE - *ang. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*). Podanie myszom w modelu pomenopauzalnym kalcytriolu, przy jednoczesnym podaniu estrogenów, spowodowało istotny wzrost ekspresji genu *Vdr* w komórkach rdzenia kręgowego. Wyróżnione powyżej analizy wskazują na znaczący udział kalcytriolu i jego analogów w ekspresji genu *Vdr* zarówno w modelu przed- jak i pomenopauzalnym. Okazuje się, że podwyższony poziom VDR działa ochronnie, ujemnie korelując z występowaniem przerzutów w raku piersi w badaniach *in vivo*, a także hamuje migrację i reguluje proces EMT przy współdziale kalcytriolu w warunkach *in vitro* [268]. Powyższe doniesienia wskazują, że VDR działa pozytywnie w regulacji procesu nowotworowego, przy udziale aktywnej formy witaminy D oraz jej analogów. Badania populacyjne dowodzą, że VDR w zależności od genotypu raka piersi wpływa na poprawę rokowania chorujących pacjentów [269].

Receptor dla witaminy D odgrywa istotną rolę w przerzutowaniu poprzez supresję przejścia nabłonkowego-mezenchymalnego (EMT). W modelach mysich, VDR odpowiadał za zmniejszenie potencjału przerzutowego komórek raka gruczołu sutkowego [270], [271]. Inne badania przeprowadzone na myszach wskazują na obniżenie ekspresji VDR, co wiązało się ze wzrostem guza pierwotnego i przerzutami do wątroby u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 168FARN [272] oraz zwiększonym tempem przerzutowania komórek raka piersi MDA-MB-231 do kości [271]. W badaniach do niniejszej pracy zaobserwowano podobny efekt i wykazano, że potencjał przerzutowy komórek, w modelu pomenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 spada, czego dowodzi obniżenie liczby przerzutów do wątroby w grupach otrzymujących kalcytriol i takalcytol oraz do płuc po traktowaniu samym kalcytriolem (Rycina 37). W obu grupach eksperymentalnych, obniżeniu przerzutowania towarzyszyło zwiększenie ekspresji genu *Vdr* w mysich splenocytarnych komórkach CD4⁺. Niemniej jednak, w raku płaskonabłonkowym przełyku, stwierdzono, że wyciszenie VDR w komórkach nowotworowych wiązało się ze zmniejszeniem proliferacji, inwazji i migracji komórek oraz hamowało przerzuty do płuc [273]. Wspomniane powyżej badania innych autorów prowadzone w modelu mysim wskazują na znaczącą zależność rozwoju przerzutów od obecności w komórkach nowotworowych receptora dla witaminy D. Wrażliwość komórki na tę witaminę za pośrednictwem jej specyficznego receptora wiąże się nie tylko z wpływem na proces tworzenia przerzutów, ale również rekrutacją limfocytów Th17 i indukcją wydzielania IL-17 poprzez szlak, w którym pośredniczy receptor VDR [274]. Plastyczność komórek Th17 pozwalająca na ich konwersję w kierunku Th1 lub Treg nie pozwala na jednoznaczne określenie ich roli w procesie nowotworzenia. Poszczególne czynniki, od których zależne jest utrzymanie fenotypu komórek Th17 są elementami odpowiedzialnymi za współróżnicowanie innych, wspomnianych komórek układu odpornościowego. Różnicowanie komórek Th17 zależne jest od stymulantów takich jak TGF- β , IL-23 i IL-6, podczas gdy za inicjację różnicowania komórek Treg odpowiada jedynie TGF- β [275]. Z kolei, niski poziom lub brak TGF- β , przy jednoczesnej obecności IL-12 i IL-23 indukują przekształcenie komórek Th17 do fenotypu Th1 [276]. Biorąc pod uwagę zmienność komórek Th17, warto uwzględnić w tym procesie rolę IL-17 wytwarzanej i wydzielanej przez dojrzałe limfocyty Th17. Jej właściwości pronowotworowe opisywane są między innymi w nowotworach skóry, jajnika, trzustki i jelita grubego [277]–[280]. Z drugiej strony, IL-17 moduluje odpowiedź immunologiczną poprzez wzmacnianie aktywności komórek

NK i T oraz pobudza wytwarzanie i aktywację komórek cytotoksycznych (CTL - *ang. cytotoxic T cells*), skutkuje to efektem przeciwnowotworowym [281]. Wszelkie działanie witaminy D na podzbiór limfocytów Th17 okazuje się mieć istotne znaczenie w leczeniu stwardnienia rozsianego czy choroby Hashimoto [282]. W przypadku tej pierwszej choroby dane również wskazują na nieoczywisty kierunek działania Th17. Badania przeprowadzone na pacjentach chorujących na stwardnienie rozsiane wykazały, że leczenie dużymi dawkami witaminy D (5000 IU) prowadzi do wzrostu liczby komórek Th17 [283]. Z kolei inne badania pokazują, że ta sama dawka zastosowana w leczeniu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym prowadzi do obniżenia stężenia IL-17 w osoczu i w efekcie ograniczenia udziału krążących komórek Th17 [284]. Podobne zależności mają miejsce w przypadku nowotworu gruczołu sutkowego. Badania przeprowadzone w przeszłości przez nas zespół wskazują na hamujący wpływ witaminy D na populację Th17, gdzie efekt obniżenia różnicowania limfocytów Th17 obserwowany był w mysim, pomenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego, natomiast w modelu przedmenopauzalnym dochodziło do stymulacji różnicowania tej populacji [190]. Wyniki w niniejszej pracy doktorskiej pokazują, że działanie takalcytolu w mysim, przedmenopauzalnym modelu 4T1 powoduje wzrost odsetka komórek CD4⁺ ekspresjonujących IL-17 w płucach (Rycina 37) i równocześnie wzrost liczby przerzutów w tym narządzie. Podobny efekt biologiczny, na skutek podania myszom takalcytolu zaobserwowali Pawlik i wsp., gdzie efekt jego działania powodował podwyższenie ekspresji genu *Il17re*, *Il17a* w mysich splenocytach oraz zwiększone uwalnianie IL-17a przez komórki iTh17 w modelu myszy młodych [190]. W niniejszej pracy, o stymulacji komórek Th17 na skutek traktowania myszy kalcytriolem w modelu pomenopauzalnym 4T1 świadczy podwyższony odsetek komórek IL-17⁺ oznaczony w tkance guza. Jednakże badania prowadzone z udziałem pacjentów chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów wskazują, że kalcytriol ma działanie hamujące na wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-17A, IL-17F na wczesnym etapie choroby, pełniąc tym samym funkcje ochronne poprzez regulację polaryzacji komórek Th17, hamowanie cytokin prozapalnych wytwarzanych przez te komórki i stymulację produkcji przeciwwzapalnej IL-4 [285]. Inne badanie wykazało jednak brak korelacji pomiędzy poziomem witaminy D a populacją poszczególnych limfocytów T u pacjentów z RZS [180]. Kalcytriol zwiększał odsetek komórek regulatorowych T (CD4⁺Foxp3⁺) i B (CD19⁺IL-10⁺) oraz zmniejszał populację prozapalnych komórek Th17 (CD4⁺IL-17⁺) w mysim modelu pęcherzowego oddzielania się naskórka wywołanego immunizacją

[286]. Jak dotąd, nie podjęto się skorelowania wpływu leczenia kalcytriolem oraz jego analogiem jakim jest takalcytol na populację limfocytów Th17 w komórkach mysiego nowotworu gruczołu sutkowego 67NR. Badanie ekspresji *Il17a*, genu kodującego IL-17A, pozwoliło stwierdzić, że traktowanie myszy z modelu przedmenopauzalnego 67NR takalcytolem powodowało wzrost, a myszy z modelu pomenopauzalnego – spadek ekspresji genu *Il17a* w mysich splenocytach, co wskazuje na zależny od wieku wpływ takalcytolu na ekspresję tego genu (Rycina 38). Linia 67NR opisywana jest jako linia nieprzerzutująca i pomimo, iż zdolna jest do zmiany lokalnego mikrośrodowiska immunologicznego, uniemożliwia utworzenie niszy przedprzerzutowej [287]. W przeprowadzonych badaniach brak wpływu kalcytriolu i takalcytolu, w modelu raka 67NR, na tworzenie przerzutów, przy jednoczesnej zwiększonej ekspresji genów kluczowych dla Th17, mogą potwierdzać tezę modyfikacji mikrośrodowiska nowotworu bez nabycia inwazyjności komórek.

Rodzina kinaz MAPK, obejmująca p38, ERK i JNK, odgrywa ważną rolę w proliferacji, różnicowaniu i śmierci komórek. Kinazy te biorą udział w różnicowaniu efektorowych limfocytów T CD4⁺. Okazuje się, że JNK1 promuje różnicowanie Th1 poprzez negatywną regulację ekspresji genu dla IL-4. W różnicowaniu Th2, poprzez regulację funkcji receptora dla IL-4, bierze udział szlak sygnałowy ERK [288]. W mysim modelu EAE wykazano, że zablokowanie kinazy ERK specyficznym inhibitorem wiązało się z supresją wytwarzania IL-17 przez komórki T CD4⁺, któremu towarzyszyło obniżenie poziomu IL-23 i IL-1, a w konsekwencji powodowało osłabienie objawów EAE [289]. Badanie to wskazuje na zależny od ERK proces różnicowania Th17 i wytwarzania IL-17. Wyniki analiz w niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają ten efekt. W mysim pomenopauzalnym modelu 4T1, u myszy otrzymujących kalcytriol zaobserwowano aktywację szlaku kinazy ERK. Wynik ten można bezpośrednio połączyć ze stymulacją Th17, z racji zwiększonego udziału populacji komórek IL-17⁺ w guzie po zastosowaniu kalcytriolu w tym modelu (Rycina 37). Populacje komórek CD4⁺ regulowane są przez wiele innych niż witamina D związków. Badania *in vivo* i *in vitro* nad cukrzycą typu 1 pokazują, że berberyna, celując w szlak kinaz MAPK, zmniejsza różnicowanie Th17 i Th1 u myszy NOD. Hamowanie różnicowania limfocytów Th17 wynikało ze zwiększenia aktywności ERK i zmniejszenia aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej STAT3 i RORγt [290]. W niniejszej pracy doktorskiej, wzrostowi ekspresji genu dla IL-17 towarzyszył w 24 dniu eksperymentu wzrost ekspresji genów *Rorc* i *Rora* – genów charakterystycznych dla populacji komórek Th17. Efekt ten

obserwowany był w mysich splenocytach, w przedmenopauzalnym modelu raka 67NR, w grupie otrzymującej takalcytol (Rycina 38). W badaniu *in vivo* przeprowadzonym przez Pawlik i wsp., u myszy młodych obarczonych przerzutującym rakiem gruczołu sutkowego 4T1, traktowanie takalcytolem powodowało wzrost ekspresji tych samych genów w iTh17 pochodzenia śledzionowego. W tym samym badaniu analizie poddano komórki CD4⁺ niestymulowane, pochodzące ze śledziony i węzłów chłonnych myszy z modelu przed- i pomenopauzalego 4T1. 21 dnia eksperymentu w modelu przedmenopauzalnym odnotowano spadek ekspresji *Il17a* po traktowaniu kalcytriolem, wzrost ekspresji *Rorc* po traktowaniu takalcytolem oraz wzrost ekspresji *Rora* po traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem. W modelu pomenopauzalnym, 14 dnia eksperymentu ekspresja genów *Il17a* i *Rorc* wzrosła w grupie otrzymującej kalcytriol, z kolei 28 dnia eksperymentu ekspresja *Rorc* obniżyła się w grupie traktowanej kalcytriolem. Analiza tego samego rodzaju komórek w węzłach chłonnych pokazała, że 28 dnia eksperymentu, w grupie traktowanej takalcytolem doszło do stymulacji ekspresji genów *Il17a* i *Rora* [190]. Zarówno ROR α (kodowany przez gen *Rora*), jak i ROR γ t (kodowany przez gen *Rorc*) promują różnicowanie Th17. ROR γ t jest lepiej scharakteryzowany oraz w większym stopniu indukowany podczas różnicowania ludzkich regulatorowych limfocytów T [291]. Tym niemniej ROR α indukowany jest w komórkach Th17 zarówno u ludzi jak i myszy gdzie został zidentyfikowany jako kluczowy czynnik promujący Th17 [292], [293]. Knock-out genu dla ROR α powoduje spadek ekspresji *Il-17a*, oraz populacji komórek ekspresjonujących ROR γ t, oraz zwiększenie udziału populacji Treg. W badaniu tym oceniono również wpływ zastosowania selektywnego odwrotnego agonisty ROR α jakim jest związek SR3335. Okazuje się, że hamuje on rozwój mysich komórek Th17 *in vitro* i *in vivo*, nie wpływając na rozwój limfocytów T w grasicy, w przeciwieństwie do modulatorów ROR γ t [294]. Badania te potwierdzają znamienny wpływ ROR α i ROR γ t w procesie różnicowania limfocytów Th17. Obecność ROR α i ROR γ , jak również VDR odgrywa istotną rolę również w fibroblastach, gdzie wyciszenie VDR, ROR α lub ROR γ t znosiło hamujące działanie hydroksymetabolitów witaminy D₃ na proliferację ludzkich fibroblastów [295].

Dualizm funkcjonalny IL-17 polega na promowaniu proliferacji czy inwazji komórek nowotworowych oraz hamowaniu ich apoptozy poprzez wydzielanie czynników angiogennych i zwiększanie ekspresji metaloproteinaz macierzy komórkowej. Z drugiej strony, IL-17 promuje apoptozę i spowalnia wzrost guza poprzez aktywację komórek NK, CTL i rekrutację neutrofilów [296]. Badania wykonane w ramach

niniejszej pracy wykazały, że w modelu przedmenopauzalnym myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR, otrzymujących kalcytriol i takalcytol, dochodzi do stymulacji angiogenezy. Okazuje się, że kalcytriol wpływa na zwiększenie liczby naczyń i powoduje podwyższenie poziomu VEGF w osoczu myszy. Takalcytol, z kolei, zwiększa wartość PE w analizie USG, czyli maksymalne wysycenie naczyń guza kontrastem, co pozwala na ocenę i scharakteryzowanie naczyń otaczających guz oraz jego perfuzję. Powoduje również podwyższenie poziomu VEGF w mysim osoczu (Rycina 38). Obserwacje te mogą sugerować, że w modelu przedmenopauzalnym raka 67NR, dochodzi do stymulacji angiogenezy wskutek zastosowania kalcytriolu i jego analogu. W grupie myszy traktowanych takalcytolem tworzenie naczyń krwionośnych może korelować ze zwiększoną ekspresją genów charakterystycznych dla limfocytów Th17, które opisano powyżej oraz zwiększoną ekspresją białka VDR, mogącego pośredniczyć w sygnalizacji zależnej od witaminy D. Zastosowanie tego analogu w modelu pomenopauzalnym myszy z modelu raka 67NR wykazało odwrotny efekt, i powodowało obniżenie parametru PE. W przypadku tej grupy wiekowej wartość PE koreluje z obniżoną ekspresją *Il-17a* u myszy. Powiązania IL-17 z promocją angiogenezy odgrywają istotną rolę w procesie nowotworzenia. Analizy *in vivo* na myszach obarczonych rakiem 4T1 pokazują, że traktowanie myszy rekombinowaną IL-17A stymuluje angiogenezę [297]. Przewlekły stan zapalny towarzyszący rozwojowi nowotworu może być promowany przez IL-17. Sygnalizacja ze strony IL-17 indukuje ekspresję VEGF w niedrobnokomórkowym raku płuc i nowotworze jelita grubego [298], [299]. Badania *in vivo* wskazują również na niezależny od VEGF proces angiogenezy, w który zaangażowana jest IL-17 [300]. W modelu myszy obciążonych cukrzycą, w którym badano wpływ kalcytriolu na reakcję zapalną i angiogenezę, będące często zaburzonymi w gojeniu się ran powstałych wskutek choroby, wykazało, że kalcytriol znacząco zwiększa gojenie się ran, łagodzi nadmierny stan zapalny i promuje przejście makrofagów z fenotypu M1 do M2. Ponadto kalcytriol zwiększał odsetek komórek CD31⁺ w analizie histopatologicznej oraz ekspresję białek i mRNA VEGF, VEGFR2, PDGF i PDGFR β , jak również ekspresję mRNA *Bfgf* i *Egfr* [301]. Anisiewicz i wsp. wykazali, że kalcytriol oraz jego analogi – takalcytol i PRI-2205 powodują wzrost wartości parametru TTP (time-to-peak) w analizie USG guza, u myszy obarczonych nowotworem gruczołu sutkowego 4T1, co świadczy o zwiększonej perfuzji krwi w guzie. Co więcej, parametr PE również wzrósł wskutek zastosowania kalcytriolu u tych myszy. W tym samym eksperymencie oznaczono poziom VEGF w guzie. Analiza wykazała

obniżenie poziomu VEGF po traktowaniu kalcytriolem i PRI-2205 w 14 dniu eksperymentu. W 28 dniu eksperymentu poziom VEGF istotnie spadał w grupie kontrolnej, traktowanej takalcytolem i PRI-2205 względem dnia 14, co powiązane było z zanikiem efektu kalcytriolu i PRI-2205 [196]. Inne badania, przeprowadzone w warunkach *in vitro* pokazują, że kalcytriol hamuje angiogenezę promowaną przez IL-8 w raku prostaty [302], a jego analogi – PRI-2191 i PRI-2205 zmniejszają ekspresję genów związanych z EMT, angiogenezą, proliferacją i przeżyciem komórek w ludzkiej linii komórkowej raka jelita grubego HT-29 [303]. Komórki od myszy z knock-outem VDR wykazywały zwiększoną ekspresję HIF-1 α , VEGF, PDGF, ANG-1 oraz powiększone naczynia krwionośne pomagające w perfuzji zmian nowotworowych [304].

Plastyczność komórek Th17, pozwalająca na zmianę ich fenotypu w komórki Treg skutkuje zmianą reakcji ze strony układu odpornościowego w odpowiedzi na rozwijający się nowotwór oraz modulacją funkcji tych komórek. Komórki Th17 są źródłem indukowanych przez nowotwór komórek Treg u myszy z nowotworem jajnika i jelita grubego, co wskazuje na ścisły związek między Th17 i Treg w mikrośrodowisku nowotworu [305]. W niniejszej pracy obserwowano zwiększony udział komórek Th17 (podwyższony udział populacji IL-17⁺, aktywacja szlaku ERK oraz zwiększona ekspresja genu *Vdr*) w splenocytach myszy modelu pomenopauzalnego 4T1 traktowanych kalcytriolem i obniżoną frakcją komórek Treg we krwi (frakcji mononuklearnej) oraz obniżoną ekspresję genu *Foxp3* w limfocytach CD4⁺ w śledzionie. Takie same wartości odnotowano w grupie myszy otrzymujących takalcytol, przy czym wynik ten nie był jednoznacznie powiązany ze wzrostem udziału Th17, niemniej jednak towarzyszył temu efekt wzrostu ekspresji *Vdr* oraz zwiększony udział populacji CD3⁺CD4⁺ w guzie i płucach. Obie populacje komórek zarówno Th17 jak i Treg charakteryzują się zdolnością do zmian funkcjonalnych zależnie od typu nowotworu, w mikrośrodowisku którego się znajdują. z jednej strony komórki Th17 są niezbędne do obrony organizmu przed patogenami, ale powiązano je również z wywoływaniem chorób autoimmunologicznych i rozwojem raka. Komórki Treg są niezbędne do utrzymania autotolerancji i obrony przed chorobami autoimmunologicznymi, jednakże często korelują z postępem raka [169]. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej wskazują, iż kalcytriol i takalcytol wyciszają odpowiedź ze strony komórek Treg, jednocześnie zwiększając udział populacji Th17 w pomenopauzalnym modelu 4T1. W przypadku traktowania myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 kalcytriolem, zwiększeniu udziału komórek Th17 oraz obniżeniu liczby komórek Treg towarzyszy

zahamowanie tworzenia przerzutów do wątroby i płuc po zastosowaniu kalcytriolu. Podobny efekt zauważalny jest u myszy traktowanych takalcytolem, gdzie obniżeniu udziału frakcji Treg towarzyszy zmniejszenie liczby przerzutów w wątrobie. W badaniach przeprowadzonych z udziałem pacjentów, wzrost zarówno liczby komórek Th17 jak również Treg pochodzących z krwi obserwowano w raku szyjki macicy oraz śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Towarzyszył temu wzrost stężenia cytokin IL-4, IL-10, IL-17, IL-23 i TGF- β w osoczu [306]. W warunkach *in vitro*, kalcytriol ograniczał zależny od neutrofilów rozwój komórek Th17 i promował różnicowanie komórek Treg. Obserwowano również niezależne od neutrofili tworzenie komórek Th1 z dziewiczych komórek T CD4⁺ [307]. Wskutek działania kalcytriolu, poprzez efekt stymulacji różnicowania komórek Treg z niedojrzałych komórek CD4⁺ dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczek charakterystycznych dla tych komórek tj. CTLA-4 i IL-10 [308] przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji genu dla IL17A [309].

Obecność komórek układu odpornościowego w miejscu toczącego się stanu zapalnego zależne jest między innymi od czynników pełniących funkcję chemoatraktantów. Okazuje się, że komórki takie jak limfocyty, makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne rekrutowane są za pośrednictwem OPN. Działanie OPN opisano w schorzeniach takich jak nowotwory, zwłóknienie serca, choroba Parkinsona, cukrzyca i choroby sercowo-naczyniowe, gdzie zaangażowana jest w różnicowanie limfocytów Th1 i Th17, zapalenie i przebudowę tkanek. Wpływa również na żywotność komórek i gojenie się ran [310]. Oddziaływania OPN z komórkami nowotworowymi zachodzą przez receptory, takie jak glikoproteina transbłonowa typu I, CD44 oraz integryny. Poszczególne tkanki różnią się ekspresją integryn oraz proteolitycznie modyfikowaną formą OPN, decydującą o tym, z którym receptorem się ona połączy. OPN może oddziaływać z integrynami $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$ i $\alpha \nu\beta 6$ poprzez sekwencję R159GD161 oraz z integrynami $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ i $\alpha 9\beta 1$ poprzez sekwencje E131LVTFDPTDLPAT143 i/lub S162VVYGLR168 [117]. Wśród integryn, $\alpha \nu\beta 3$ uważana jest za główny receptor dla OPN, a efekt połączenia liganda z receptorem promuje adhezję komórek, inwazję, migrację, proliferację, oporność na chemioterapię, angiogenezę czy tworzenie nowotworów i przerzutów [311]. W niniejszej pracy doktorskiej podjęto się identyfikacji receptorów dla OPN w limfocytach CD4⁺ pochodzących z guza, śledziony, płuc, krwi i węzłów chłonnych. Biorąc pod uwagę udział OPN w różnicowaniu komórek Th17, do analizy włączono integryny CD51 ($\alpha \nu$), CD61 ($\beta 3$) i CD29 ($\beta 1$) oraz receptor CD44 opisywane jako znaczące w różnicowaniu

limfocytów Th17 [197], [312]. Wyniki pokazały, że traktowanie kalcytriolem myszy w modelu przedmenopauzalnym obarczonych rakiem sutka 4T1 powoduje wzrost ekspresji receptora CD44 w limfocytach CD4⁺ pochodzących ze śledziony, z kolei u myszy w modelu pomenopauzalnego wskutek działania kalcytriolu dochodziło do wzrostu ekspresji receptorów CD44 i CD29 w limfocytach CD4⁺ pochodzących z krwi. W grupie myszy z modelu pomenopauzalnego 4T1, traktowanych takalcytolem, ekspresja CD51 wzrosła, natomiast poziom CD29 obniżył się w limfocytach CD4⁺ z guza (Rycina 37). Wyniki te pozwoliły wyłonić receptory CD44, CD29 i CD51 jako najlepiej odpowiadające na traktowanie myszy kalcytriolem i takalcytolem oraz sprawdzenie ich wpływu na różnicowanie Th17 w dalszej części badań. Okazuje się, że ekspresja CD44 na powierzchni makrofagów może być modulowana w zależności od zastosowanej dawki witaminy D w diecie [266]. W badaniach w mysim modelu reumatoidalnego zapalenia stawów dowiedziono, że OPN działa na receptor CD44 za pośrednictwem specyficznej domeny OPN-5-kD (OPN_{167–210}) [312].

Biorąc pod uwagę powyższe, w kolejnym etapie zbadano udział wybranych receptorów dla OPN we wpływie kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie komórek Th17 pochodzących ze śledziony myszy z przedmenopauzalnego modelu 4T1. Efekt badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej wskazuje, iż receptor CD51 jest kluczowy dla Th17 prowadząc do promowania różnicowania tej grupy komórek u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Potwierdzeniem tego twierdzenia jest obserwacja, że zablokowanie receptora CD51 w komórkach CD4⁺, w grupie kontrolnej myszy obarczonych rakiem sutka 4T1, prowadzi do obniżenia odsetka komórek Th17 (Tabela 16). Analiza dowiodła, że odwrotną, do wcześniej wspomnianego, aktywność względem Th17 posiada receptor CD29, gdyż hamuje on różnicowanie tej subpopulacji komórek Th u myszy młodych obarczonych komórkami 4T1. Jego zablokowanie spowodowało stymulację Th17 w grupie kontrolnej. Zgodnie z piśmiennictwem, u myszy uprzednio zakażonych pasożytem *T. cruzi*, zablokowanie receptora $\alpha\beta3$ skutkuje znaczącym hamowaniem poziomu ekspresji IFN- γ , IL-12 p70 i IL-17A, natomiast blokowanie CD44 nie wywołuje takiego efektu. Z kolei, zależne od OPN hamowanie wydzielania IL-10 było blokowane tylko przez przeciwciała przeciwko CD44 [313]. W komórkach pobranych od pacjentów chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów wykazano, iż blokowanie CD44 i CD29 powoduje zmniejszenie różnicowania limfocytów Th17, podczas gdy zablokowanie CD51 nie wpływa na odsetek tych komórek [312]. Wynik dotyczący blokowania CD29 jest odwrotnym do uzyskanego w niniejszej

pracy doktorskiej, czego powodem może być inna jednostka chorobowa, którą obarczone były myszy, co może świadczyć o tym, że OPN powoduje odmienny efekt, zależnie od schorzenia. Warto również wspomnieć, że OPN nie jest jedynym ligandem receptora CD29. Receptor $\beta 1$ zdolny jest również do wiązania kolagenu, fibronektyny, lamininy i cząsteczek adhezji komórek naczyniowych-1 [314], które nie były analizowane w niniejszej pracy, stąd ich ekspresja i efekt połączenia z receptorem mogą różnić się w zależności od jednostki chorobowej.

Zbadano również efekt blokowania receptorów dla OPN w grupach myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem, gdzie zablokowanie CD44 i CD51 spowodowało promowanie różnicowania Th17 w tych grupach względem blokowanej kontroli (Tabela 16). Świadczy to o tym, iż zarówno kalcytriol jak i takalcytol zdolne są do modulacji różnicowania komórek Th17. Zablokowanie wyżej wspomnianych receptorów ujawnia ich efekt stymulujący różnicowanie tych komórek. Efekt ten nie jest obserwowany jednak pomiędzy zablokowaniem a brakiem blokowania badanych receptorów w tych grupach eksperymentalnych. Analiza pozwala na określenie charakteru receptorów CD51 i CD29 kolejno jako promującego i hamującego różnicowanie Th17 u myszy młodych obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. W momencie pisania niniejszej pracy, brak jest danych na temat znaczenia wybranych receptorów dla OPN w różnicowaniu limfocytów Th17, przy zastosowaniu kalcytriolu i takalcytolu w modelu raka gruczołu sutkowego 4T1. Biorąc po uwagę omówione w poprzednich akapitach korelacje OPN, Th17 i witaminy D₃, przeprowadzona analiza blokowania owych receptorów zdaje się wskazywać na istotność OPN w różnicowaniu Th17 pod wpływem kalcytriolu i takalcytolu w raku gruczołu sutkowego.

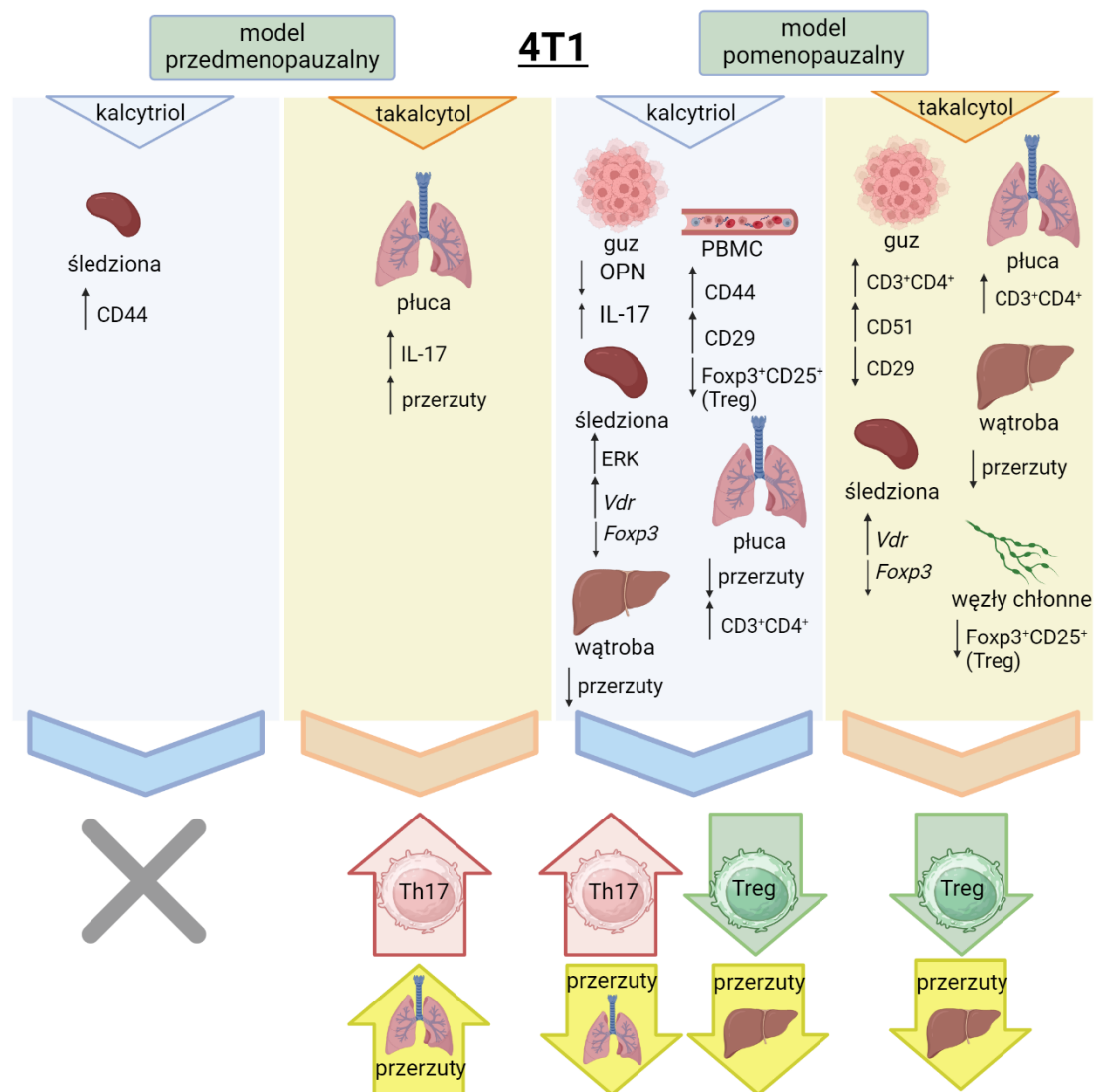
OPN będąc białkiem modulującym sygnalizację, prowadzącą do różnicowania komórek Th1, również działa w tych komórkach za pośrednictwem wspomnianych receptorów (CD51, CD29, CD44). Według literatury, monocyty krwi obwodowej oraz część makrofagów izolowanych od pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna wykazują silną ekspresję integryny $\beta 3$ [315]. W badaniach własnych wykazałam, że zablokowanie receptorów CD29 i CD44 skutkuje stymulacją różnicowania Th1 w grupie kontrolnej względem komórek nieblokowanych (Tabela 16). Ten sam efekt stymulacji Th1 obserwowany jest po zablokowaniu receptora CD29 przy traktowaniu myszy kalcytriolem i takalcytolem oraz po zablokowaniu receptora CD51 w grupie myszy traktowanych wyłącznie takalcytolem, względem komórek nieblokowanych pochodzących od myszy z tych grup eksperymentalnych.

Wyniki te sugerują, że wyżej wymienione receptory w poszczególnych grupach, zależnie od traktowania, uczestniczą w hamowaniu różnicowania komórek Th1, a ich zablokowanie powoduje stymulację Th1. Zablokowanie CD44 w komórkach pochodzących od myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem spowodowało spadek różnicowania Th1 w porównaniu do blokowanej kontroli. Odwrotny efekt natomiast odnotowano po zablokowaniu CD29, gdzie obserwowano wzrost populacji Th1 (Tabela 16). Zablokowanie CD29 prowadziło do wzrostu różnicowania Th1 we wszystkich grupach eksperymentalnych względem nieblokowanych komórek z tych samych grup. Wynik ten wskazuje, iż receptor ten jest kluczowym w procesie hamowania różnicowania Th1 w obecności czynników indukujących różnicowanie limfocytów Th17. Ten sam efekt obserwowany był po zablokowaniu CD29 na komórkach pochodzących od myszy otrzymujących kalcytriol i takalcytol względem blokowanych komórek z grupy kontrolnej. Wskazuje to na fakt, że receptor ten zależnie od działania kalcytriolu i takalcytolu zdolny jest do modulowania różnicowania Th1. Ten sam efekt stymulacji Th1, lecz po zablokowaniu CD51 udowodniono w komórkach pochodzących od myszy z grupy traktowanej takalcytolem (Tabela 16). Dane literaturowe wskazują, iż blokowanie CD44 powoduje indukcję apoptozy komórek T (CD4⁺), hamując odpowiedź immunologiczną w mysim modelu uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego wątroby. Co więcej, leczenie myszy przeciwciałem anti-CD44 całkowicie znosiło korzystny wpływ parykalcytolu na migrację komórek T i uszkodzenie tkanek [316]. Powyższe doniesienia są zbieżne z uzyskanymi w niniejszej pracy doktorskiej, gdzie obserwowano hamowanie różnicowania komórek Th1 po zablokowaniu receptora CD44. Inne dane donoszą o braku wpływu zablokowania receptora CD44 na populację indukowanych komórek Th1, jednocześnie powodując hamowanie napływu komórek Th2 w badaniu nadreaktywności dróg oddechowych związanej z astmą [317]. Uzyskane wyniki pokazują, iż w przypadku zablokowania CD29, zmienia się udział badanych frakcji komórkowych, gdzie populacja limfocytów Th17 obniża się, zaś Th1 wzrasta w grupach traktowanych kalcytriolem i takalcytolem. Po zablokowaniu receptora CD44 obserwuje się odwrotny efekt, udział komórek Th17 rośnie, a populacja Th1 maleje w komórkach pochodzących od myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem (Tabela 16).

Przeprowadzone analizy pozwalają stwierdzić, że wiek oraz traktowanie witaminą D₃, wpływają na poszczególne parametry związane z procesem wzrostu guza i przerzutowania zarówno w modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 jak i 67NR. W mysim przedmenopauzalnym modelu raka 4T1 kalcytriol i takalcytol indukowały

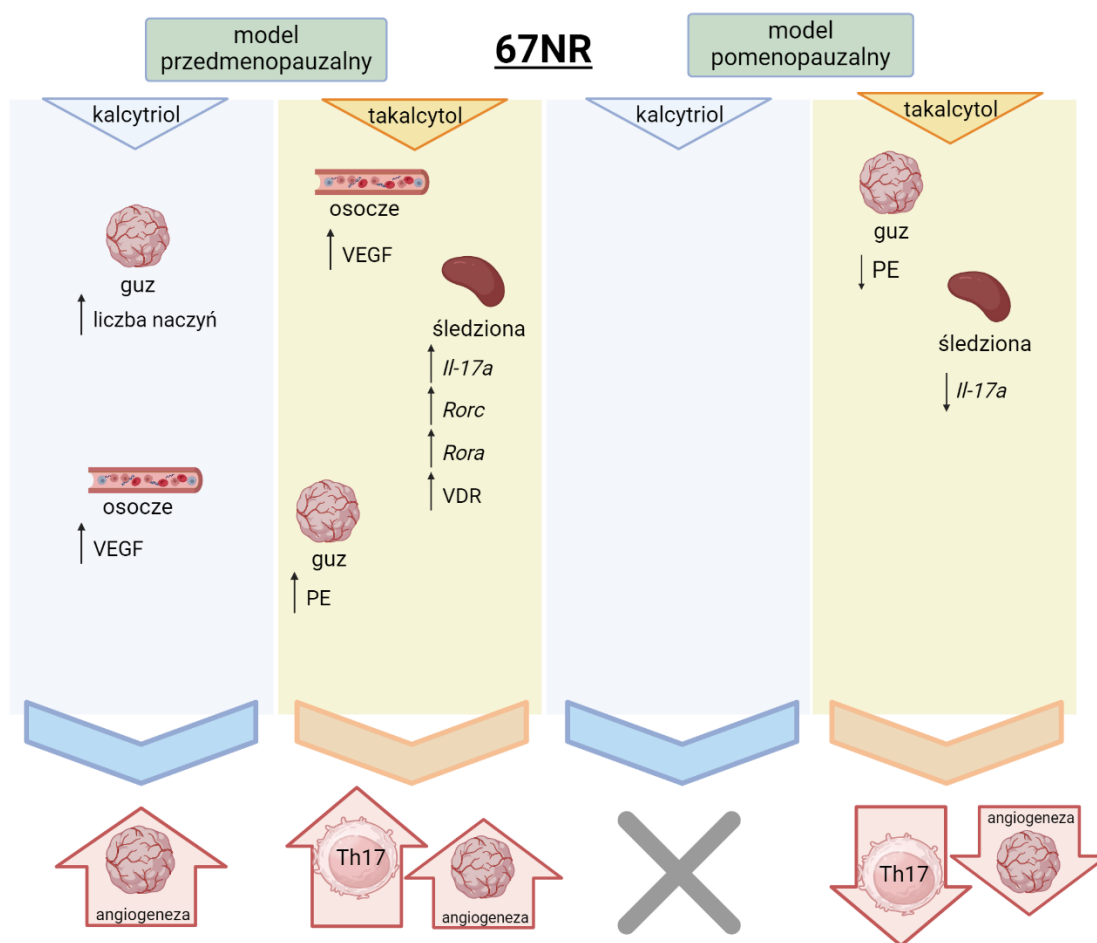
przerzutowanie komórek przy prawdopodobnym współdziale limfocytów Th17. Stymulowanie różnicowania Th17 po zablokowaniu receptorów CD44 i CD51 oraz hamowanie ich różnicowania po zablokowaniu receptora CD29, przy jednoczesnym braku istotnego wpływu kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie komórek iTh17 w warunkach kontrolnych, sugeruje, że końcowy efekt działania kalcytriolu i takalcytolu zależy od poziomu ekspresji poszczególnych receptorów w danej komórce, a efekty końcowe oddziaływania na nie mogą się znosić. W modelu pomenopauzalnym, kalcytriol i takalcytol zmniejszały populację komórek Treg w procesie nowotworowym oraz hamowały potencjał przerzutowy komórek nowotworowych. Dodatkowo kalcytriol zwiększał udział populacji Th17 oraz ekspresję receptorów dla OPN mimo, iż poziom samej OPN pod jego wpływem w guzie malał. Biorąc pod uwagę zmienność charakteru populacji limfocytów Th17 oraz Treg, można stwierdzić, że w modelu przedmenopauzalnym raka 4T1, populacja Th17 pod wpływem leczenia witaminą D₃ zyskuje charakter pronowotworowy. W modelu pomenopauzalnym dominuje populacja Th17 o charakterze przeciwnowotworowym, a populacja pronowotworowych komórek Treg obniża się (Rycina 37).

Wyniki badań przeprowadzonych w modelu raka 67NR nie pozwalają na jednoznaczne określenie charakteru populacji Th17, której to stymulacji bądź hamowaniu towarzyszy nasilenie lub zahamowanie procesu angiogenezy. W tym modelu wiek zdaje się odgrywać kluczową rolę. Wskazuje na to przeciwny efekt zastosowania witamin na populację komórek Th17 i angiogenezę. Z uwagi, iż linia komórkowa 67NR posiada charakter linii nieprzerzutującej, zasadnym może być przeprowadzenie bardziej szczegółowych badań w celu określenia charakteru komórek Th17 (Rycina 38). W tym przypadku trudno jednoznacznie stwierdzić, czy nasilona angiogeneza, idąca w parze ze stymulacją komórek Th17 w modelu przedmenopauzalnym odpowiada za wytworzenie niszy pronowotworowej, czy z kolei zwiększa szansę na leczenie nowotworu, przez lepszą penetrację guza przez lek dzięki zwiększonej ilości naczyń krwionośnych.



Rycina 37. Podsumowanie wpływu leczenia kalcytriolem i takalcytolem na parametry związane z procesem nowotworowym oraz populację limfocytów Th17 i Treg w mysim przed- i pomenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego 4T1.

Parametry badane w poszczególnych tkankach (tj. śledzionie, guzie*, płucach, PBMC, węzłach chłonnych) dotyczą analizy komórek z populacji limfocytów CD3⁺CD4⁺. Analizę przerzutów prowadzono na całej populacji komórek pochodzących ze wskazanych narządów. *Analizę OPN w guzie przeprowadzono na całej populacji komórek guza.



Rycina 38. Podsumowanie wpływu leczenia kalcytriolem i takalcytolem na parametry związane z procesem nowotworowym oraz populację limfocytów Th17 i Treg w mysim przed- i pomenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego 67NR.

Parametry badane w śledzionie dotyczą analizy komórek z populacji izolowanych limfocytów CD3⁺CD4⁺.

Tabela 16. Podsumowanie wpływu blokowania receptorów dla OPN na różnicowanie limfocytów Th17 i Th1, w komórkach pochodzących od myszy otrzymujących kalcytriol i takalcytol w mysim przedmenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego 4T1.

Część tabeli podkreślona na żółto dotyczy porównania komórek blokowanych względem komórek nieblokowanych. Część tabeli pokreślona na zielono dotyczy porównania komórek blokowanych z poszczególnych grup eksperymentalnych do blokowanej grupy kontrolnej.

Blokowany receptor	Efekt	Grupa eksperymentalna
CD51	↓ Th17	KONTROLA
CD29	↑ Th17	KONTROLA
CD44	↑ Th17	KALCYTRIOL i TAKALCYTOL
CD51	↑ Th17	KALCYTRIOL i TAKALCYTOL
CD29	↓ Th17	KALCYTRIOL i TAKALCYTOL
CD29 i CD44	↑ Th1	KONTROLA
CD51 i CD29	↑ Th1	TAKALCYTOL
CD29	↑ Th1	KALCYTRIOL
CD44	↓ Th1	KALCYTRIOL i TAKALCYTOL
CD51	↑ Th1	TAKALCYTOL
CD29	↑ Th1	KALCYTRIOL i TAKALCYTOL

WNIOSKI

1. Kalcytriol i takalcytol nie wpływają istotnie na wzrost guza 4T1 i 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym.
2. Takalcytol stymuluje powstawanie przerzutów w płucach myszy w modelu przedmenopauzalnym 4T1. Kalcytriol i takalcytol hamują tworzenie przerzutów do wątroby i płuc w modelu pomenopauzalnym 4T1, co powiązane z obniżoną ekspresją OPN w tkance guza, zwiększoną ekspresją genu *Vdr* w limfocytach CD4⁺ ze śledziony oraz stymulacją Th17 w grupie otrzymującej wyłącznie kalcytriol.
3. W mysim przedmenopauzalnym modelu 67NR obserwuje się stymulację angiogenezy, z kolei w modelu pomenopauzalnym, takalcytol hamuje angiogenezę guza. Stymulacji angiogenezy przez takalcytol w modelu przedmenopauzalnym towarzyszy zwiększona ekspresja genów *Il17a*, *Rora* i *Rorc* oraz zwiększona ekspresja białka VDR w mysich splenocytarnych limfocytach CD4⁺.
4. Działanie kalcytriolu i takalcytolu wskazuje na ich hamujący wpływ na populację komórek Treg w modelu pomenopauzalnym 4T1.
5. Wyciszeniu odpowiedzi ze strony komórek Treg, towarzyszy zwiększenie udziału populacji Th17 w pomenopauzalnym modelu 4T1 traktowanym kalcytriolem. Efekt ten koreluje z obniżeniem liczby przerzutów w wątrobie i płucach, co może wskazywać na przeciwnowotworowy charakter komórek Th17 w badanym modelu.
6. Zależnie od modelu nowotworowego, wieku myszy oraz pochodzenia tkankowego komórek, kalcytriol i takalcytol zdolne są do modulowania ekspresji poszczególnych receptorów dla OPN.
7. Receptory dla OPN - CD44 i CD51 pełnią istotną funkcję w różnicowaniu komórek Th17, poprzez hamowanie różnicowania tych komórek w mysim przedmenopauzalnym modelu 4T1, w grupach otrzymujących kalcytriol i takalcytol.
8. W warunkach różnicowania Th17 dochodzi do zależnego od kalcytriolu i takalcytolu współróżnicowania komórek Th1 za pośrednictwem receptorów dla OPN – CD44, CD29 i CD51, gdzie rolę CD29 i CD51 określono jako hamującą względem limfocytów Th1.

SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja histopatologiczna raków gruczołu sutkowego	12
Tabela 2. Odczynniki wykorzystane w badaniach oraz ich pochodzenie.....	43
Tabela 3. Charakterystyka linii komórkowych wykorzystanych w eksperymentach <i>in vivo</i>	45
Tabela 4. Lista genów oraz sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w celu genotypowania	46
Tabela 5. Skład buforu x1 TAE do elektroforezy	47
Tabela 6. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych fenotypu komórek CD4 ⁺ i limfocytów T regulatorowych	55
Tabela 7. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych poziomu IL-17 w komórkach CD4 ⁺	56
Tabela 8. Przeciwciała monoklonalne stosowane w oznaczeniach cytometrycznych czystości separacji magnetycznej	58
Tabela 9. Wykaz sond użytych w reakcji real-time PCR	60
Tabela 10. Przeciwciała stosowane do immunodetekcji białek metodą Jess Simple Western	62
Tabela 11. Ilości białka całkowitego użytego w analizie Jess Simple Western .	63
Tabela 12. Warunki reakcji zautomatyzowanej detekcji białek Jess Simple Western	64
Tabela 13. Przeciwciała stosowane do blokowania receptorów dla osteopontyny	66
Tabela 14. Lista zestawów ELISA wykorzystanych do oznaczeń poziomu cząsteczek.....	67
Tabela 15. Analiza wybranych parametrów morfologicznych krwi pobranej od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR w dwóch grupach wiekowych	76
Tabela 16. Podsumowanie wpływu blokowania receptorów dla OPN na różnicowanie limfocytów Th17 i Th1, w komórkach pochodzących od myszy otrzymujących kalcytriol i takalcytol w mysim przedmenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego 4T1.....	135

SPIS RYCIN

Rycina 1. Dane epidemiologiczne dotyczące zachorowań i zgonów na nowotwory złośliwe wśród kobiet na świecie i w Polsce w 2022 roku	9
Rycina 2. Klasyfikacja histopatologiczna i molekularna raków gruczołu sutkowego.	14
Rycina 3. Tworzenie przerzutów i rola przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego – EMT w tym procesie.	16
Rycina 4. Schemat szlaku metabolicznego witaminy D ₃	19
Rycina 5. Schemat genomowego i niegenomowego działania witaminy D w komórce.	20
Rycina 6. Analogi kalcytriolu oraz modyfikacje strukturalne umożliwiające wytworzenie analogów.	25
Rycina 7. Efekty oddziaływań OPN ze swoistymi receptorami.	29
Rycina 8. Schemat różnicowania komórek T oraz ich charakter w procesie nowotworowym.	33
Rycina 9. Schemat eksperymentu <i>in vivo</i>	50
Rycina 10. Schemat płytki do zautomatyzowanej detekcji białek Jess Simple Western	64
Rycina 11. Kinetyka wzrostu guza mysich raków gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR.	69
Rycina 12. Kinetyka zmiany masy ciała myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR.	70
Rycina 13. Analiza wpływu kalcytriolu i takalcytolu na proces angiogenezy w mysim modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR.....	72
Rycina 14. Lista tkanek i komórek wykorzystanych w doświadczeniach <i>ex vivo</i>	74
Rycina 15. Analiza wybranych parametrów biochemicznych w osoczu u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR traktowanych kalcytriolem lub takalcytolem w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym.	79
Rycina 16. Ocena zdolności komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1 do tworzenia przerzutów odległych w modelu pomenopauzalnym 4T1..	81
Rycina 17. Analiza odsetka komórek stanowiących frakcję limfocytów T pomocniczych (CD3 ⁺ CD4 ⁺) w komórkach pochodzących ze śledziony (B i G),	

płuc (C i H), węzłów chłonnych (D i I), guza (E i J) oraz krwi (F i K) z modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 u myszy reprezentujących grupę przed- i pomenopauzalną	83
Rycina 18. Identyfikacja receptorów dla OPN na powierzchni komórek pochodzących ze śledziony u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z OPN ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3 ⁺ CD4 ⁺)..	84
Rycina 19. Analiza poziomu receptorów dla OPN na powierzchni komórek pochodzących z guza od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym.	86
Rycina 20. Analiza poziomu receptorów dla OPN w komórkach pochodzących z płuc od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym	87
Rycina 21. Ocena poziomu receptorów dla OPN w komórkach pochodzących z krwi myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym..	88
Rycina 22. Ocena poziomu receptorów dla OPN w komórkach pochodzących z węzłów chłonnych u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym.	89
Rycina 23. Ocena odsetka komórek IL-17 ⁺ pochodzących z komórek (A i F) śledziony, (B i G) płuc, (C i H) guza, (D i I) krwi i (E i J) węzłów chłonnych poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA, jonomycyną i brefeldyną, w modelu przed- i pomenopauzalnym u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1	91
Rycina 24. Analiza odsetka komórek stanowiących frakcję limfocytów T regulatorowych (Foxp3 ⁺ CD25 ⁺) w śledzionie (B i G), płucach (C i H), węzłach chłonnych (D i I), guzie (E i J) oraz krwi (F i K) pochodzących od myszy obarczonych guzami 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym..	92
Rycina 25. Analiza czystości izolacji magnetycznej komórek CD4 ⁺	96
Rycina 26. Analiza real-time PCR wybranych genów w komórkach CD4 ⁺ , poddanych 4-goddzinnej stymulacji PMA i jonomycyną, pochodzących ze śledziony myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przed- i pomenopauzalnym..	98

Rycina 27. Analiza real-time PCR wybranych genów w komórkach CD4 ⁺ , poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną, pochodzących ze śledzion myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym.	99
Rycina 28. Analiza Jess Simple Western wybranych białek, kluczowych w procesie różnicowania limfocytów Th17 w komórkach CD4 ⁺ pochodzących ze śledziony u myszy z modelu 4T1, przed- i pomenopauzalnym.....	101
Rycina 29. Analiza Jess Simple Western białka OPN w pełnej populacji komórek pochodzących z guza u myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego 4T1 (A i C) i 67NR (B i D).....	103
Rycina 30. Analiza stężenia 25(OH)D ₃ w osoczu myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (A i B) i 67NR (C i D) w grupie wiekowej przedmenopauzalnej i pomenopauzalnej przy użyciu testu ELISA.....	104
Rycina 31. Analiza stężenia VEGF w osoczu myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (A i B) i 67NR (C i D) w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym przy pomocy testu ELISA.	106
Rycina 32. Analiza poziomu OPN w osoczu myszy obarczonych nowotworem gruczołu sutkowego (A i B) i 67NR (C i D) w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym z wykorzystaniem testu ELISA.	107
Rycina 33. Analiza stężenia OPN w medium hodowlanym z komórek CD4 ⁺ poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną u myszy reprezentujących model przedmenopauzalny (A) i pomenopauzalny (B) obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 przy użyciu testu ELISA.	108
Rycina 34. Analiza stężenia OPN w supernatantach z różnicowanych komórek Th17 u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 w modelu przedmenopauzalnym..	110
Rycina 35. Strategia bramkowania komórek w analizie cytometrycznej blokowania receptorów (A) dla OPN w komórkach pochodzących ze śledziony oraz liczba komórek Th17 oznaczona spośród komórek CD4 ⁺ różnicowanych i nieróżnicowanych do limfocytów Th17 (B).....	113
Rycina 36. Wpływ zablokowania CD44, CD51 i CD29 na różnicowanie limfocytów Th17.....	114
Rycina 37. Podsumowanie wpływu leczenia kalcytriolem i takalcytolem na parametry związane z procesem nowotworowym oraz populację limfocytów	

Th17 i Treg w mysim przed- i pomenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego 4T1.....	133
Rycina 38. Podsumowanie wpływu leczenia kalcytriolem i takalcytolem na parametry związane z procesem nowotworowym oraz populację limfocytów Th17 i Treg w mysim przed- i pomenopauzalnym modelu raka gruczołu sutkowego 67NR.....	134

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Yuan, R. J. Norgard, and B. Z. Stanger, “Cellular plasticity in cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 7, pp. 837–851, 2019.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The Hallmarks of Cancer,” *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [3] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [4] D. Hanahan, “Hallmarks of Cancer: New Dimensions,” *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, 2022.
- [5] P. Nenclares and K. J. Harrington, “The biology of cancer,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 48, no. 2, pp. 67–72, 2020.
- [6] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021.
- [7] S. Zhong *et al.*, “Association between physical activity and mortality in breast cancer: A meta-analysis of cohort studies,” *Eur. J. Epidemiol.*, vol. 29, no. 6, pp. 391–404, 2014.
- [8] T. Nomura *et al.*, “Alcohol consumption and breast cancer prognosis after breast cancer diagnosis: a systematic review and meta-analysis of the Japanese Breast Cancer Society Clinical Practice Guideline, 2022 edition,” *Breast Cancer*, vol. 30, pp. 519–530, 2023.
- [9] R. B. Brown, P. Bigelow, J. A. Dubin, and E. Neiterman, “Breast cancer, alcohol, and phosphate toxicity,” *J. Appl. Toxicol.*, 2023.

- [10] M. Klintman *et al.*, “Postmenopausal overweight and breast cancer risk; results from the KARMA cohort,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 196, no. 1, pp. 185–196, 2022.
- [11] L. Chen *et al.*, “Impact of body mass index in therapeutic response for HER2 positive breast cancer treated with neoadjuvant targeted therapy: a multi-center study and meta-analysis,” *npj Breast Cancer*, vol. 9, no. 1, 2023.
- [12] C. Zhao *et al.*, “Current Landscape: The Mechanism and Therapeutic Impact of Obesity for Breast Cancer,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–20, 2021.
- [13] L. V. Farland *et al.*, “History of infertility and risk of breast cancer: a prospective cohort study,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 199, no. 1, pp. 185–193, 2023.
- [14] H. J. T. Coelingh Bennink *et al.*, “Progesterone from ovulatory menstrual cycles is an important cause of breast cancer,” *Breast Cancer Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–16, 2023.
- [15] M. Klintman *et al.*, “Postmenopausal overweight and breast cancer risk; results from the KARMA cohort,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 196, pp. 185–196, 2022.
- [16] E. E. Calle *et al.*, “Breast cancer and hormone replacement therapy: Collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer,” *Lancet*, vol. 350, no. 9084, pp. 1047–1059, Oct. 1997.
- [17] A. Fournier, F. Berrino, and F. Clavel-Chapelon, “Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: Results from the E3N cohort study,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 107, no. 1, pp. 103–111, 2008.
- [18] M. S. Wachtel, S. Yang, S. Dissanaik, and J. A. Margenthaler, “Hormone replacement therapy, likely neither angel nor demon,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, Sep. 2015.
- [19] K. Zbuk and S. S. Anand, “Declining incidence of breast cancer after decreased use of hormone-replacement therapy: Magnitude and time lags in different countries,” *J. Epidemiol. Community Health*, vol. 66, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [20] S. Shapiro, R. D. T. Farmer, J. C. Stevenson, H. G. Burger, A. O. Mueck, and A. Gompel, “Does hormone replacement therapy (HRT) cause breast cancer? An application of causal principles to three studies: Part 5. Trends in breast cancer incidence in relation to the use of HRT,” *J. Fam. Plan. Reprod. Heal. Care*, vol. 39, no. 2, pp. 80–88, Apr. 2013.

- [21] R. Allman *et al.*, “Validation of a breast cancer risk prediction model based on the key risk factors: family history, mammographic density and polygenic risk,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 198, pp. 335–347, 2023.
- [22] Z. Kleibl and V. N. Kristensen, “Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management,” *Breast*, vol. 28, pp. 136–144, 2016.
- [23] R. Singh and M. Nitesh Kumar Sain, “Etiology Of Breast Cancer,” *J. Pharm. Negat. Results*, vol. 14, pp. 1427–1434, Feb. 2023.
- [24] G. Cserni, E. Chmielik, B. Cserni, and T. Tot, “The new TNM-based staging of breast cancer,” *Virchows Arch.*, vol. 472, no. 5, pp. 697–703, 2018.
- [25] J. R. Benson, “The TNM staging system and breast cancer. Overview of the TNM system,” *Lancet Oncol.*, vol. 4, 2003.
- [26] M. Sawaki, T. Shien, and H. Iwata, “TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group),” *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 49, no. 3, pp. 228–231, 2019.
- [27] E. Nolan, G. J. Lindeman, and J. E. Visvader, “Deciphering breast cancer: from biology to the clinic,” *Cell*, vol. 186, no. 8, pp. 1708–1728, 2023.
- [28] J. Y. S. Tsang and G. M. Tse, “Molecular Classification of Breast Cancer,” *Adv. Anat. Pathol.*, vol. 27, no. 1, pp. 27–35, Jan. 2020.
- [29] J. Makki, “Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance,” *Clin. Med. Insights Pathol.*, vol. 8, no. 1, pp. 23–31, 2015.
- [30] R. G. do Nascimento and K. M. Otoni, “Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?,” *Mastology*, vol. 30, pp. 1–8, 2020.
- [31] G. Viale, “The current state of breast cancer classification,” *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. SUPPL. 10, pp. x207–x210, Sep. 2012.
- [32] R. M. Pommier *et al.*, “Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020.
- [33] M. Mego, S. A. Mani, and M. Cristofanilli, “Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 12, pp. 693–701, 2010.
- [34] M. Park, D. Kim, S. Ko, A. Kim, K. Mo, and H. Yoon, “Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 12, 2022.
- [35] B. Kinnel, S. K. Singh, G. Oprea-Ilie, and R. Singh, “Targeted Therapy and

- Mechanisms of Drug Resistance in Breast Cancer,” *Cancers (Basel)*., vol. 15, no. 4, pp. 515–517, 2023.
- [36] M. S. Brown, K. E. Muller, and D. R. Pattabiraman, “Quantifying the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) from Bench to Bedside,” *Cancers (Basel)*., vol. 14, no. 5, 2022.
- [37] J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Van Roy, and W. Birchmeier, “Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion,” *J. Cell Biol.*, vol. 108, no. 6, pp. 2435–2447, 1989.
- [38] M. J. C. Hendrix, E. A. Seftor, R. E. B. Seftor, and K. T. Trevor, “Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior,” *Am. J. Pathol.*, vol. 150, no. 2, pp. 483–495, 1997.
- [39] E. W. Thompson *et al.*, “Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 150, no. 3, pp. 534–544, 1992.
- [40] B. BOYER and J. P. THIERY, “Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity,” *Apmis*, vol. 101, no. 1–6, pp. 257–268, 1993.
- [41] L. Wang, S. Zhang, and X. Wang, “The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–21, 2021.
- [42] J. Kozłowski, A. Kozłowska, and J. Kocki, “Breast cancer metastasis - Insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon,” *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 69, pp. 447–451, 2015.
- [43] V. Jain *et al.*, “A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer,” *J. Control. Release*, vol. 326, no. April, pp. 628–647, 2020.
- [44] H. Kumar *et al.*, “A review of biological targets and therapeutic approaches in the management of triple-negative breast cancer,” *J. Adv. Res.*, Feb. 2023.
- [45] Y. Wang, Y. Wang, Y. Ren, Q. Zhang, P. Yi, and C. Cheng, “Metabolic modulation of immune checkpoints and novel therapeutic strategies in cancer,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 86, pp. 542–565, Nov. 2022.
- [46] J. Cortes *et al.*, “Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 387, no. 3, pp. 217–226, Jul. 2022.

- [47] P. Schmid *et al.*, “Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 386, no. 6, pp. 556–567, Feb. 2022.
- [48] V. Debien *et al.*, “Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives,” *npj Breast Cancer*, vol. 9, no. 1, 2023.
- [49] N. Zacharakis *et al.*, “Breast Cancers Are Immunogenic: Immunologic Analyses and a Phase II Pilot Clinical Trial Using Mutation-Reactive Autologous Lymphocytes,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 40, no. 16, pp. 1741–1754, Jun. 2022.
- [50] P. M. Dillon, J. Tushir-Singh, and L. G. Lum, “Bispecific antibodies for the treatment of breast cancer,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 22, no. 8, pp. 1017–1027, 2022.
- [51] R. A. Lam *et al.*, “Cancer-testis antigens in triple-negative breast cancer: Role and potential utility in clinical practice,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 15, Aug. 2021.
- [52] R. Thomas *et al.*, “NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: Current perspectives,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAY, May 2018.
- [53] B. Lu, E. Natarajan, H. R. Balaji Raghavendran, and U. D. Markandan, “Molecular Classification, Treatment, and Genetic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 22, no. 1, 2023.
- [54] R. Fawaz Abutayeh, “Role of vitamin D in targeting cancer and cancer stem cell populations and its therapeutic implications,” *Artic. Med. Oncol.*, 2022.
- [55] B. Gorimanipalli, R. Shetty, S. Sethu, and P. Khamar, “Vitamin D and eye: Current evidence and practice guidelines,” *Indian J. Ophthalmol.*, vol. 71, no. 4, pp. 1127–1134, 2023.
- [56] N. Alonso, · S Zelzer, · G Eibinger, and · M Herrmann, “Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 112, pp. 158–177, 2023.
- [57] D. D. Bikle and S. Francisco, “Vitamin D: an ancient hormone,” *Exp. Dermatol.*, vol. 20, no. 1, pp. 7–13, Jan. 2011.
- [58] L. Máčová and M. Bičíková, “Vitamin d: Current challenges between the laboratory and clinical practice,” *Nutrients*, vol. 13, no. 6, 2021.
- [59] A. Trochoutsou, V. Kloukina, K. Samitas, and G. Xanthou, “Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 15, no. 11, pp. 953–963, 2015.
- [60] M. F. Holick, L. Mazzei, S. García Menéndez, V. M. Martín Giménez, F. Al Anouti, and W. Manucha, “Genomic or Non-Genomic? A Question about the

- Pleiotropic Roles of Vitamin D in Inflammatory-Based Diseases,” *Nutrients*, vol. 15, no. 3, 2023.
- [61] N. S. Jensen, M. Wehland, P. M. Wise, and D. Grimm, “Latest Knowledge on the Role of Vitamin D in Hypertension,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 5, 2023.
 - [62] M. Henn, V. Martin-Gorgojo, and J. M. Martin-Moreno, *Vitamin D in Cancer Prevention: Gaps in Current Knowledge and Room for Hope*, vol. 14, no. 21. 2022.
 - [63] L. Díaz, M. Díaz-Muñoz, A. C. García-Gaytán, and I. Méndez, “Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology,” *Nutrients*, vol. 7, no. 6, pp. 5020–5050, 2015.
 - [64] S. Kuznia *et al.*, “Efficacy of vitamin D 3 supplementation on cancer mortality: Systematic review and individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials.”
 - [65] G. Seraphin, S. Rieger, M. Hewison, E. Capobianco, and T. S. Lisse, “The impact of vitamin D on cancer: A mini review,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 231, p. 106308, Jul. 2023.
 - [66] Y. Ma, L. Deng, Y. Huangfu, Y. Zhou, P. Wang, and L. Shen, “Adequate vitamin D level associated with reduced risk of sporadic colorectal cancer,” *Front. Nutr.*, vol. 10, no. January, pp. 1–9, 2023.
 - [67] D. H. Bak *et al.*, “Autophagy enhancement contributes to the synergistic effect of vitamin D in temozolomide-based glioblastoma chemotherapy,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 2153–2162, Jun. 2016.
 - [68] K. Łuczkowska, P. Kulig, B. Baumert, and B. Machaliński, “The Evidence That 25(OH)D3 and VK2 MK-7 Vitamins Influence the Proliferative Potential and Gene Expression Profiles of Multiple Myeloma Cells and the Development of Resistance to Bortezomib,” *Nutrients*, vol. 14, no. 23, Dec. 2022.
 - [69] Ö. Özgen *et al.*, “Vitamin D increases the efficacy of cisplatin on bladder cancer cell lines,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 50, no. 1, pp. 697–706, Jan. 2023.
 - [70] E. Capobianco, V. McGaughey, G. Seraphin, J. Heckel, S. Rieger, and T. S. Lisse, “Vitamin D inhibits osteosarcoma by reprogramming nonsense-mediated RNA decay and SNAI2-mediated epithelial-to-mesenchymal transition,” *Front. Oncol.*, vol. 13, p. 2023.01.04.522778, Mar. 2023.
 - [71] J. E. Welsh, “Vitamin D and breast cancer: Past and present,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 177, pp. 15–20, 2018.
 - [72] N. Lopes *et al.*, “Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in

- breast cancer progression: A study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions,” *BMC Cancer*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, Sep. 2010.
- [73] J. E. Welsh, “Function of the vitamin D endocrine system in mammary gland and breast cancer,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 453, pp. 88–95, 2017.
- [74] L. Huss *et al.*, “Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival,” *Breast Cancer Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–13, Jul. 2019.
- [75] J. Al-Azhri *et al.*, “Tumor expression of vitamin D receptor and breast cancer histopathological characteristics and prognosis,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 97–103, Jan. 2017.
- [76] N. Zhalehjoo, Y. Shakiba, and M. Panjehpour, “Gene expression profiles of CYP24A1 and CYP27B1 in malignant and normal breast tissues,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 15, no. 1, pp. 467–473, Jan. 2017.
- [77] J. Vanhevel, L. Verlinden, S. Doms, H. Wildiers, and A. Verstuyf, “The role of vitamin D in breast cancer risk and progression,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 29, no. 2, pp. R33–R55, Feb. 2022.
- [78] P. Płudowski *et al.*, “Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland,” *Nutrients*, vol. 15, no. 3, pp. 1–22, 2023.
- [79] B. Filip-Psurska, H. Zachary, A. Strzykalska, and J. Wietrzyk, “Vitamin D, Th17 Lymphocytes, and Breast Cancer,” *Cancers*, vol. 14, no. 15, MDPI, 01-Aug-2022.
- [80] K. Visvanathan *et al.*, “Circulating vitamin D and breast cancer risk: an international pooling project of 17 cohorts,” *Eur. J. Epidemiol.*, vol. 38, no. 1, pp. 11–29, 2023.
- [81] V. A. Vanoirbeek E., Krishnan A., Eelen I., Verlinden L., Bouillon R., Feldman D., “The Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of 1,25(OH)₂ D₃,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 4, pp. 593–604, 2011.
- [82] L. E. Tavera-Mendoza *et al.*, “Vitamin D receptor regulates autophagy in the normal mammary gland and in luminal breast cancer cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 11, pp. E2186–E2194, 2017.
- [83] M. Oshi *et al.*, “CD8 T cell score as a prognostic biomarker for triple negative breast cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 18, pp. 1–16, 2020.
- [84] E. Karkeni *et al.*, “Vitamin D controls tumor growth and CD8⁺ T Cell infiltration in breast cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JUN, pp. 1–12, 2019.
- [85] Y. Cao *et al.*, “Vitamin D aggravates breast cancer by inducing

- immunosuppression in the tumor bearing mouse,” *Immunotherapy*, vol. 10, no. 7, pp. 555–566, 2018.
- [86] A. Anisiewicz *et al.*, “Calcitriol analogues decrease lung metastasis but impair bone metabolism in aged ovariectomized mice bearing 4T1 mammary gland tumours,” *Aging Dis.*, vol. 10, no. 5, pp. 977–991, 2019.
 - [87] S. Swami *et al.*, “Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression in vivo,” *Horm. Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 190–202, 2011.
 - [88] M. J. Larriba, A. García De Herreros, and A. Muñoz, “Vitamin D and the Epithelial to Mesenchymal Transition,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, pp. 13–16, 2016.
 - [89] N. Lopes *et al.*, “1 α ,25-dihydroxyvitamin D 3 induces de novo E-cadherin expression in triple-negative breast cancer cells by CDH1-promoter demethylation,” *Anticancer Res.*, vol. 32, no. 1 PART 2, pp. 249–257, 2012.
 - [90] T. Wilmanski *et al.*, “1 α ,25-Dihydroxyvitamin D Inhibits the Metastatic Capability of MCF10CA1a and MDA-MB-231 Cells in an In Vitro Model of Breast to Bone Metastasis,” *Nutr. Cancer*, vol. 68, no. 7, pp. 1202–1209, 2016.
 - [91] A. Błachowicz and E. Franek, “Hiperkalcemia - przyczyny i leczenie,” *Chor. Serca i Naczyń*, vol. 2, no. 1, pp. 51–56, 2005.
 - [92] A. Kamińska and I. Bieroz, “Hiperkalciuria – najczęstsze zaburzenie metaboliczne u dzieci z kamica nerkową,” *Nowa Pediatr.*, vol. 2, no. 18, pp. 49–52, 2011.
 - [93] D. J. Obiol *et al.*, “Novel calcitriol analogue with an oxolane group: In vitro, in vivo, and in silico studies,” *Arch. Pharm. (Weinheim)*, vol. 352, no. 5, pp. 1–10, 2019.
 - [94] A. Cardús, S. Panizo, E. Parisi, E. Fernandez, and J. M. Valdivielso, “Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 860–866, 2007.
 - [95] A. Chrobak, C. Radzikowski, and A. Opolski, “Side-chain-modified analogs of calcitriol cause resistance of human HL-60 promyelocytic leukemia cells to drug-induced apoptosis,” *Steroids*, vol. 70, no. 1, pp. 19–27, 2005.
 - [96] Y. Nishii, “Rationale for active vitamin D and analogs in the treatment of osteoporosis,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, no. 2, pp. 381–386, 2003.
 - [97] S. Christakos, P. Dhawan, A. Verstuyf, L. Verlinden, and G. Carmeliet, “Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects,” *Physiol.*

- Rev., vol. 96, no. 1, pp. 365–408, 2015.
- [98] L. Cianferotti *et al.*, “The clinical use of vitamin D metabolites and their potential developments: a position statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF),” *Endocrine*, vol. 50, no. 1, pp. 12–26, 2015.
 - [99] C. Leyssens, L. Verlinden, and A. Verstuyf, “The future of vitamin D analogs,” *Front. Physiol.*, vol. 5 APR, 2014.
 - [100] Y. Ohyama and T. Shinki, “Calcitriol,” *Handb. Horm. Comp. Endocrinol. Basic Clin. Res.*, pp. 548,e97A-1-550,e97A-5, Jul. 2015.
 - [101] J. Bollerslev *et al.*, “European Society of Endocrinology Clinical Guideline: Treatment of chronic hypoparathyroidism in adults,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 173, no. 2, pp. G1–G20, Aug. 2015.
 - [102] T. R. J. Evans *et al.*, “A phase II trial of the vitamin D analogue seocalcitol (EB1089) in patients with inoperable pancreatic cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 86, no. 5, pp. 680–685, Feb. 2002.
 - [103] T. Gulliford, J. English, K. W. Colston, P. Menday, S. Moller, and R. C. Coombes, “A phase I study of the vitamin D analogue EB 1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 78, no. 1, p. 6, 1998.
 - [104] G. G. Schwartz, M. C. Hall, D. Stindt, S. Patton, J. Lovato, and F. M. Torti, “Phase I/II study of 19-nor-1 α -25-dihydroxyvitamin D₂ (paricalcitol) in advanced, androgen-insensitive prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 24, pp. 8680–8685, Dec. 2005.
 - [105] C. Leyssens, L. Verlinden, and A. Verstuyf, “Antineoplastic effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 20, no. 2, Apr. 2013.
 - [106] M. Bower *et al.*, “Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer,” *Lancet*, vol. 337, no. 8743, pp. 701–702, Mar. 1991.
 - [107] M. E. R. O’Brien, D. Talbot, K. MacLennan, and I. E. Smith, “Inefficacy of calcipotriol In skin metastases from breast cancer,” *Lancet*, vol. 342, no. 8877, p. 994, Oct. 1993.
 - [108] H. Kim *et al.*, “Calcipotriol, a synthetic Vitamin D analog, promotes antitumor immunity via CD4⁺T-dependent CTL/NK cell activation,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 154, p. 113553, Oct. 2022.

- [109] T. J. Cunningham *et al.*, “Randomized trial of calcipotriol combined with 5-fluorouracil for skin cancer precursor immunotherapy,” *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 1, pp. 106–116, Jan. 2017.
- [110] J. Wietrzyk *et al.*, “Toxicity and antineoplastic effect of (24R)-1,24-dihydroxyvitamin D₃ (PRI-2191),” *Steroids*, vol. 69, no. 10, pp. 629–635, 2004.
- [111] A. Kotlarz *et al.*, “Imatinib inhibits the regrowth of human colon cancer cells after treatment with 5-FU and cooperates with vitamin D analogue PRI-2191 in the downregulation of expression of stemness-related genes in 5-FU refractory cells,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 189, no. June 2018, pp. 48–62, 2019.
- [112] J. Wietrzyk, M. Chodyński, H. Fitak, E. Wojdat, A. Kutner, and A. Opolski, “Antitumor properties of diastereomeric and geometric analogs of vitamin D₃,” *Anticancer. Drugs*, vol. 18, no. 4, pp. 447–457, 2007.
- [113] S. Caputo and M. Bellone, “Osteopontin and the immune system: Another brick in the wall,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 15, no. 4, pp. 405–407, 2018.
- [114] E. Y. H. Lin, W. Xi, N. Aggarwal, and M. L. Shinohara, “Osteopontin (OPN)/SPP1: from its biochemistry to biological functions in the innate immune system and the central nervous system (CNS),” *Int. Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 171–180, 2023.
- [115] B. Christensen, M. S. Nielsen, K. F. Haselmann, T. E. Petersen, and E. S. Sørensen, “Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: Identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications,” *Biochem. J.*, vol. 390, no. 1, pp. 285–292, 2005.
- [116] Y. Kariya and Y. Kariya, “Osteopontin in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Targets,” *Int. J. Transl. Med.*, vol. 2, no. 3, pp. 419–447, Aug. 2022.
- [117] B. S. Ludwig, H. Kessler, S. Kossatz, and U. Reuning, “Rgd-binding integrins revisited: How recently discovered functions and novel synthetic ligands (re-)shape an ever-evolving field,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 7, 2021.
- [118] A. C. S. da F. Bastos, A. V. P. Gomes, G. R. Silva, M. Emerenciano, L. B. Ferreira, and E. R. P. Gimba, “The Intracellular and Secreted Sides of Osteopontin and Their Putative Physiopathological Roles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 3, 2023.
- [119] K. J. Bayless, G. A. Meininger, J. M. Scholtz, and G. E. Davis, “Osteopontin is a ligand for the $\alpha 4\beta 1$ integrin,” *J. Cell Sci.*, vol. 111, no. 9, pp. 1165–1174, 1998.
- [120] S. T. Barry, S. B. Ludbrook, E. Murrison, and C. M. T. Horgan, “Analysis of the $\alpha 4\beta 1$ integrin-osteopontin interaction,” *Exp. Cell Res.*, vol. 258, no. 2, pp. 342–

351, 2000.

- [121] R. Urtasun *et al.*, “Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin α V β 3 engagement and PI3K/pAkt/NF κ B signaling,” *Hepatology*, vol. 55, no. 2, pp. 594–608, 2012.
- [122] S. Kale, R. Raja, D. Thorat, G. Soundararajan, T. V Patil, and G. C. Kundu, “Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via α 9 β 1 integrin,” *Oncogene*, vol. 33, no. 18, pp. 2295–2306, 2014.
- [123] Q. Chen *et al.*, “Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts?,” *Cell Death Differ.*, vol. 23, no. 7, pp. 1128–1139, 2016.
- [124] C. Hao, J. Lane, and W. G. Jiang, “Osteopontin and Cancer: Insights into Its Role in Drug Resistance,” *Biomedicines*, vol. 11, no. 1, 2023.
- [125] Y. Sharon *et al.*, “Tumor-derived osteopontin reprograms normal mammary fibroblasts to promote inflammation and tumor growth in breast cancer,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 6, pp. 963–973, Mar. 2015.
- [126] J. Dai *et al.*, “Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells,” *Oncogene*, vol. 28, no. 38, pp. 3412–3422, 2009.
- [127] U. Mehraj, A. H. Dar, N. A. Wani, and M. A. Mir, “Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 87, no. 2, pp. 147–158, 2021.
- [128] Q. Wang *et al.*, “Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy,” *Cancer Med.*, vol. 12, no. 10, pp. 11149–11165, May 2023.
- [129] A. Kallingal, M. Olszewski, N. Maciejewska, W. Brankiewicz, and M. Baginski, “Cancer immune escape: the role of antigen presentation machinery,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 149, no. 3, pp. 8131–8141, 2023.
- [130] K. Dhatchinamoorthy, J. D. Colbert, and K. L. Rock, “Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation,” *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 636568, Mar. 2021.
- [131] M. Truffi, L. Sorrentino, and F. Corsi, “Fibroblasts in the Tumor Microenvironment,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1234, pp. 15–29, 2020.
- [132] N. M. Anderson and M. C. Simon, “The tumor microenvironment,” *Curr. Biol.*, vol. 30, no. 16, pp. R921–R925, Aug. 2020.
- [133] S. S. Onkar *et al.*, “The Great Immune Escape: Understanding the Divergent Immune Response in Breast Cancer Subtypes,” *Cancer Discov.*, vol. 13, no. 1, pp.

23–40, 2023.

- [134] A. Jewett *et al.*, “Natural Killer Cells: Diverse Functions in Tumor Immunity and Defects in Pre-neoplastic and Neoplastic Stages of Tumorigenesis,” *Mol. Ther. Oncolytics*, vol. 16, no. March, pp. 41–52, 2020.
- [135] N. Shimasaki, A. Jain, and D. Campana, “NK cells for cancer immunotherapy,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 19, no. 3, pp. 200–218, Mar. 2020.
- [136] A. Zgura, L. Gales, E. Bratila, R. Anghel, " Carol, and A. Trestioreanu, “Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Breast Cancer,” *Maedica A J. Clin. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 317–320, 2018.
- [137] K. M. Drescher and H. T. Lynch, “Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Lessons learned in 30 years of study,” *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, vol. 5, no. 3, pp. 149–166, 2005.
- [138] D. O. Adeegbe and H. Nishikawa, “Natural and induced T regulatory cells in cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. JUL, 2013.
- [139] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, “TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 7, pp. 145–173, 1989.
- [140] F. Y. Liew, “TH1 and TH2 cells: A historical perspective,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 1, pp. 55–60, 2002.
- [141] Z. Yao *et al.*, “Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor,” *Immunity*, vol. 3, no. 6, pp. 811–821, 1995.
- [142] E. Bettelli *et al.*, “Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells,” *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 235–238, 2006.
- [143] I. I. Ivanov *et al.*, “The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells,” *Cell*, vol. 126, no. 6, pp. 1121–1133, Sep. 2006.
- [144] P. R. Mangan *et al.*, “Transforming growth factor- β induces development of the T H17 lineage,” *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 231–234, 2006.
- [145] R. Nurieva *et al.*, “T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals,” *EMBO J.*, vol. 25, no. 11, pp. 2623–2633, 2006.
- [146] T. Korn *et al.*, “IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells,” *Nature*, vol. 448, no. 7152, pp. 484–487, 2007.
- [147] A. Brevi *et al.*, “Much More Than IL-17A: Cytokines of the IL-17 Family Between

- Microbiota and Cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. November, pp. 1–19, 2020.
- [148] T. Kuwabara, F. Ishikawa, M. Kondo, and T. Kakiuchi, “The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, 2017.
- [149] S. C. Edwards *et al.*, “A population of proinflammatory T cells coexpresses $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors in mice and humans,” *J. Exp. Med.*, vol. 217, no. 5, May 2020.
- [150] C. E. Sutton, S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle, and K. H. G. Mills, “Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity,” *Immunity*, vol. 31, no. 2, pp. 331–341, Aug. 2009.
- [151] B. Martin, K. Hirota, D. J. Cua, B. Stockinger, and M. Veldhoen, “Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals,” *Immunity*, vol. 31, no. 2, pp. 321–330, Aug. 2009.
- [152] M. L. Michel *et al.*, “Identification of an IL-17-producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia,” *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 5, pp. 995–1001, May 2007.
- [153] M. Monteiro, C. F. Almeida, A. Agua-Doce, and L. Graca, “Induced IL-17–Producing Invariant NKT Cells Require Activation in Presence of TGF- β and IL-1 β ,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 2, pp. 805–811, Jan. 2013.
- [154] H. Y. Kim *et al.*, “Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity,” *Nat. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 54–61, 2014.
- [155] L. Chen *et al.*, “IL-23 activates innate lymphoid cells to promote neonatal intestinal pathology,” *Mucosal Immunol.*, vol. 8, no. 2, pp. 390–402, Mar. 2015.
- [156] K. Reich *et al.*, “Bimekizumab versus Secukinumab in Plaque Psoriasis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 385, no. 2, pp. 142–152, 2021.
- [157] R. B. Warren *et al.*, “Bimekizumab versus Adalimumab in Plaque Psoriasis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 385, no. 2, pp. 130–141, 2021.
- [158] R. G. Langley *et al.*, “Secukinumab in Plaque Psoriasis — Results of Two Phase 3 Trials,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 4, pp. 326–338, 2014.
- [159] P. Zwicky, S. Unger, and B. Becher, “Targeting interleukin-17 in chronic inflammatory disease: A clinical perspective,” *J. Exp. Med.*, vol. 217, no. 1, pp. 1–16, 2020.
- [160] X. Su, J. Ye, E. C. Hsueh, Y. Zhang, D. F. Hoft, and G. Peng, “Tumor

- Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 3, pp. 1630–1641, 2010.
- [161] D. Chen *et al.*, “Chemokine/chemokine receptor interactions contribute to the accumulation of Th17 cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma,” *Hum. Immunol.*, vol. 73, no. 11, pp. 1068–1072, 2012.
- [162] J. Li *et al.*, “Tumor microenvironment macrophage inhibitory factor directs the accumulation of interleukin-17-producing tumor-infiltrating lymphocytes and predicts favorable survival in nasopharyngeal carcinoma patients,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 42, pp. 35484–35495, 2012.
- [163] Q. Yu, X. M. Lou, and Y. He, “Preferential recruitment of Th17 cells to cervical cancer via CCR6-CCL20 pathway,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, 2015.
- [164] X. Hu *et al.*, “Synthetic ROR γ agonists regulate multiple pathways to enhance antitumor immunity,” *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 12, 2016.
- [165] P. Muranski *et al.*, “Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature,” *Immunity*, vol. 35, no. 6, pp. 972–985, 2011.
- [166] I. Kryczek *et al.*, “Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments,” *Blood*, vol. 114, no. 6, pp. 1141–1149, 2009.
- [167] K. S. Sfanos *et al.*, “Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals T H17 and Treg skewing,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 11, pp. 3254–3261, 2008.
- [168] N. Martin-Orozco *et al.*, “T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity,” *Immunity*, vol. 31, no. 5, pp. 787–798, 2009.
- [169] H. M. Knochelmann *et al.*, “When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 15, no. 5, pp. 458–469, 2018.
- [170] L. Guéry and S. Hugues, “Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [171] M. D. Sharma *et al.*, “Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes,” *Blood*, vol. 113, no. 24, pp. 6102–6111, 2009.
- [172] P. Muranski *et al.*, “Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma,” *Blood*, vol. 112, no. 2, pp. 362–373, 2008.
- [173] L. Wang, Y. Zhang, and F. Xie, “T-regulatory cell/T helper 17 cell imbalance functions as prognostic biomarker of oral squamous cell carcinoma - CONSORT,”

Medicine (Baltimore)., vol. 99, no. 49, p. E23145, 2020.

- [174] F. M. Gu *et al.*, “IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma,” *Mol. Cancer*, vol. 10, pp. 1–13, 2011.
- [175] Y. Pan *et al.*, “The protective and pathogenic role of Th17 cell plasticity and function in the tumor microenvironment,” *Front. Immunol.*, vol. 14, 2023.
- [176] J. Li *et al.*, “Interleukin 17a promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression,” *PLoS One*, vol. 6, no. 7, 2011.
- [177] S. H. Chang *et al.*, “T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 15, pp. 5664–5669, Apr. 2014.
- [178] Y. Pan *et al.*, “The protective and pathogenic role of Th17 cell plasticity and function in the tumor microenvironment,” *Front. Immunol.*, vol. 14, p. 1192303, Jun. 2023.
- [179] J. Smolders *et al.*, “Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis,” *PLoS One*, vol. 4, no. 8, p. e6635, Aug. 2009.
- [180] J. Smolders *et al.*, “Safety and T cell modulating effects of high dose vitamin D3 supplementation in multiple sclerosis,” *PLoS One*, vol. 5, no. 12, p. e15235, 2010.
- [181] L. J. Jiang, Z. H. Rong, and H. F. Zhang, “The changes of Treg and Th17 cells relate to serum 25(OH)D in patients with initial-onset childhood systemic lupus erythematosus,” *Front. Pediatr.*, vol. 11, p. 1228112, 2023.
- [182] J. Ji, H. Zhai, H. Zhou, S. Song, G. Mor, and A. Liao, “The role and mechanism of vitamin D-mediated regulation of Treg/Th17 balance in recurrent pregnancy loss,” *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 81, no. 6, pp. 1–10, 2019.
- [183] L. E. Jeffery *et al.*, “1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 Combine to Inhibit T Cell Production of Inflammatory Cytokines and Promote Development of Regulatory T Cells Expressing CTLA-4 and FoxP3,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 9, pp. 5458–5467, Nov. 2009.
- [184] C. S. Bi *et al.*, “Calcitriol suppresses lipopolysaccharide-induced alveolar bone damage in rats by regulating T helper cell subset polarization,” *J. Periodontal Res.*, vol. 54, no. 6, pp. 612–623, 2019.
- [185] C. S. Bi *et al.*, “Calcitriol inhibits osteoclastogenesis in an inflammatory environment by changing the proportion and function of T helper cell subsets

- (Th2/Th17),” *Cell Prolif.*, vol. 53, no. 6, 2020.
- [186] F. E. Nashold, C. D. Nelson, L. M. Brown, and C. E. Hayes, “One calcitriol dose transiently increases Helios+FoxP3+ T cells and ameliorates autoimmune demyelinating disease,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 263, no. 1–2, pp. 64–74, 2013.
 - [187] S. Joshi *et al.*, “1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 17, pp. 3653–3669, 2011.
 - [188] S. H. Chang, Y. Chung, and C. Dong, “Vitamin D suppresses Th17 cytokine production by inducing C/EBP Homologous Protein (CHOP) expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 50, pp. 38751–38755, Dec. 2010.
 - [189] A. Pawlik *et al.*, “Calcitriol and its analogs establish the immunosuppressive microenvironment that drives metastasis in 4T1 mouse mammary gland cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 7, p. 2116, Jul. 2018.
 - [190] A. Pawlik *et al.*, “Divergent effect of tacalcitol (PRI-2191) on Th17 cells in 4T1 tumor bearing young and old ovariectomized mice,” *Aging Dis.*, vol. 11, no. 2, pp. 241–253, Mar. 2020.
 - [191] A. C. Renkl *et al.*, “Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype,” *Blood*, vol. 106, no. 3, pp. 946–955, Aug. 2005.
 - [192] M. L. Shinohara, M. Jansson, E. S. Hwang, M. B. F. Werneck, L. H. Glimcher, and H. Cantor, “T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 47, pp. 17101–17106, Nov. 2005.
 - [193] C. Gao, H. Guo, Z. Mi, P. Y. Wai, and P. C. Kuo, “Transcriptional Regulatory Functions of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein-U and -A/B in Endotoxin-Mediated Macrophage Expression of Osteopontin,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 1, pp. 523–530, Jul. 2005.
 - [194] M. Batten *et al.*, “Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 9, pp. 929–936, 2006.
 - [195] M. L. Shinohara *et al.*, “Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 5, pp. 498–506, 2006.
 - [196] A. Anisiewicz *et al.*, “Unfavorable effect of calcitriol and its low-calcemic analogs

- on metastasis of 4T1 mouse mammary gland cancer,” *Int. J. Oncol.*, vol. 52, no. 1, pp. 103–126, Jan. 2018.
- [197] Q. Zhao *et al.*, “IFN- β regulates Th17 differentiation partly through the inhibition of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Mol. Immunol.*, vol. 93, pp. 20–30, Jan. 2018.
- [198] W. L. Lau *et al.*, “Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet,” *Kidney Int.*, vol. 82, no. 12, pp. 1261–1270, Dec. 2012.
- [199] A. Schietinger, M. Philip, R. B. Liu, K. Schreiber, and H. Schreiber, “Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the effector phase,” *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 11, pp. 2469–2477, 2010.
- [200] J. Saravia, N. M. Chapman, and H. Chi, “Helper T cell differentiation,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 16, no. 7, pp. 634–643, Jul. 2019.
- [201] A. Basu *et al.*, “Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy,” *Front. Immunol.*, vol. 12, no. May, p. 669474, 2021.
- [202] K. J. Oestreich, A. C. Huang, and A. S. Weinmann, “The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns,” *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 5, pp. 1001–1013, May 2011.
- [203] M. Afkarian *et al.*, “T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 6, pp. 549–557, 2002.
- [204] V. Lazarevic *et al.*, “T-bet represses TH 17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 96–104, 2011.
- [205] L. Showalter, B. J. Czerniecki, and G. K. Koski, “Th1 cytokines in conjunction with pharmacological Akt inhibition potentiate apoptosis of breast cancer cells in vitro and suppress tumor growth in vivo,” *Oncotarget*, vol. 11, no. 30, pp. 2873–2888, 2020.
- [206] S. Schober *et al.*, “Th1 cytokines in pediatric acute lymphoblastic leukemia,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 72, no. 11, pp. 3621–3634, Nov. 2023.
- [207] X. Xu, X. Y. Fu, J. Plate, and A. S. F. Chong, “IFN- γ induces cell growth inhibition by fas-mediated apoptosis: Requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression,” *Cancer Research*, 1998. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9661898/>. [Accessed: 04-Apr-2024].
- [208] H. F. Aqbi, M. Wallace, S. Sappal, K. K. Payne, and M. H. Manjili, “IFN- γ

- orchestrates tumor elimination, tumor dormancy, tumor escape, and progression,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 103, no. 6, pp. 1219–1223, Jun. 2018.
- [209] J. Eyles *et al.*, “Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma,” *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 6, pp. 2030–2039, Jun. 2010.
- [210] W. E. Paul and J. Zhu, “How are TH2-type immune responses initiated and amplified?,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 4, pp. 225–235, Apr. 2010.
- [211] J. A. Walker and A. N. J. McKenzie, “TH2 cell development and function,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 121–133, 2018.
- [212] E. Martynova, A. Rizvanov, R. A. Urbanowicz, and S. Khaiboullina, “Inflammasome Contribution to the Activation of Th1, Th2, and Th17 Immune Responses,” *Front. Microbiol.*, vol. 13, Mar. 2022.
- [213] T. Nakayama *et al.*, “Th2 cells in health and disease,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 35, pp. 53–84, Apr. 2017.
- [214] M. Mateu-Jimenez *et al.*, “Systemic and Tumor Th1 and Th2 Inflammatory Profile and Macrophages in Lung Cancer: Influence of Underlying Chronic Respiratory Disease,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 2, pp. 235–248, Feb. 2017.
- [215] R. F. Gabitass, N. E. Annels, D. D. Stocken, H. A. Pandha, and G. W. Middleton, “Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 10, pp. 1419–1430, Oct. 2011.
- [216] P. Gaur, A. K. Singh, N. K. Shukla, and S. N. Das, “Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance,” *Hum. Immunol.*, vol. 75, no. 4, pp. 330–337, 2014.
- [217] L. Fauchaux *et al.*, “A multivariate Th17 metagene for prognostic stratification in T cell non-inflamed triple negative breast cancer,” *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 9, Sep. 2019.
- [218] V. N. Kristensen *et al.*, “Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma in situ (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 8, pp. 2802–2807, 2012.
- [219] J. A. Espinoza *et al.*, “Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics,” *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 12, Dec. 2016.

- [220] X. Chen *et al.*, “Th1-, Th2-, and Th17-associated cytokine expression in hypopharyngeal carcinoma and clinical significance,” *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 273, no. 2, pp. 431–438, 2016.
- [221] Q. Zhang *et al.*, “CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 20, pp. 4312–4321, 2015.
- [222] L. Simson *et al.*, “Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 7, pp. 4222–4229, Apr. 2007.
- [223] M. Ikutani *et al.*, “Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity,” *J. Immunol.*, vol. 188, no. 2, pp. 703–713, Jan. 2012.
- [224] S. Jia, W. Li, P. Liu, and L. X. Xu, “A role of eosinophils in mediating the anti-tumour effect of cryo-thermal treatment,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, Sep. 2019.
- [225] D. Jacenik, I. Karagiannidis, and E. J. Beswick, “Th2 cells inhibit growth of colon and pancreas cancers by promoting anti-tumorigenic responses from macrophages and eosinophils,” *Br. J. Cancer*, vol. 128, no. 2, pp. 387–397, 2023.
- [226] W. F. Ng *et al.*, “Human CD4+CD25+ cells: A naturally occurring population of regulatory T cells,” *Blood*, vol. 98, no. 9, pp. 2736–2744, Nov. 2001.
- [227] C. Baecher-Allan, J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler, “CD4+CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 1245–1253, Aug. 2001.
- [228] M. K. Levings, R. Sangregorio, and M. G. Roncarolo, “Human CD25+CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function,” *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 11, pp. 1295–1301, Jun. 2001.
- [229] F. Roth-Walter *et al.*, “Immune modulation via T regulatory cell enhancement: Disease-modifying therapies for autoimmunity and their potential for chronic allergic and inflammatory diseases—An EAACI position paper of the Task Force on Immunopharmacology (TIPCO),” *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 76, no. 1, pp. 90–113, Jan. 2021.
- [230] C. Scheinecker, L. Göschl, and M. Bonelli, “Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis,” *J. Autoimmun.*, vol. 110, no. November, p. 102376, 2020.

- [231] J. H. Esensten, Y. D. Muller, J. A. Bluestone, and Q. Tang, “Regulatory T-cell therapy for autoimmune and autoinflammatory diseases: The next frontier,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 142, no. 6, pp. 1710–1718, 2018.
- [232] A. Tanaka and S. Sakaguchi, “Regulatory T cells in cancer immunotherapy,” *Cell Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 109–118, 2017.
- [233] E. Elkord, E. M. Alcantar-Orozco, S. J. Dovedi, D. Q. Tran, R. E. Hawkins, and D. E. Gilham, “T regulatory cells in cancer: Recent advances and therapeutic potential,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, no. 11, pp. 1573–1586, 2010.
- [234] M. Noack and P. Miossec, “Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 13, no. 6, pp. 668–677, 2014.
- [235] J. M. Moreau, M. Velegraki, C. Bolyard, M. D. Rosenblum, and Z. Li, “Transforming growth factor- β 1 in regulatory T cell biology,” *Sci. Immunol.*, vol. 7, no. 69, p. eabi4613, Mar. 2022.
- [236] D. Marshall, C. Sinclair, S. Tung, and B. Seddon, “Differential Requirement for IL-2 and IL-15 during Bifurcated Development of Thymic Regulatory T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 11, pp. 5525–5533, Dec. 2014.
- [237] A. Facciabene, G. T. Motz, and G. Coukos, “T-Regulatory cells: Key players in tumor immune escape and angiogenesis,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 9, pp. 2162–2171, 2012.
- [238] S. E. Erdman *et al.*, “CD4⁺ CD25⁺ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice,” *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 2, pp. 691–702, Feb. 2003.
- [239] S. Ladoire, F. Martin, and F. Ghiringhelli, “Prognostic role of FOXP3⁺ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 7, pp. 909–918, 2011.
- [240] A. Echarti *et al.*, “Cd8⁺ and regulatory T cells differentiate tumor immune phenotypes and predict survival in locally advanced head and neck cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 9, p. 1398, Sep. 2019.
- [241] D. S. Sun, M. Q. Zhao, M. Xia, L. Li, and Y. H. Jiang, “The correlation between tumor-infiltrating Foxp3⁺ regulatory T cells and cyclooxygenase-2 expression and their association with recurrence in resected head and neck cancers,” *Med. Oncol.*, vol. 29, no. 2, pp. 707–713, 2012.
- [242] B. Shang, Y. Liu, S. J. Jiang, and Y. Liu, “Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis,” *Sci.*

Rep., vol. 5, Oct. 2015.

- [243] R. J. DeLeeuw, S. E. Kost, J. A. Kakal, and B. H. Nelson, “The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: A critical review of the literature,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 11, pp. 3022–3029, Jun. 2012.
- [244] E. J. Sayour *et al.*, “Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 64, no. 4, pp. 419–427, 2015.
- [245] M. TAKENAKA *et al.*, “FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis,” *Mol. Clin. Oncol.*, vol. 1, no. 4, pp. 625–632, Jul. 2013.
- [246] F. Liotta *et al.*, “Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma,” *BJU Int.*, vol. 107, no. 9, pp. 1500–1506, 2011.
- [247] F. Li, Y. Sun, J. Huang, W. Xu, J. Liu, and Z. Yuan, “CD4/CD8 + T cells, DC subsets, Foxp3, and IDO expression are predictive indicators of gastric cancer prognosis,” *Cancer Med.*, vol. 8, no. 17, pp. 7330–7344, Dec. 2019.
- [248] D. Wolf *et al.*, “The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 23, pp. 8326–8331, 2005.
- [249] A. M. Miller *et al.*, “CD4+CD25high T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 7398–7405, Nov. 2006.
- [250] B. A. Pulaski and S. Ostrand-Rosenberg, “Mouse 4T1 Breast Tumor Model,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–16, 2000.
- [251] C. N. Johnstone *et al.*, “Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer,” *DMM Dis. Model. Mech.*, vol. 8, no. 3, pp. 237–251, Mar. 2015.
- [252] M. Kuczman *et al.*, “Foxp3-Deficient Regulatory T Cells Do Not Revert into Conventional Effector CD4+ T Cells but Constitute a Unique Cell Subset,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 6, pp. 3731–3741, 2009.
- [253] J. F. Rodríguez-Landa, “Considerations of Timing Post-ovariectomy in Mice and Rats in Studying Anxiety- and Depression-Like Behaviors Associated With

- Surgical Menopause in Women,” *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 16, p. 829274, 2022.
- [254] K. Durak *et al.*, “De Ritis Ratio to Predict Clinical Outcomes of Intermediate- and High-Risk Pulmonary Embolisms,” *J. Clin. Med.*, vol. 13, no. 7, 2024.
- [255] F. C. Garland, C. F. Garland, E. D. Gorham, and J. F. Young, “Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: A hypothesis involving exposure to solar radiation,” *Prev. Med. (Baltim.)*, vol. 19, no. 6, pp. 614–622, 1990.
- [256] Y. Kim *et al.*, “Plasma 25-hydroxyvitamin D3 is associated with decreased risk of postmenopausal breast cancer in whites: A nested case-control study in the multiethnic cohort study,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, Jan. 2014.
- [257] P. Engel *et al.*, “Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: A nested case-control study from the French E3N cohort,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 19, no. 9, pp. 2341–2350, 2010.
- [258] M. L. McCullough *et al.*, “Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and postmenopausal breast cancer risk: A nested case control study in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort,” *Breast Cancer Res.*, vol. 11, no. 4, 2009.
- [259] D. M. Freedman *et al.*, “Serum levels of vitamin D metabolites and breast cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 17, no. 4, pp. 889–894, Apr. 2008.
- [260] S. Scarmo *et al.*, “Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: A nested case-control study,” *Breast Cancer Res.*, vol. 15, no. 1, 2013.
- [261] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, and K. W. Kinzler, “Cancer genome landscapes,” *Science (80-.)*, vol. 340, no. 6127, pp. 1546–1558, Mar. 2013.
- [262] A. V. Krishnan, S. Swami, and D. Feldman, “Vitamin D and breast cancer: Inhibition of estrogen synthesis and signaling,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 121, no. 1–2, pp. 343–348, 2010.
- [263] M. Ghosh, M. Rodriguez-Garcia, and C. R. Wira, “The immune system in menopause: Pros and cons of hormone therapy,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 142, pp. 171–175, 2014.
- [264] M. C. Agahozo, D. Hammerl, R. Debets, M. Kok, and C. H. M. van Deurzen, “Tumor-infiltrating lymphocytes and ductal carcinoma in situ of the breast: friends or foes?,” *Mod. Pathol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1012–1025, Jul. 2018.

- [265] A. Anisiewicz, A. Pawlik, B. Filip-Psurska, and J. Wietrzyk, “Differential impact of calcitriol and its analogs on tumor stroma in young and aged ovariectomized mice bearing 4t1 mammary gland cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 17, pp. 1–24, Sep. 2020.
- [266] M. Stachowicz-Suhs *et al.*, “Calcitriol promotes M2 polarization of tumor-associated macrophages in 4T1 mouse mammary gland cancer via the induction of proinflammatory cytokines,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–20, Feb. 2024.
- [267] H. Dong *et al.*, “Vitamin D and Its Receptors in Cervical Cancer,” *J. Cancer*, vol. 15, no. 4, pp. 926–938, 2024.
- [268] Y. Zhang *et al.*, “VDR status arbitrates the prometastatic effects of tumor-associated macrophages,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 12, no. 8, pp. 1181–1191, 2014.
- [269] H. Lindgren, D. Ademi, C. Godina, H. Tryggvadottir, K. Isaksson, and H. Jernström, “Potential interplay between tumor size and vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in breast cancer prognosis: a prospective cohort study,” *Cancer Causes Control*, vol. 35, pp. 907–919, 2024.
- [270] J. D. Williams *et al.*, “Tumor autonomous effects of Vitamin D deficiency promote breast cancer metastasis,” *Endocrinology*, vol. 157, no. 4, pp. 1341–1347, 2016.
- [271] K. Horas *et al.*, “Loss of the Vitamin D Receptor in Human Breast Cancer Cells Promotes Epithelial to Mesenchymal Cell Transition and Skeletal Colonization,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 34, no. 9, pp. 1721–1732, Sep. 2019.
- [272] J. D. Williams *et al.*, “Tumor autonomous effects of Vitamin D deficiency promote breast cancer metastasis,” *Endocrinology*, vol. 157, no. 4, pp. 1341–1347, Apr. 2016.
- [273] Q. X. Shang *et al.*, “Vitamin D receptor induces oxidative stress to promote esophageal squamous cell carcinoma proliferation via the p53 signaling pathway,” *Heliyon*, vol. 10, no. 1, p. e23832, Jan. 2024.
- [274] J. Tang *et al.*, “Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 8, pp. 4624–4632, 2009.
- [275] S. Najafi and A. Mirshafiey, “The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment,” *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 41, no. 1, pp. 16–24, 2019.
- [276] K. Nistala *et al.*, “Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 33, pp.

14751–14756, Aug. 2010.

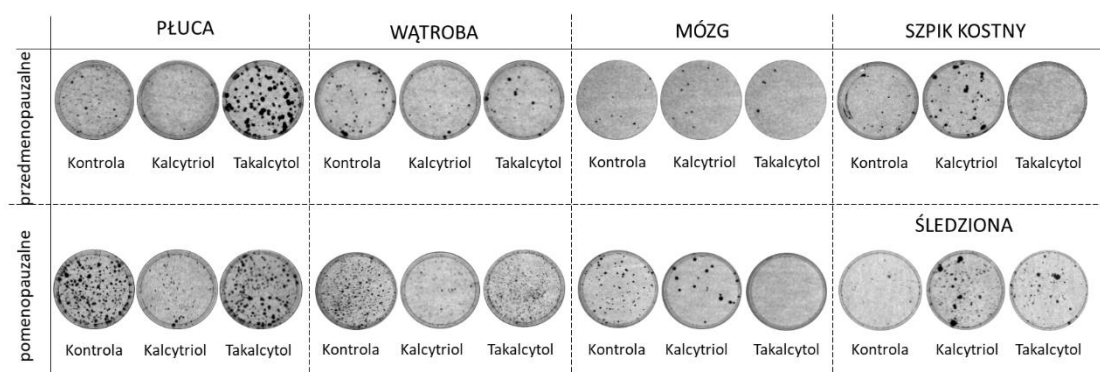
- [277] Y. Zhang *et al.*, “Immune Cell Production of Interleukin 17 Induces Stem Cell Features of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Cells,” *Gastroenterology*, vol. 155, no. 1, pp. 210–223.e3, 2018.
- [278] G. Cui, Z. Li, J. Florholmen, and R. Goll, “Dynamic stromal cellular reaction throughout human colorectal adenoma-carcinoma sequence: A role of TH17/IL-17A,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 140, Aug. 2021.
- [279] M. L. Ortiz *et al.*, “Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4⁺ T cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 3, pp. 351–367, Mar. 2015.
- [280] T. Xiang *et al.*, “Interleukin-17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of CD133 + cancer stem-like cells in ovarian cancer,” *Oncogene*, vol. 34, no. 2, pp. 165–176, 2015.
- [281] K. Majchrzak *et al.*, “Exploiting IL-17-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells to improve cancer immunotherapy in the clinic,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 65, no. 3, pp. 247–259, Mar. 2016.
- [282] R. Chahardoli *et al.*, “Alterations in CD4⁺ T Cell Cytokines Profile in Female Patients with Hashimoto’s Thyroiditis Following Vitamin D Supplementation: A Double-blind, Randomized Clinical Trial,” *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets*, vol. 24, pp. 1–10, 2024.
- [283] B. Naghavi Gargari, M. Behmanesh, Z. Shirvani Farsani, M. Pahlevan Kakhki, and A. R. Azimi, “Vitamin D supplementation up-regulates IL-6 and IL-17A gene expression in multiple sclerosis patients,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 28, no. 1, pp. 414–419, 2015.
- [284] R. Hashemi, S. S. Hosseini-Asl, S. R. Arefhosseini, and M. Morshedi, “The impact of Vitamin D3 intake on inflammatory markers in multiple sclerosis patients and their first-degree relatives,” *PLoS One*, vol. 15, no. 4, 2020.
- [285] E. M. Colin *et al.*, “1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 1, pp. 132–142, Jan. 2010.
- [286] X. Qian *et al.*, “Increased Th17 Cells in the Tumor Microenvironment Is Mediated by IL-23 via Tumor-Secreted Prostaglandin E2,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 11, pp. 5894–5902, Jun. 2013.
- [287] A. C. Monteiro and A. Bonomo, “CD8⁺ T cells from experimental in situ breast

- carcinoma interfere with bone homeostasis,” *Bone*, vol. 150, no. May, p. 116014, 2021.
- [288] M. Rincón, R. A. Flavell, and R. A. Davis, “The JNK and p38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 28, no. 9, pp. 1328–1337, 2000.
- [289] C. F. Brereton, C. E. Sutton, S. J. Lalor, E. C. Lavelle, and K. H. G. Mills, “Inhibition of ERK MAPK Suppresses IL-23- and IL-1-Driven IL-17 Production and Attenuates Autoimmune Disease,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 3, pp. 1715–1723, Aug. 2009.
- [290] G. Cui, X. Qin, Y. Zhang, Z. Gong, B. Ge, and Y. Q. Zang, “Berberine differentially modulates the activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to suppress Th17 and Th1 T cell differentiation in type 1 diabetic mice,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 41, pp. 28420–28429, Oct. 2009.
- [291] Ubaid Ullah *et al.*, “Transcriptional Repressor HIC1 Contributes to Suppressive Function of Human Induced Regulatory T Cells,” *Cell Rep.*, vol. 22, no. 8, pp. 2094–2106, Feb. 2018.
- [292] M. Ciofani *et al.*, “A validated regulatory network for Th17 cell specification,” *Cell*, vol. 151, no. 2, pp. 289–303, Oct. 2012.
- [293] S. Tuomela *et al.*, “Comparative analysis of human and mouse transcriptomes of Th17 cell priming,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 12, pp. 13416–13428, 2016.
- [294] R. Wang *et al.*, “Genetic and pharmacological inhibition of the nuclear receptor ROR α regulates TH17 driven inflammatory disorders,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, 2021.
- [295] Z. Janjetovic *et al.*, “Novel Vitamin D3 Hydroxymetabolites Require Involvement of the Vitamin D Receptor or Retinoic Acid-Related Orphan Receptors for Their Antifibrogenic Activities in Human Fibroblasts,” *Cells*, vol. 13, no. 3, 2024.
- [296] L. Benevides *et al.*, “IL17 promotes mammary tumor progression by changing the behavior of tumor cells and eliciting tumorigenic neutrophils recruitment,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 18, pp. 3788–3799, Sep. 2015.
- [297] J. W. Du, K. Y. Xu, L. Y. Fang, and X. L. Qi, “Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 6, no. 5, pp. 1099–1102, Nov. 2012.
- [298] J. Liu *et al.*, “IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma,”

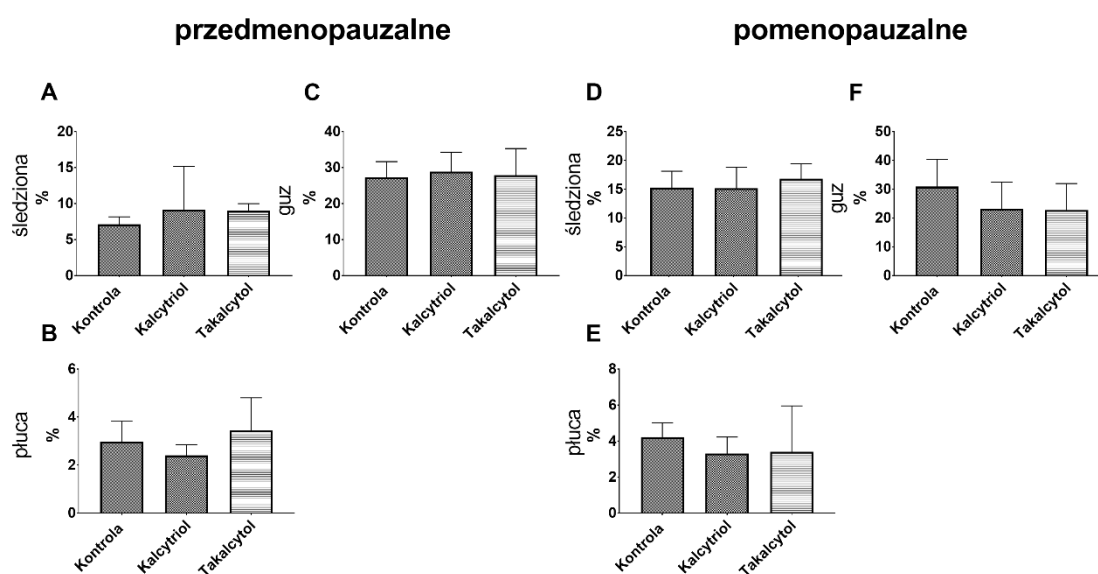
- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 407, no. 2, pp. 348–354, 2011.
- [299] B. Pan *et al.*, “Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 5, Nov. 2015.
- [300] M. Numasaki *et al.*, “IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity and In Vivo Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice through Promoting CXCR-2-Dependent Angiogenesis,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 9, pp. 6177–6189, Nov. 2005.
- [301] Y. Ma *et al.*, “1,25(OH)₂D₃ improves diabetic wound healing by modulating inflammation and promoting angiogenesis,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 239, p. 106477, May 2024.
- [302] B. Y. Bao, J. Yao, and Y. F. Lee, “1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis,” *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 9, pp. 1883–1893, Sep. 2006.
- [303] A. Kotlarz *et al.*, “Differential interference of vitamin D analogs PRI-1906, PRI-2191, and PRI-2205 with the renewal of human colon cancer cells refractory to treatment with 5-fluorouracil,” *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. 4699–4709, 2016.
- [304] I. Chung *et al.*, “Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 3, pp. 967–975, 2009.
- [305] S. Downs-Canner *et al.*, “Suppressive IL-17A⁺ Foxp3⁺ and ex-Th17 IL-17Aneg Foxp3⁺ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells,” *Nat. Commun.*, vol. 8, Mar. 2017.
- [306] W. Lin *et al.*, “Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 12, no. 9, pp. 3604–3612, 2019.
- [307] F. M. J. Hafkamp, E. W. M. Taanman-Kueter, T. M. M. van Capel, T. G. Kormelink, and E. C. de Jong, “Vitamin D₃ Priming of Dendritic Cells Shifts Human Neutrophil-Dependent Th17 Cell Development to Regulatory T Cells,” *Front. Immunol.*, vol. 13, Jul. 2022.
- [308] E. S. Chambers *et al.*, “1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in combination with transforming growth factor- β increases the frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2,” *Immunology*, vol. 143, no. 1, pp. 52–60, 2014.

- [309] Q. Zhou, S. Qin, J. Zhang, L. Zhon, Z. Pen, and T. Xing, “1,25(OH)2D3 induces regulatory T cell differentiation by influencing the VDR/PLC- γ 1/TGF- β 1/pathway,” *Mol. Immunol.*, vol. 91, pp. 156–164, Nov. 2017.
- [310] D. Iturbe-Fernández *et al.*, “Osteopontin as a Biomarker in Interstitial Lung Diseases,” *Biomedicines*, vol. 12, no. 5, p. 1108, 2024.
- [311] H. R. Moorman, D. Poschel, J. D. Klement, C. Lu, P. S. Redd, and K. Liu, “Osteopontin: A key regulator of tumor progression and immunomodulation,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 1–31, Nov. 2020.
- [312] G. Chen *et al.*, “Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 10, pp. 2900–2908, 2010.
- [313] M. H. Santamaría and R. S. Corral, “Osteopontin-dependent regulation of Th1 and Th17 cytokine responses in Trypanosoma cruzi-infected C57BL/6 mice,” *Cytokine*, vol. 61, no. 2, pp. 491–498, 2013.
- [314] K. Noto, K. Kato, K. Okumura, and H. Yagita, “Identification and functional characterization of mouse CD29 with a mAb,” *Int. Immunol.*, vol. 7, no. 5, pp. 835–842, 1995.
- [315] T. Sato *et al.*, “Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn’s disease regulates the Th1 immune response,” *Gut*, vol. 54, no. 9, pp. 1254–1262, 2005.
- [316] D. Funken *et al.*, “In situ targeting of dendritic cells sets tolerogenic environment and ameliorates CD4⁺ T-cell response in the postischemic liver,” *FASEB J.*, vol. 31, no. 11, pp. 4796–4808, 2017.
- [317] S. Katoh *et al.*, “CD44 is critical for airway accumulation of antigen-specific Th2, but not Th1, cells induced by antigen challenge in mice,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 11, pp. 3198–3207, Nov. 2011.

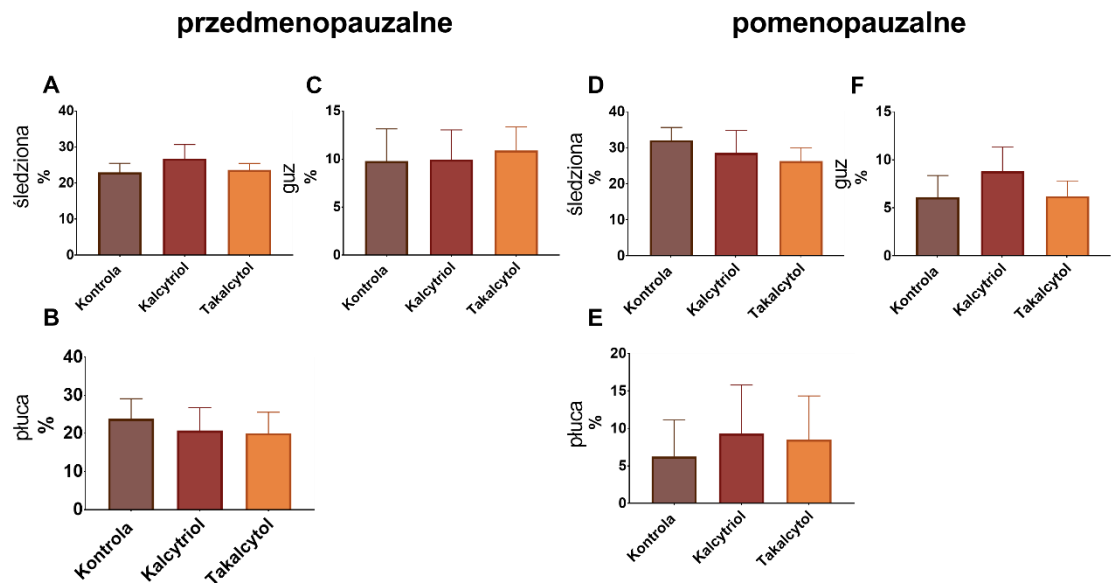
SUPLEMENT



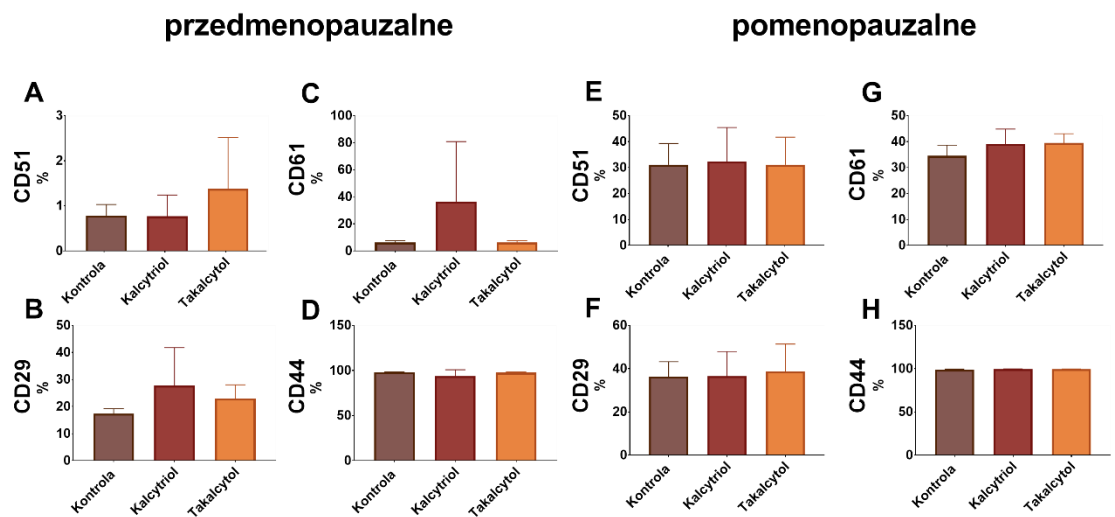
Rycina S - 1 Reprezentatywne zdjęcia klonów komórek nowotworowych wyhodowanych z różnych narządów i będących skutkiem przerzutowania komórek 4T1 do tkanek odległych u myszy z modelu przedmenopauzalnego i pomenopauzalnego.



Rycina S - 2 Analiza odsetka komórek stanowiących frakcję limfocytów T regulatorowych w komórkach pochodzących z śledziony (A i D), płuc (B i E) i guza (C i F) z modelu przed- i pomenopauzalnego raka 67NR. Oznaczenia dotyczące krwi zostały przeprowadzone na frakcji mononuklearnej (PBMC). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.

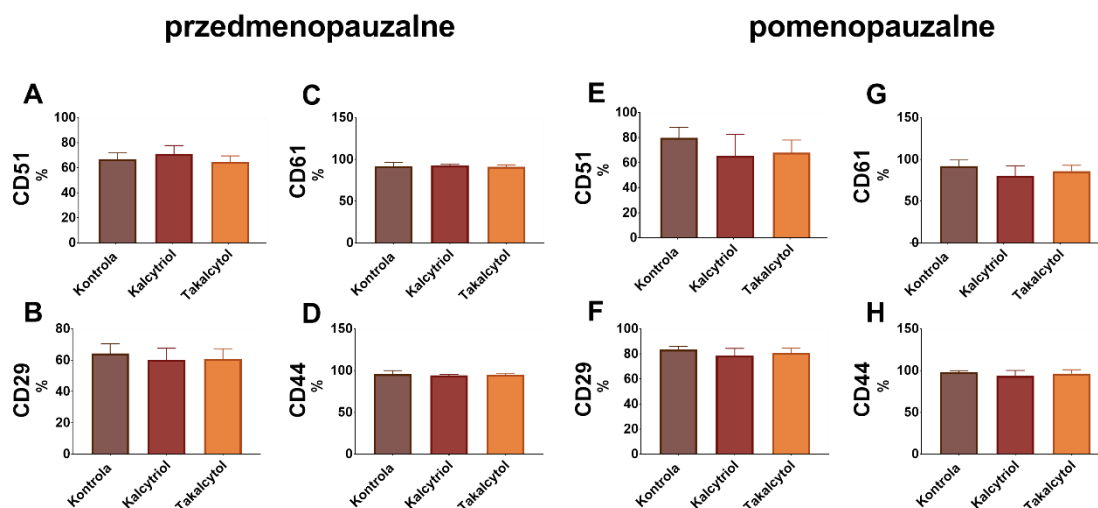


Rycina S - 3. Analiza odsetka komórek stanowiących frakcję limfocytów T pomocniczych (CD3⁺CD4⁺) w komórkach pochodzących ze śledziony (A i D), płuc (B i E) i guza (C i F) z modelu raka gruczołu sutkowego 67NR, przed- i pomenopauzalnego. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.

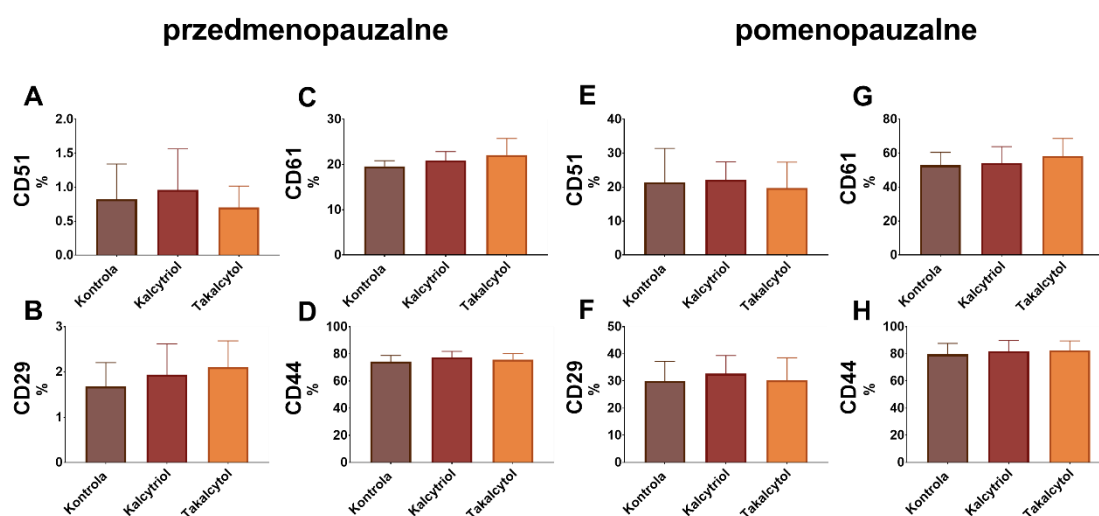


Rycina S - 4. Identyfikacja receptorów dla osteopontyny na powierzchni komórek CD3⁺CD4⁺ pochodzących ze śledziony u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym. W analizie cytometrycznej skupiono się na oznaczeniu receptorów

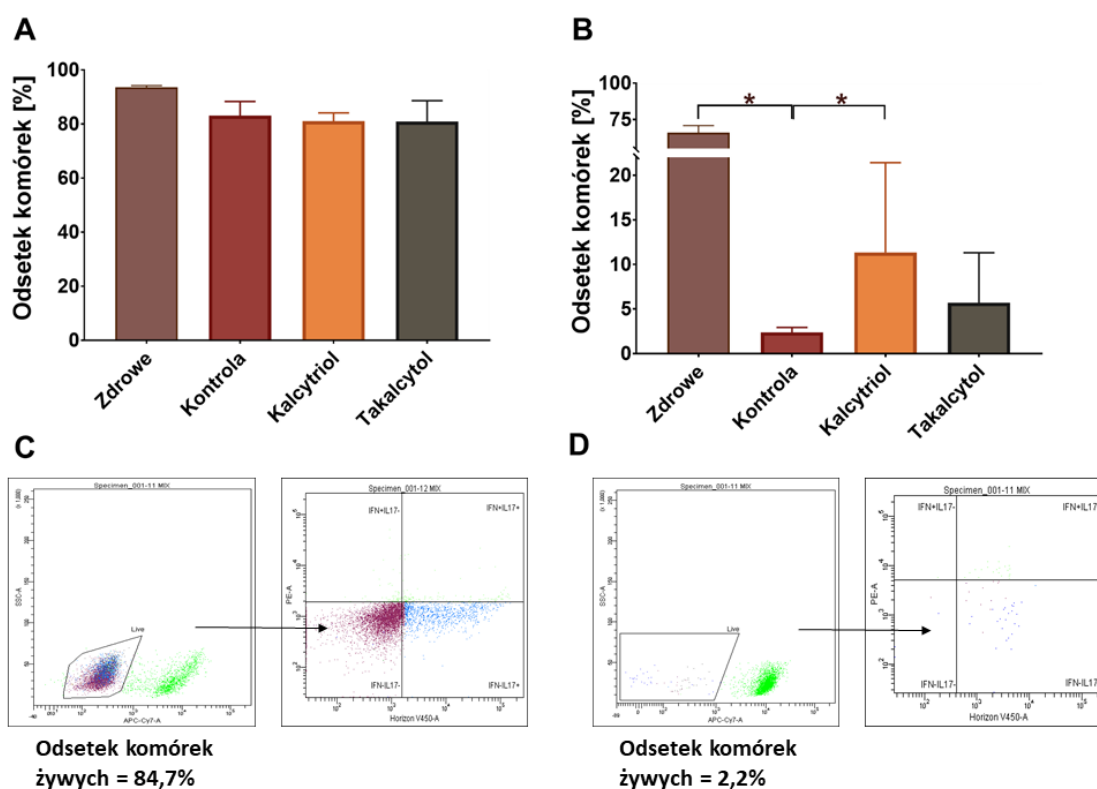
oddziałujących z osteopontyną ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.



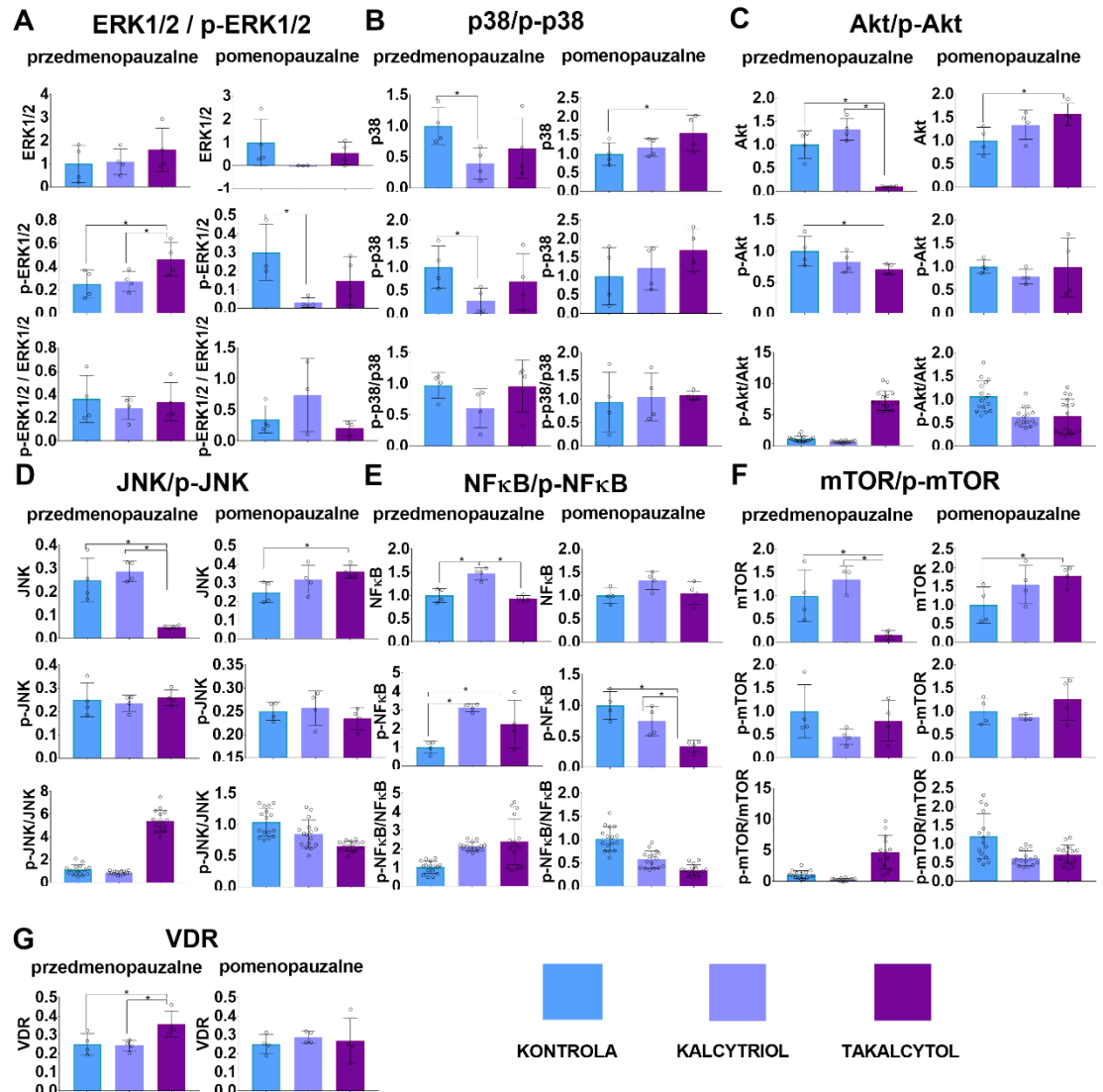
Rycina S - 5. Analiza poziomu receptorów dla osteopontyny na powierzchni komórek CD3⁺CD4⁺ pochodzących z guzów u myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z osteopontyną ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3⁺CD4⁺). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.



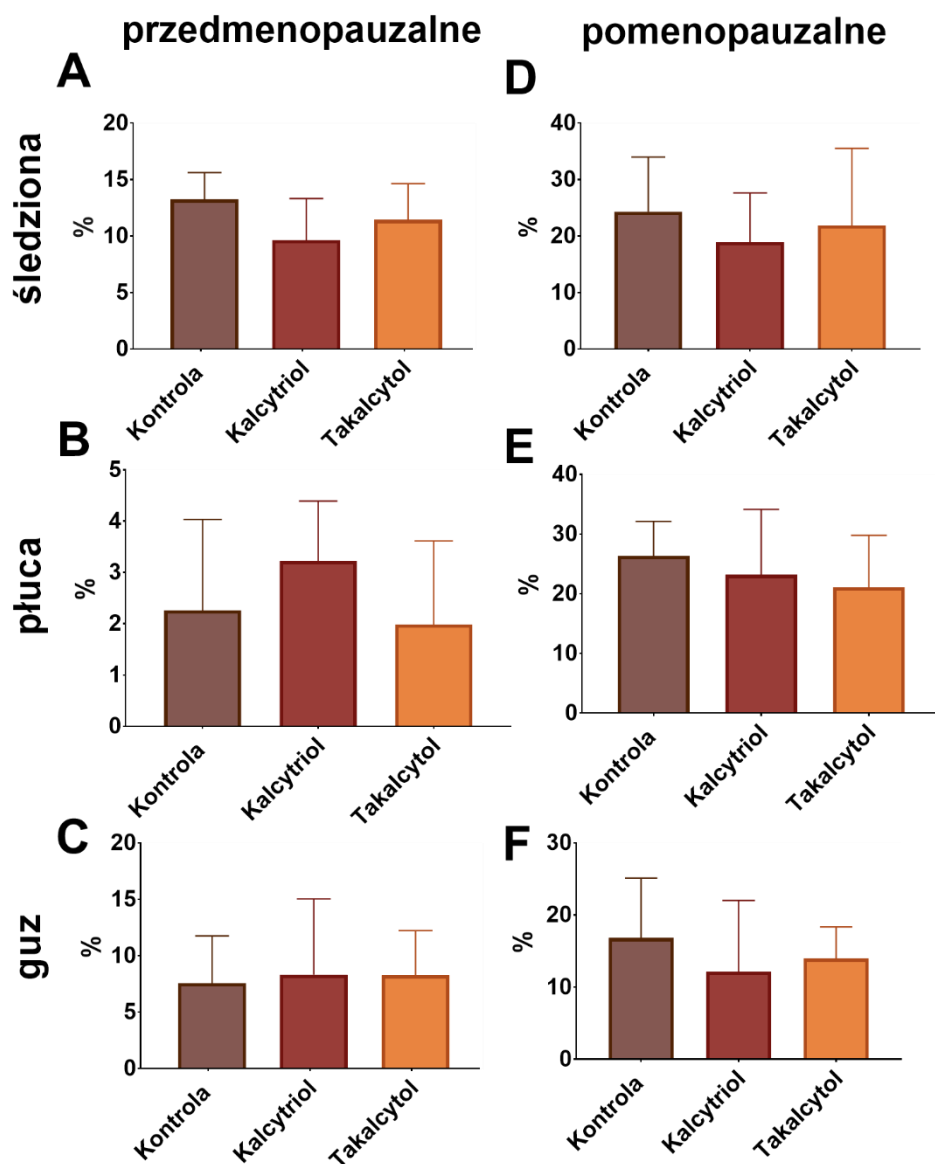
Rycina S - 6. Ocena poziomu receptorów dla osteopontyny w komórkach $CD3^+CD4^+$ pochodzących z płuc u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR w modelu przed- i pomenopauzalnym. Analizie cytometrycznej poddano receptory oddziałujące z osteopontyną ((B i F) CD29, (A i E) CD51, (D i H) CD44, (C i G) CD61) wśród limfocytów T pomocniczych (Th, $CD3^+CD4^+$). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.



Rycina S - 7. Analiza odsetka komórek żywych różnicowanych w kierunku limfocytów Th17 pochodzących z modelu przedmenopauzalnego (A) i pomenopauzalnego (B) myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Na reprezentatywnych schematach typu dot-plot przedstawiono graficzny rozkład komórek żywych i martwych oraz badanych komórek docelowych IL-17⁺ IFN- γ ⁺ i IL-17⁺ IFN- γ ⁻ w poszczególnych grupach wiekowych dla myszy z grupy kontrolnej przedmenopauzalnej (C) i pomenopauzalnej (D). N=4-5. Wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu post hoc Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina S - 8. Analiza Jess Simple Western wybranych białek, kluczowych w procesie różnicowania limfocytów Th17 w komórkach pochodzących ze śledziony od myszy z modelu przed- i pomenopauzalnego obciążonych guzem 67NR. Białka poddane analizie stanowiły (A) ERK1/2/p-ERK1/2, (B) p38/p-p38, (C) Akt/p-Akt, (D) JNK/p-JNK, (E) NFκB/p-NFκB, (F) mTOR/p-mTOR, (G) VDR. Komórki CD4⁺ wyizolowane ze śledziony poddano 4-godzinnej stymulacji PMA i jonomycyną. Wyniki normalizowano względem ekspresji białka całkowitego i grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej $\pm$ błąd standardowy średniej. Analizie poddano stosunek poziomu białka fosforylowanego do niefosforylowanego. N=4-5. Analizę białek Akt, p-Akt, JNK, p-JNK, NFκB, p-NFκB, mTOR, p-mTOR przeprowadzono na dwóch niezależnych eksperymentach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Tukey'a. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, dla których * $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina S - 9. Ocena odsetka komórek IL-17⁺ pochodzących z komórek śledziony (A i D), płuc (B i E) i guza (C i F), poddanych 4-godzinnej stymulacji PMA, jonomycyną i brefeldyną, w modelu przed- i pomenopauzalnym u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 67NR. Analizie cytometrycznej poddano komórki pozytywne pod względem IL-17 spośród limfocytów T pomocniczych (Th, CD3⁺CD4⁺). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. N=5-10. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednokierunkowej ANOVA i testu *post hoc* Fisher'a.