



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”

**Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk**

Mgr Martyna Stachowicz-Suhs

**Charakterystyka makrofagów towarzyszących
rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu
witaminy D na mikrośrodowisko guza**

**Praca doktorska
wykonana w Laboratorium Doświadczalnej Terapii
Przeciwnowotworowej**

**Promotorzy: Prof. dr hab. n. biol. Joanna Wietrzyk
Prof. dr hab. n.med. Rafał Matkowski**

Wrocław 2022



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet
Wrocławski



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

„Nikommu z nas życie, zdaje się, bardzo łatwo nie idzie, ale cóż robić, trzeba mieć odwagę i głównie wiarę w siebie, w to, że się jest do czegoś zdolnym i że do tego czegoś dojść potrzeba. A czasem wszystko się pokieruje dobrze, wtedy kiedy najmniej się człowiek tego spodziewa.”

Maria Skłodowska-Curie

Z całego serca chciałabym podziękować:

Pani Profesor dr hab. Joannie Wietrzyk – za okazane zaufanie, zrozumienie i wsparcie oraz cierpliwość podczas realizacji badań, i przygotowania niniejszej rozprawy.

Panu Profesorowi dr hab. n. med. Rafałowi Matkowskiemu – za możliwość poznania klinicznego świata, cenne wskazówki oraz całemu zespołowi Pana Profesora z DCOPiH, w szczególności Pani Dorocie Łoś oraz Katarzynie Okołatowicz, za wspaniałą współpracę w miłej atmosferze.

Pani dr inż. Magdalenie Milczarek – za okazane wsparcie, wiarę we mnie w niejednej chwili odwrotu oraz doradztwo i cenne wskazówki, a także dzielenie się swoją wiedzą oraz doświadczeniem podczas wieloletniej współpracy.

Pani dr inż. Dagmarze Kłopotowskiej – za okazane wsparcie, doradztwo i cenne wskazówki, a także dzielenie się swoją wiedzą oraz doświadczeniem.

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej – za życzliwość i miłą atmosferę pracy.

Moim Bliskim, za to że są.

Kochanemu Mężowi oraz Córce Wandzi, bez których nie istniałby Świat!

***„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW
z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”
Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu
Społecznego.***

Badania zostały zrealizowane i sfinansowane w ramach projektu pt. “Wpływ witaminy D na makrofagi i fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu piersiowego” nr 2017/27/B/NZ5/01167 (2018-2021)



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Wyniki zostały częściowo opublikowane w pracach:

Anisiewicz, A.; Kowalski, K.; Banach, J.; Łabędź, N.; **Stachowicz-Suhs, M.**; Piotrowska, A.; Milczarek, M.; Kłopotowska, D.; Dzięgiel, P.; Wietrzyk, J. *Vitamin D Metabolite Profile in Cholecalciferol- or Calcitriol-Supplemented Healthy and Mammary Gland Tumor-Bearing Mice*. *Nutrients* 2020, 12, 3416. <https://doi.org/10.3390/nu12113416>

Łabędź, N.; **Stachowicz-Suhs, M.**; Psurski, M.; Anisiewicz, A.; Banach, J.; Piotrowska, A.; Dzięgiel, P.; Maciejczyk, A.; Matkowski, R.; Wietrzyk, J. *Modulation of Fibroblast Activity via Vitamin D3 Is Dependent on Tumor Type—Studies on Mouse Mammary Gland Cancer*. *Cancers* 2022, 14, 4585. <https://doi.org/10.3390/cancers14194585>

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	8
STRESZCZENIE.....	11
SUMMARY	12
1. WSTĘP.....	13
1.1. Makrofagi towarzyszące nowotworom	14
1.1.1. Rola TAMs w progresji nowotworów.....	17
1.1.2. Makrofagi jako cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej.....	20
1.2. Rak gruczołu sutkowego i towarzyszące mu makrofagi	21
1.2.1. Epidemiologia raka gruczołu sutkowego	21
1.2.2. Klasyfikacja raków gruczołu sutkowego	22
1.2.3. Czynniki zwiększające ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego	23
1.2.4. Makrofagi, jako czynnik sprzyjający rozwojowi raka gruczołu sutkowego	25
1.3. Witamina D ₃	27
1.3.1. Metabolizm i podstawowe mechanizmy działania witaminy D ₃	27
1.3.2. Witamina D a rak gruczołu sutkowego – obserwacje kliniczne	29
1.3.3. Witamina D i mechanizmy jej działania w komórkach raka gruczołu sutkowego oraz jej wpływ na komórki występujące w mikrośrodowisku nowotworów	30
1.3.4. Wpływ witaminy D ₃ na makrofagi.....	34
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	39
3. MATERIAŁY I METODY	40
3.1. Badania przeprowadzone z użyciem mysiego modelu raka gruczołu sutkowego	40
3.1.1. Linie komórkowe	40
3.1.2. Badania <i>in vivo</i>	41
3.1.3. Badania <i>ex vivo</i> z użyciem komórek szpiku kostnego	43
3.2. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem tkanek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego	46
3.2.1. Izolacja i różnicowanie monocytów z krwi obwodowej pacjentek.....	47
3.3. Metody	49
3.3.1. Separacja magnetyczna TAMs z guzów pochodzenia mysiego i ludzkiego oraz monocytów z krwi obwodowej pacjentek.....	49
3.3.2. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA	50
3.3.3. Analiza poziomu białek.....	52
3.3.4. Analiza markerów powierzchniowych TAMs metodą cytometrii przepływownej.....	56
3.3.5. Analiza statystyczna wyników	57

4. WYNIKI.....	58
4.1. Analiza tkanek pochodzących od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego	58
4.1.1. Charakterystyka guzów 4T1 pochodzących od myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem.....	59
4.1.2. Fenotyp TAMs izolowanych z guzów myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem	61
4.1.3. Analiza przesiewowa ekspresji genów na poziomie mRNA w komórkach TAMs izolowanych z guzów myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem	64
4.1.4. Fenotyp BMDMs izolowanych ze szpiku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem	67
4.1.5. Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA w komórkach BMDMs izolowanych ze szpiku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 oraz 67NR karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem .	69
4.1.6. Analiza obecności przerzutów w kościach myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem	73
4.1.7. Analiza poziomu wydzielania wybranych cytokin przez TAMs oraz BMDMs pochodzących od myszy obarczonych komórkami mysich raków gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR.....	74
4.1.8. Analiza fenotypowa BMDMs (izolowanych ze szpiku myszy BALB/c zdrowych, nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych	76
4.1.9. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA w komórkach BMDMs (izolowanych ze szpiku myszy BALB/c zdrowych, nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych	79
4.1.10. Ocena poziomu wybranych białek w BMDMs (izolowanych ze szpiku myszy BALB/c nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D ₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych	81
4.1.11. Charakterystyka <i>in vitro</i> linii komórkowych raka gruczołu sutkowego	84
Podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych z analiz przeprowadzonych z użyciem komórek i tkanek pochodzących od myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego	88
4.2. Badania z użyciem komórek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego	90
4.2.1. Charakterystyka fenotypowa TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego.....	90

4.2.2. Ocena wpływu kalcytriolu na proces różnicowania <i>ex vivo</i> MDMs (izolowanych z krwi obwodowej pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo oraz rozsiałym rakiem gruczołu sutkowego) do klas makrofagów M0, M1, M2a, M2c	96
Podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych z analiz przeprowadzonych z użyciem komórek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego	112
5. DYSKUSJA	115
6. WNIOSKI	137
PIŚMIENNICTWO.....	139
SPIS RYCIN I TABEL	164
SUPLEMENT	167

WYKAZ SKRÓTÓW

1,25(OH) ₂ D ₃ -MARRS	(ang. <i>membrane-associated, rapid response steroid-binding</i>) receptor błonowy szybkiej odpowiedzi na steroid, także PDIA3 (ang. <i>protein disulfide isomerase family A member 3</i>) białkowa izomeraza dwusiarczkowa A3
ADCP	(ang. <i>antibody dependent cellular phagocytosis</i>) fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał
APC	(ang. <i>antigen-presenting cell</i>) komórka prezentująca antygen
BMDMs	(ang. <i>bone marrow derived macrophages</i>) makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego
BMI	(ang. <i>body mass index</i>) współczynnik masy ciała
CAFs	(ang. <i>cancer-associated fibroblasts</i>) fibroblasty towarzyszące nowotworom
CaMKK2	(ang. <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>) kinaza białkowa kinazy zależnej od wapnia/kalmoduliny 2
CCL2	(ang. <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>) ligand 2 chemokiny z motywem C-C
CCL5	(ang. <i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i>) ligand 5 chemokiny z motywem C-C
CD	(ang. <i>cluster of differentiation</i>) antygen różnicowania komórkowego
COX-2	(ang. <i>cyclooxygenase 2</i>) cyklooksigenaza 2
CSF-1	(ang. <i>colony stimulating factor-1</i>) czynnik stymulujący tworzenie kolonii 1
CTCs	(ang. <i>circulating tumor cells</i>) krążące komórki nowotworowe
DBP	(ang. <i>vitamin D binding protein</i>) białko wiążące witaminę D
DCIS	(łac. <i>ductal carcinoma in situ</i>) rak przewodowy in situ
ECM	(ang. <i>extracellular matrix</i>) macierz zewnątrzkomórkowa
EGF	(ang. <i>epidermal growth factor</i>) naskórkowy czynnik wzrostu
EGFR	(ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>) receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu

EMT	(ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>) przejście nabłonkowo-mezenchymalne
EpCAM	(ang. <i>epithelial cell adhesion molecule</i>) cząsteczka adhezji komórek nabłonkowych
HER2	(ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>) receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2
HIF1 α	(ang. <i>hypoxia-inducible factor 1</i>) czynnik indukowany hipoksją
IFN- γ	(ang. <i>interferon gamma</i>) interferon gamma
IHC	(ang. <i>immunohistochemistry</i>) immunohistochemia
iNOS	(ang. <i>inducible nitric oxide synthase</i>) indukowana syntaza tlenku azotu
LCIS	(łac. <i>lobular carcinoma in situ</i>) rak zrazikowy <i>in situ</i>
M-CSF	(ang. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>) czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
MDMs	(ang. <i>monocyte-derived macrophages</i>) makrofagi pochodzące z monocytów krwi obwodowej
MMPs	(ang. <i>matrix metalloproteinases</i>) metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
nVDRE	(ang. <i>negative vitamin D response element</i>) negatywny element odpowiedzi na witaminę D
OPN	(ang. <i>osteopontin</i>) osteopontyna
PD1	(ang. <i>programmed death 1</i>) receptor programowanej śmierci 1
PD-L1	(ang. <i>programmed death-ligand 1</i>) ligand receptora programowanej śmierci 1
PGE2	(ang. <i>prostaglandin E2</i>) prostaglandyna E2
PI3K	(ang. <i>phosphatidylinositide 3-kinases</i>) kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PR	(ang. <i>progesterone receptor</i>) receptor progesteronowy
PTEN	(ang. <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>) białko supresorowe o aktywności fosfatazy
RXR	(ang. <i>retinoid X receptor</i>) receptor retinoidowy X

SDF1	(ang. <i>stromal-cell derived factor 1</i>) czynnik stromalny, chemokina CXCL12
TAMs	(ang. <i>tumor-associated macrophages</i>) makrofagi towarzyszące nowotworom
TGF β	(ang. <i>transforming growth factor β</i>) transformujący czynnik wzrostu β
TLR4	(ang. <i>toll-like receptor 4</i>) receptor toll-podobny 4
TME	(ang. <i>tumor microenvironment</i>) mikrośrodowisko guza
TNBC	(ang. <i>triple negative breast cancer</i>) potrójnie ujemny rak piersi
TNF α	(ang. <i>tumor necrosis factor α</i>) czynnik martwicy nowotworów α
TP53	(ang. <i>tumor protein p53</i>) gen kodujący białko p53
VDR	(ang. <i>vitamin D receptor</i>) receptor witaminy D
VDRE	(ang. <i>vitamin D response element</i>) miejsce odpowiedzi na witaminę D
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
Zeb1	(ang. <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>) białko z rodziny palca cynkowego E-Box wiążącego Homeobox 1

STRESZCZENIE

Głównym celem niniejszej pracy była charakterystyka makrofagów towarzyszących przerzutującym i nieprzerzutującym rakom gruczołu sutkowego (TAMs; ang. *tumor-associated macrophages*) w kontekście wpływu witaminy D₃ oraz jej biologicznie aktywnej formy – kalcytriolu – na ich pro- lub przeciwnowotworową polaryzację.

W badaniach *in vivo* wykazano, że zarówno podawanie karmy suplementowanej witaminą D₃, jak i traktowanie myszy kalcytriolem niezależnie od podawanej karmy wzmagало potencjał przerzutowy komórek 4T1, czego nie obserwowano w przypadku komórek 67NR oraz E0771. Wykazano także, że u zwierząt o zwiększonej liczbie przerzutów do płuc oraz kości obserwuje się pogłębienie pronowotworowego fenotypu TAMs - M2 (MHCII^{low}CD44^{high}), przy jednoczesnym prozapalnym profilu ekspresji genów (podwyższona ekspresja *Il23a* oraz obniżona ekspresja *Il10*), czemu towarzyszył wzrost poziomu osteopontyny w tkance guza. Dodatkowo obserwowano, iż makrofagi pochodzące ze szpiku myszy karmionych karmą z deficytem witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem, w warunkach *ex vivo*, wykazywały wyższą wrażliwość na czynniki indukujące stan zapalny wydzielane przez stymulowane kalcytriolem komórki 4T1. Ponadto, wzrost poziomu CD44 (receptora dla osteopontyny) obserwowano także w TAMs izolowanych z tkanek pooperacyjnych pacjentek w zaawansowanym miejscowo stadium raka gruczołu sutkowego. W grupie pacjentek wykazujących prawidłowy poziom 25(OH)D₃ w osoczu wykazano tendencję do obniżenia poziomu CD44 na powierzchni TAMs. Wykazano również, że kalcytriol modulował makrofagi różnicowane z monocytów krwi obwodowej pacjentek obniżając poziom cząsteczek charakterystycznych dla klasy makrofagów M1, jak i M2 w zależności od poziomu 25(OH)D₃ w osoczu, statusu menopauzalnego pacjentek oraz stadium zaawansowania choroby. Ponadto, w grupie pacjentek przed menopauzą z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu, obserwowano zwiększoną zdolność tych komórek do polaryzacji w kierunku M1 przy jednoczesnym obniżeniu ich zdolności do polaryzacji w kierunku M2c.

Podsumowując, odpowiedź makrofagów na stymulację poszczególnymi czynnikami ukierunkowującymi ich polaryzację zależna jest od statusu witaminy D organizmu, z którego pochodzą. Jednakże ostateczne ukierunkowanie makrofagów wydaje się zależeć głównie od indywidualnych cech komórek nowotworowych oraz ich odpowiedzi na kalcytriol, ponieważ to komórki nowotworowe i wydzielane przez nie czynniki przeważają w mikrośrodkowisku nowotworów wpływając na jego skład i funkcjonowanie.

SUMMARY

The main objective of this study was to characterize macrophages associated with metastatic and non-metastatic breast cancers (TAMs) in the context of the influence of vitamin D₃ and its biologically active form – calcitriol – on their pro- or anti-cancer polarization status.

In vivo studies showed that both, the administration of food supplemented with vitamin D₃ and the treatment of mice with calcitriol, regardless of the food administered, increased the metastatic potential of 4T1 cells, which was not observed in the case of the 67NR and E0771 cell lines. It was also shown that in mice with an increased number of metastases to the lungs and bones, an increase in the pro-cancer phenotype of TAMs 4T1 - M2 (MHCII^{low}CD44^{high}) was observed. Simultaneously, TAMs 4T1 showed pro-inflammatory gene expression profile (increased expression of *Il23a* and decreased expression of *Il10*), which correlated with an increased level of the osteopontin in the tumor tissue. In addition, macrophages derived from the bone marrow of mice fed with diet deficient in vitamin D₃ and treated with calcitriol were more sensitive to inflammation-inducing factors secreted by calcitriol-stimulated 4T1 cells *ex vivo*. In addition, an increase in the level of CD44 (an osteopontin receptor) was observed in TAMs isolated from postoperative tissues of patients with locally advanced breast cancer. In the group of patients with normal levels of 25(OH)D₃ in plasma, a tendency to decrease the level of CD44 on the surface of TAMs was demonstrated. It was also shown that calcitriol modulated monocytes-derived macrophages by reducing the level of molecules characteristic of the M1 and M2 macrophage class, depending on the level of 25(OH)D₃ in plasma, the menopausal status of patients and the stage of the disease. In addition, in a group of premenopausal patients with normal plasma 25(OH)D₃ levels, an increased ability of these cells to polarize towards M1, while a decrease to polarize towards M2c class was observed.

In conclusion, the response of macrophages to the stimulation of particular factors directing their polarization depends on the vitamin D status of the organism from which they originate. However, the final polarization status of macrophages seems to depend mainly on the individual characteristics of cancer cells and their response to calcitriol, as cancer cells and the factors secreted by them predominate in the tumor microenvironment, affecting its composition and functioning.

1. WSTĘP

Pomimo stale poszerzającej się wiedzy na temat rozwoju chorób nowotworowych, wciąż istnieje potrzeba zrozumienia złożoności procesu przerzutowania, który jest ściśle związany z interakcjami między różnymi typami komórek tworzącymi mikrośrodowisko guza (TME, ang. *tumor microenvironment*). Koncepcja TME sięga 1863 roku, a za jej twórcę uważa się Rudolfa Virchowa. Wysnuł on hipotezę, że naciek komórek układu odpornościowego odzwierciedla miejsce, w którym pojawiają się zmiany nowotworowe, opisując tym samym po raz pierwszy związek pomiędzy stanem zapalnym, a nowotworem¹. W skład TME oprócz komórek nowotworowych wchodzi okalające guz naczynia krwionośne, fibroblasty, cząsteczki sygnałowe, macierz zewnątrzkomórkowa i licznie naciekające guz komórki układu odpornościowego². W 1986 roku powstała także słynna fraza „nowotwór jest stale niegojącą się raną” (ang. *wound that does not heal*), sugerując podobieństwo procesów zachodzących w gojącej się ranie do tych związanych z rozwojem choroby nowotworowej, takich jak ruch komórek nabłonkowych, zwiększona proliferacja komórek, przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej³. Procesy te jednak istotnie różnią się od siebie na poziomie regulacji, gdzie w kontekście nowotworów to czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe (czynniki wzrostu, proangiogenne, zapalne) zaczynają przeważać w miarę rozwoju choroby prowadząc tym samym do zakłócenia balansu pomiędzy przeciwnowotworowymi a pronowotworowymi właściwościami komórek układu odpornościowego i stworzenia warunków sprzyjających przerzutowaniu^{4,5}.

Witamina D₃ znana jest z właściwości immunomodulujących, szeroko opisywany jest także jej wpływ na zmniejszanie ryzyka zachorowania na wiele typów nowotworów w tym raka gruczołu sutkowego. Ponadto istnieje wiele badań dotyczących mechanizmów jej przeciwnowotworowych właściwości⁶⁻⁹. Jednakże, w badaniach przeprowadzonych w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu (IITD PAN) – wykazano, że kalcytriol (aktywna forma witaminy D₃) i jego analogi (PRI-2191 oraz PRI-2205) wzmagają proces przerzutowania w mysim modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 jednocześnie nie wpływając na kinetykę wzrostu guza¹⁰. Obserwacje te dotyczyły myszy młodych (6-8

tygodniowych), podczas gdy u myszy starych poddanych owariektomii (model pomenopauzalny) obserwowano efekt przeciwprzerzutowy kalcytriolu i jego analogów stosowanych od 7 dnia po wszczepieniu komórek nowotworowych¹¹. Wykazano związek tych zależności od wzrostu poziomu białka osteopontyny (OPN) w guzie myszy młodych oraz aktywacji odpowiedzi Th17 pod wpływem traktowania badanymi związkami^{10,11}. Brak wrażliwości na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu komórek linii 4T1 (*in vitro* oraz *in vivo*¹⁰) oraz idący za tym prawdopodobnie udział innych komórek mikrośrodowiska guza w procesie wzmagania właściwości przerzutowych w tym modelu raka gruczołu sutkowego, skłonił do przeprowadzenia dalszych badań nad wpływem witaminy D₃ na komórki układu odpornościowego w celu oceny ich roli w procesie rozwoju nowotworu. Wyniki przedstawione w ramach niniejszej pracy skupiają się na charakterystyce makrofagów związanych z rakiem gruczołu sutkowego.

1.1. Makrofagi towarzyszące nowotworom

Makrofagi są komórkami, które pełnią funkcję m.in. w zapewnianiu homeostazy tkankowej, obronie przeciw drobnoustrojom czy gojeniu się ran¹². Makrofagi należą do grupy komórek układu odpornościowego prezentujących antygen (APC; ang. *antigen presenting cells*), które na swojej powierzchni wykazują obecność wielu molekuł umożliwiających ich klasyfikację ze względu na pełnione funkcje w środowisku, w którym w danej chwili się znajdują (tkankowo specyficzne, głównie pro- lub przeciwzaplane lub też spolaryzowane klasycznie i alternatywnie, aktywowane odpowiednio przez interferon γ (INF- γ)/lipopolisacharyd (LPS) lub IL-4/IL-10 (IL – interleukina). Są komórkami fagocytującymi, które pochodzą m.in. z monocytów obwodowych krążących we krwi, te zaś pochodzą z progenitorów szpikowych linii mieloidalnej. W procesie mielopoetyzy z komórek progenitorowych MDP (ang. *macrophage dendritic precursor*) powstają pro-monocyty, które we krwi przekształcają się w monocyty LY6C^{low} (ang. *lymphocyte antigen 6 complex, locus C1*) dające początek makrofagom alternatywnym, odpowiedzialnym za procesy naprawcze śród błonka lub LY6C^{high} przenikające do miejsc stanu zapalnego (przekształcające się w makrofagi o charakterystyce prozapalnej). LY6C są markerami monocytów mysich, podczas gdy u ludzi odpowiednikiem komórek LY6C^{high} i LY6C^{low} są odpowiednio monocyty CD14⁺⁺CD16⁻ i CD14⁺CD16⁺⁺ ¹³. W 2000 roku Millis i wsp. zaproponowali podział makrofagów na subpopulacje M1 i M2 zgodnie z nomenklaturą odpowiadającą aktywacji

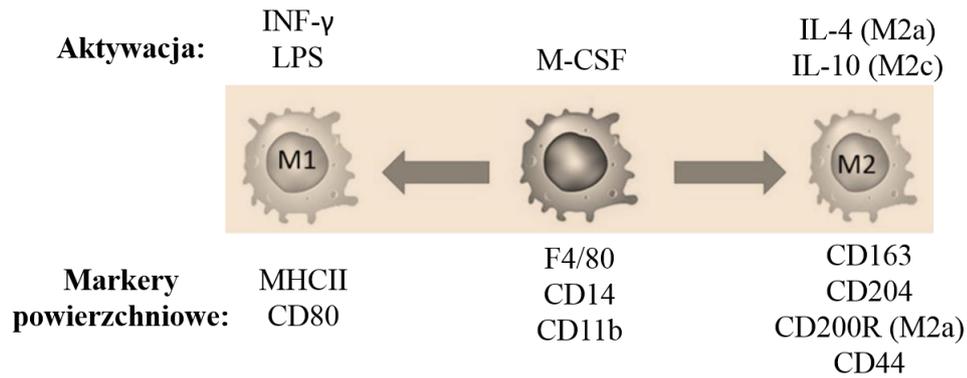
populacji limfocytów T pomocniczych 1 oraz 2 (Th1 i Th2). Zaobserwowali oni, że makrofagi pochodzące z organizmu myszy szczepu C57BL/6 (środowiska limfocytów Th1 produkujących głównie $\text{INF-}\gamma$) wydzielają więcej tlenku azotu (NO; ang. *nitric oxide*) w porównaniu do makrofagów pochodzących od myszy szczepu BALB/c (środowiska limfocytów Th2 produkujących głównie IL-4)¹⁴.

Makrofagi występujące w mikrośrodowisku nowotworu nazywane są makrofagami towarzyszącymi nowotworom (TAMs; ang. *tumor-associated macrophages*), pochodzącymi z populacji makrofagów rezydualnych lub rekrutowanych z monocytów z krwi obwodowej¹⁵. Czynniki, rekrutującymi monocyty w miejsce guza pierwotnego są m.in. chemokiny CCL2 czy CCL5 lub cytokina CSF-1 (ang. *colony stimulating factor-1*). Następnie komórki te różnicują się pod wpływem mieszanki czynników obecnych w tkance guza w makrofagi klasyfikowane do dwóch podstawowych subpopulacji: M1 oraz M2, w tym kontekście opisywanych jako pro- lub przeciwnowotworowe¹⁶.

Makrofagi o polaryzacji M1 wykazują funkcje przeciwnowotworowe. Odróżniają one komórkę zdrową od komórki zmienionej nowotworowo i niszczą ją. Istnieje kilka mechanizmów, poprzez które makrofagi działają niszcząco na komórki nowotworowe. Jednym z nich jest wydzielanie zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu (ROS; ang. *reactive oxygene species*) lub NO, które mają bezpośredni wpływ cytotoksyczny na komórki. Kolejnym z mechanizmów jest fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał (ADCP; ang. *antibody dependent cellular phagocytosis*), która dotyczy rozpoznania specyficznych przeciwciał na powierzchni komórek nowotworowych, aktywacji receptorów Fc γ R makrofagów i następnie fagocytozy zmienionej komórki^{17,18}. Makrofagi także aktywują inne komórki układu odpornościowego znajdujące się w ich otoczeniu do aktywności cytotoksycznych np. limfocyty T, komórki NK (ang. *natural killer cells*)¹⁹. Immunofenotyp charakteryzujący populację komórek M1 zakłada obecność na ich powierzchni m.in. markerów takich jak: antygeny zgodności tkankowej klasy II (MHCII; ang. *major histocompatibility complex II*), CD80, CD86 (CD; ang. *cluster of differentiation*) (Ryc. 1). Czynniki wydzielanymi przez te komórki są głównie czynniki prozapalne: IL-12, IL-1, IL-6, IL-23, interferony²⁰. Różnicują się one w guzie z monocytów klasycznych CD14⁺CD16⁻, które zrekrutowane do zrębu guza poprzez czynniki chemotaktyczne po przejściu przez śródbłonek naczyń polaryzują w komórki typu M1 pod wpływem $\text{INF-}\gamma$ lub LPS²¹. W proces polaryzacji

zaangażowana jest m.in. ścieżka sygnałowa JAK-STAT1. Szereg fosforylacji kinaz (aktywowany cząsteczką LPS receptor TLR4 (ang. *toll-like receptor*) lub receptor dla INF- γ - INF γ R) zaangażowanych w ten mechanizm prowadzi do wiązania czynników transkrypcyjnych STAT1 lub IRF5 w miejscach promotorowych genów kodujących m.in. NOS2, MHCII czy IL-12 prowadząc do aktywacji ich transkrypcji²². Jednakże, pomimo szeroko opisywanych przeciwnowotworowych funkcji makrofagów M1 mogą one także przyczyniać się do promowania wzrostu guzów. Tlenek azotu, reaktywne formy tlenu mogą wpływać na niestabilność genetyczną komórek, co więcej wydzielana przez nie w dużych ilościach IL-6 oraz czynnik martwicy nowotworów (TNF α ; ang. *tumor necrosis factor α*) wykazują aktywność stymulującą komórki nowotworowe do proliferacji, są także czynnikami proangiogennymi^{21,23}.

TAMs utożsamiane są głównie z klasą makrofagów M2. Wykazują one właściwości pronowotworowe. Cechami charakterystycznymi dla tej grupy makrofagów jest niski poziom MHCII na ich powierzchni, zaś wysoki markerów, takich jak: CD206, CD204, CD163, czy podwyższony poziom arginazy 1 (Arg-1) (Ryc. 1)²⁴. Profil wydzielanych przez te komórki czynników składa się głównie z cytokin przeciwzapalnych np. IL-10, transformującego czynnika wzrostu β (TGF β ; ang. *transforming growth factor β*)²⁵. Bardzo często wydzielają także czynniki wspierające proces angiogenezy, czy cząsteczki związane z przekształcaniem macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM; ang. *extracellular matrix*): czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF; ang. *vascular endothelial growth factor*), TGF β , naskórkowy czynnik wzrostu (EGF; ang. *epidermal growth factor*), metaloproteinaza 9 (MMP-9)²⁶. Ścieżką sygnałową aktywowaną w procesie polaryzacji M2 jest głównie JAK-STAT6 lub STAT3, PPAR γ oraz C/EBP β ²². W 2004 roku Mentovani i wsp. wyodrębnili także podgrupy makrofagów klasy M2: M2a, M2b, M2c oraz M2d. M2a aktywowane przez IL-4 posiadają właściwości profibrotyczne i aktywują odpowiedź Th2; M2b aktywowane przez agonistów receptorów TLR lub IL-1R - pełnią funkcje immunoregulatorowe i także aktywują odpowiedź Th2; M2c aktywowane przez IL-10 związane są z immunosupresją, naprawą tkanek i reorganizacją ECM; M2d aktywowane przez IL-6 uważane są za te związane z neowaskularyzacją i indukcją procesów przerzutowania²⁷.



LPS ang. *lipopolysaccharide* – lipopolisacharyd; TNF- α ang. *tumor necrosis factor α* – czynnik martwicy nowotworów α ; IL – interleukina; CD ang. *cluster of differentiation* – antygen różnicowania komórkowego; M-CSF ang. *macrophage colony-stimulating factor* – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

Rycina 1. Białka powierzchniowe użyte w ramach niniejszej pracy do charakterystyki makrofagów oraz cząsteczki stymulujące do różnicowania w kierunku poszczególnych subpopulacji makrofagów. Opracowanie własne na podstawie ²⁸.

1.1.1. Rola TAMs w progresji nowotworów

Warunki sprzyjające obecności TAMs w guzach nowotworowych to, m.in. hipoksja, procesy związane z włóknieniem i chronicznym stanem zapalnym^{29–31}. Hipoksja, która często występuje w obrębie guzów nowotworowych jest jednym z czynników indukujących produkcję chemokin przez komórki nowotworowe, czy komórki zrębu guza, które rekrutują w ten sposób monocyty/makrofagi³¹. Ponadto czynnik HIF1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1*) jest jedną z cząsteczek promujących obecność TAMs w guzie i ich polaryzację w kierunku M2. Proces włóknienia w obrębie mięszu nowotworu związany jest z aktywacją fibroblastów towarzyszących nowotworom (CAFs, ang. *cancer-associated fibroblasts*) i zmianami w organizacji ECM. Aktywowane CAFs znajdujące się w tym środowisku wydzielają cytokiny i chemoatraktanty m.in. IL-6, CSF-1, VEGF, CCL2, CCL5, które także sprzyjają pojawianiu się alternatywnych makrofagów w zrębie guza. Ponadto proces włóknienia związany jest ze zwiększoną obecnością cząsteczek takich jak fibronektyna czy kwas hialuronowy, które są cząsteczkami rekrutującymi i wpływającymi na polaryzację makrofagów. Przykładowo nadekspresja fibronektyny 1 (kodowanej przez gen *Fn1*) w płaskonabłonkowym raku głowy i szyi wiąże się z polaryzacją makrofagów w kierunku M2³², a sama zmiana struktury i zwiększenie gęstości kolagenowej w guzie może sprzyjać pronowotworowej polaryzacji makrofagów³³.

TAMs oraz komórki nowotworowe wzajemnie oddziałują na siebie w sposób bezpośredni (kontakt komórka-komórka) lub poprzez czynniki wydzielane do swojego otoczenia. Makrofagi wzmagają progresję choroby nowotworowej, m.in. przez wydzielanie czynników mutagennych, jak czynniki wzrostu czy czynniki prozapalne (TNF, INF- γ czy IL-6), które indukują aktywację czynników transkrypcyjnych STAT3 czy NF- κ B stymulujących proliferację i aktywujących nowotworowe komórki macierzyste (CSC; ang. *cancer stem cells*)^{34,35}. Dodatkowo wpływają na skład innych komórek układu odpornościowego znajdujących się w zrębie guza. Głównie obniżają proliferację i migrację limfocytów T cytotoksycznych, a promują obecność komórek T regulatorowych poprzez wydzielanie prostaglaniny 2 (PGE2; ang. *prostaglandin E2*) lub chemokin CXCL12/ CCL22 czy TGF β ³⁶. TAMs posiadają na swojej powierzchni także szereg receptorów hamujących aktywność limfocytów, takich jak: PD-L1, PD-L2, CD80 czy CD86³⁷.

TAMs zaangażowane są także w promowanie procesu angiogenezy, który stymulowany jest głównie stanem hipoksji w guzie. Makrofagi zrekrutowane gradientem chemokin do miejsc o niedostatecznej zawartości tlenu zostają w tym miejscu i zasiedlają je¹⁶. Czynnikiem stymulującym TAMs do wydzielania czynników proangiogennych jest m.in. HIF-1 α , który jest jednym z induktorów mRNA *Vegf* w tych komórkach, które poprzez wydzielanie VEGF przyczyniają się do szybkiego i nieregularnego wzrostu naczyń krwionośnych^{38,39}. Ponadto metaloproteinazy wydzielane przez makrofagi (głównie MMP-9) korelują ze zwiększoną waskularyzacją w guzie i promowaniem wzrostu guzów⁴⁰. Innymi czynnikami wydzielanymi przez makrofagi są interleukiny prozapalne IL-1 oraz IL-6, które dodatkowo napędzają produkcję czynników proangiogennych w mikrośrodku guza^{41,42}.

Proces przerzutowania składa się z kilku etapów: tworzenia niszy premetastatycznej, przenikania komórek nowotworowych do nowopowstałych w guzie naczyń krwionośnych (na drodze przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego) i ich przetrwania do momentu przeniknięcia do odległych od guza pierwotnego tkanek i kolonizacji tych miejsc. TAMs biorą udział w niemal wszystkich tych procesach, począwszy od uzyskania przez komórki nowotworowe cech sprzyjających obniżeniu ich właściwości adhezyjnych. Liczne badania dowodzą, iż komórki nowotworowe hodowane w obecności TAMs posiadają obniżony poziom białka adhezji komórkowej E-kadheryny, przy zwiększonej obecności białek związanych z fenotypem komórek

mezenchymalnych: N-kadheryny czy Snail⁴³. Regulacja tego procesu odbywa się za pośrednictwem ścieżek sygnałowych PI3K/AKT lub Wnt/ β -katenina aktywowanych przez czynniki wydzielane przez makrofagi, głównie IL-1 β , IL-8, TNF α czy TGF β ⁴⁴⁻⁴⁶.

Kolejnym elementem procesu przerzutowania jest przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej, w której biorą udział metaloproteinazy, proteazy serynowe czy katepsyny wydzielane przez TAMs, umożliwiającą w konsekwencji proces intrawazacji komórek nowotworowych do światła naczynia krwionośnego. Zwiększoną ruchliwość komórek może powodować EGF⁴⁷, którego sekrecja przez komórki TAMs zwiększa się pod wpływem wydzielanego przez komórki nowotworowe CSF-1. Zaobserwowano, iż zahamowanie tych czynników wpłynęło na obniżenie właściwości migracyjnych zarówno w przypadku TAMs, jak i komórek nowotworowych oraz obniżyło liczbę krążących komórek nowotworowych (CTCs; ang. *circulating tumor cells*). Dodatkowo bezpośredni kontakt makrofaga z komórką nowotworową uaktywnia szlaki sygnałowe związane z białkiem RhoA, co w konsekwencji prowadzi do formowania inwadopodiów⁴⁸ ułatwiających przenikanie przez śródbłonek naczyń krwionośnych. CTCs w krwiobiegu muszą przeżyć niewychwycone przez układ odpornościowy. Komórki nowotworowe posiadające cechy komórek macierzystych (zwiększony na ich powierzchni poziom cząsteczki CD44 oraz cząsteczki adhezji komórek nabłonkowych (EpCAM; ang. *epithelial cell adhesion molecule*), CD34) często przemieszczają się w krwiobiegu w obecności płytek krwi okalających i chroniących je przed wychwytem m.in. przez komórki NK^{49,50}. Istnieje także kilka doniesień odnośnie występowania komórek hybrydowych w krwiobiegu, wykazujących fenotyp charakterystyczny zarówno dla makrofagów, jak i komórek nowotworowych (CD163⁺EpCAM⁺)^{51,52}. Dodatkowo na żywotność CTCs w krwioobiegu wpływają autokrynnie cytokiny wydzielane przez te komórki, lub komórki układu odpornościowego znajdujące się w ich otoczeniu: IL-6, IL-8, IL-10 oraz czynnik TGF β , które hamują proces apoptozy poprzez aktywację szlaku PI3K/Akt i podwyższanie poziomu cykliny A1 w komórkach^{53,54}. Wykazano także, że makrofagi pełnią bardzo ważną funkcję w ekstrawazacji komórek nowotworowych do odległych tkanek m.in. płuc. Obniżenie poziomu wynaczynienia komórek nowotworowych korelowało z usunięciem makrofagów CD11b⁺ z układu doświadczalnego, co w konsekwencji skutkowało obniżeniem obecności przerzutów⁵⁵.

W roku 1889 powstała opisana przez Pageta teoria ziarna (komórki nowotworowe) i gleby (nisza premetastatyczna) ang. „*seed and soil*”. Niszą

premetastatyczną określamy środowisko odległe od miejsca guza pierwotnego, które sprzyja zasiedleniu się i proliferacji komórek nowotworowych. Jednym z mechanizmów jego tworzenia jest rekrutacja komórek wywodzących się ze szpiku kostnego pod wpływem czynników wydzielanych, m.in. przez komórki zrębu guza, takich jak: egzosomy, TNF, VEGF, TGF β , SDF-1. Rekrutowanymi komórkami są m.in. progenitory szpikowe VEGFR1⁺, komórki linii mieloidalnej CD11b⁺, które odpowiedzialne są za tworzenie niszy premetastatycznej^{56,57}. Dodatkowo makrofagi spolaryzowane pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe przedostające się do krwioobiegu i zasiedlające miejsca powstawania wtórnych ognisk przerzutowych wydzielają czynniki odpowiedzialne za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, chemokiny które indukują napływ CTCs oraz czynniki związane z aktywacją ich adhezji do śródbłonna i proliferacji w nowo zasiedlonym miejscu⁵⁸.

1.1.2. Makrofagi jako cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej

Obecnie stosowane schematy leczenia skupiają się głównie na komórkach nowotworowych, jednakże coraz większa wiedza na temat współdziałania między składowymi mikrośrodowiska guza w procesach przerzutowania skłania do podejmowania strategii ukierunkowanych na komórki układu odpornościowego, w tym głównie TAMs. Biorą one udział w wielu procesach związanych z progresją choroby nowotworowej, podlegają procesom regulacji pod wpływem specyficznych czynników co czyni je atrakcyjnym celem terapii.

Jednym z podejść terapeutycznych jest zahamowanie proliferacji TAMs. Związkiem cytotoksycznym, którego działanie oprócz aktywności przeciwo proliferacyjnej wobec komórek nowotworowych odnotowano także w przypadku TAMs jest trabektedyna⁵⁹. Wykazano, iż selektywnie obniża poziom monocytów we krwi oraz śledzionie myszy C57BL/6J obarczonych różnymi typami nowotworów, poprzez mechanizm związany z indukcją procesu apoptozy zależnej od aktywacji receptora TRAIL. Obniża także produkcję cytokin sprzyjających przerzutowaniu: CCL2, IL-6 oraz VEGF. Kolejnym przykładem jest analog trabektedyny – lurbinectedyna, który także obniża liczbę makrofagów we krwi oraz mikrośrodowisku nowotworu⁶⁰. Ponieważ oba związki działają na każdą z populacji makrofagów (nie tylko te o polaryzacji pronowotworowej) nową strategią jest poszukiwanie związków selektywnie działających wobec populacji makrofagów TAMs. Obiecującym podejściem jest zastosowanie

peptydu M2pep – cząsteczki selektywnie wiążącej się do komórek M2 i działającej cytotoksycznie wobec tej klasy makrofagów bez wpływu na makrofagi M1 w modelu przedklinicznym⁶¹.

Ponieważ polaryzacja makrofagów M1/M2 jest bardzo ważnym procesem stanowiącym o progresji choroby nowotworowej stosuje się strategie mające na celu zmianę ukierunkowania makrofagów z M2 na M1. Zastosowanie w tym kontekście znalazł związek z grupy bisfosfonianów – kwas zoledronowy. Wykazano jego rolę w modulowaniu fenotypu makrofagów poprzez zahamowanie produkcji czynników charakterystycznych dla makrofagów M2, takich jak: IL-10, VEGF, MMP-9, przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS; ang. *inducible nitric oxide synthase*)⁶². Ponadto kwas zoledronowy hamował rekrutację TAMs do mikrośrodowiska guza⁶³. Innym związkiem wpływającym na polaryzację makrofagów jest cząsteczka CP-870,893. Jest to agonista receptora CD40, który jest obecny m.in. na makrofagach i odpowiada za aktywację odpowiedzi zapalnej, która charakterystyczna jest dla klasy makrofagów M1⁶⁴.

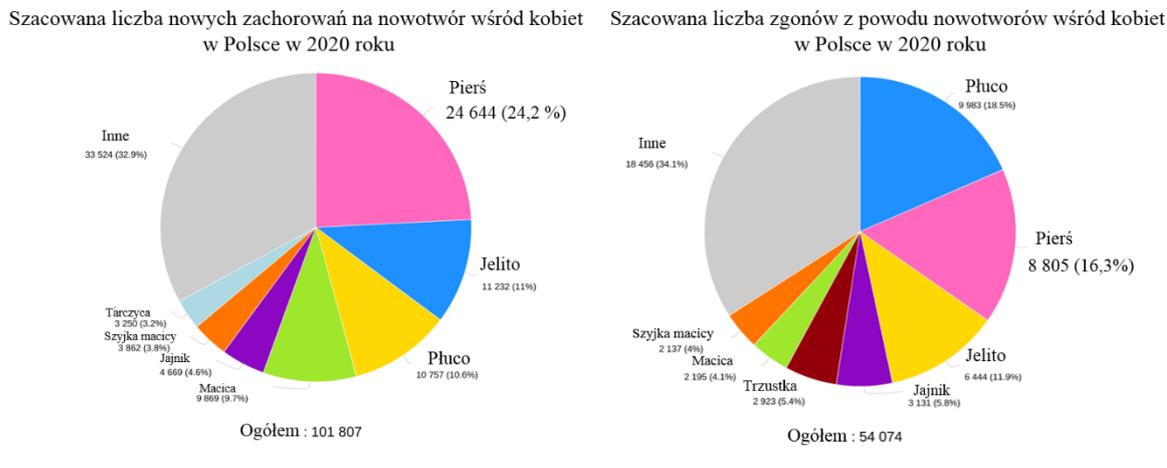
Stosowanie związków hamujących infiltrację makrofagów zarówno w otoczenie guza, jak i do nisz premetastatycznych jest kolejną strategią przeciwprzerzutową. Najważniejszymi czynnikami chemotaktycznymi dla makrofagów są CSF-1 oraz CCL2, które stały się głównymi celami tego rodzaju terapii. Głównie stosuje się inhibitory lub przeciwciała blokujące receptory dla tych cząsteczek (CCR2, CSF-1R). Przykładem przeciwciał hamujących aktywację CSF-1R są emactuzumab⁶⁵ czy pexidartinib⁶⁶.

1.2. Rak gruczołu sutkowego i towarzyszące mu makrofagi

1.2.1. Epidemiologia raka gruczołu sutkowego

Rak gruczołu sutkowego (potocznie – rak piersi) jest najczęściej występującym nowotworem wśród kobiet i stanowi 24,5% wszystkich przypadków nowotworów na świecie. Ponadto w 2020 roku stał się wiodącą przyczyną zachorowań na nowotwory stanowiąc 11,7% wszystkich przypadków. Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia w 2020 roku zdiagnozowano aż 2,3 miliona nowych przypadków i odnotowano 685 000 zgonów z powodu tego typu nowotworu (co stanowi piąte miejsce pod względem przyczyn śmierci w wyniku choroby nowotworowej – 6,9 %)⁶⁷. W Polsce w 2020 roku według bazy danych GLOBOCAN odnotowano 24 644 nowych

zachorowań na raka gruczołu sutkowego (24,2% wszystkich nowotworów), a liczba zgonów w konsekwencji choroby wynosiła 8 805 (16,3%) (Ryc. 2).



Rycina 2. Epidemiologia raka gruczołu sutkowego w Polsce. Dane zaczerpnięte ze strony Światowej Organizacji Zdrowia - bazy danych GLOBOCAN.

1.2.2. Klasyfikacja raków gruczołu sutkowego

W analizie histopatologicznej raka gruczołu sutkowego ocenie poddaje się takie parametry jak: typ histologiczny raka, stopień złośliwości, stopień zaawansowania według klasyfikacji TNM, naciek komórek nowotworowych do naczyń okołoguzowych. Dodatkowo ocenie poddaje się także obecność i poziom receptora progesteronowego (PR), estrogenowego (ER), a także receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER-2) oraz wyznacza się indeks proliferacji Ki67⁶⁸.

Podział ze względu na typ histologiczny obejmuje dwie główne grupy raków: przedinwazyjny, tzw. nabłonkowe zmiany prekursorowe, które stanowią 15-30% wszystkich zachorowań (rak przewodowy *in situ* – DCIS (łac. *ductal carcinoma in situ*), bądź zrazikowy *in situ* – LCIS (łac. *lobular carcinoma in situ*) oraz inwazyjny (m.in. NST – bez specjalnego typu (ang. *invasive carcinoma of no special type*); rak przewodowy, zrazikowy, cewkowy, śluzowy, rdzeniasty, brodawkowaty, metaplastyczny)⁶⁹.

Klasyfikacja TNM pozwala określić wielkość guza pierwotnego (T-*tumor*), obecność przerzutów w węzłach chłonnych (N-*node*) oraz obecność przerzutów w narządach odległych (M-*metastasis*). Do analizy stopnia zaawansowania używa się także cechy G jako oceny stopnia złośliwości (1-3). G1 – rak wysokozróżnicowany o niskim stopniu złośliwości; G2 – rak niskozróżnicowany o pośrednim stopniu

złośliwości oraz G3 – rak niskozróżnicowany, który charakteryzuje się wysokim stopniem złośliwości⁶⁸.

Dodatkowo raki gruczołu sutkowego można podzielić na podstawie klasyfikacji molekularnej, dzięki ocenie immunohistochemicznej (IHC; ang. *immunohistochemistry*) markerów takich jak: ER; PR; HER-2 oraz Ki67. Wyróżniamy cztery podstawowe podtypy molekularne raka gruczołu sutkowego: luminalny A, luminalny B, HER-2 dodatni – Nieluminalny oraz podstawny (trójujemny; TNBC, ang. *triple negative breast cancer*). Rak o podtypie luminalnym A charakteryzuje się niskim współczynnikiem Ki67 oraz brakiem nadekspresji HER-2. Dodatkowo wykazuje ekspresję receptora ER oraz PR. Podtyp luminalny B wykazuje ekspresję ER niższą niż podtyp luminalny A, przy wyższym indeksie proliferacji – Ki67. Może wykazywać ekspresję PR i/lub amplifikację HER-2. W przypadku podtypu HER-2 dodatniego (nieLuminalnego) obserwuje się wysoki poziom białka HER-2 przy jednoczesnym braku ER oraz PR. Natomiast, cechą charakterystyczną TNBC jest brak receptorów ER, PR oraz brak nadekspresji i/lub amplifikacji genu *HER2*⁶⁸.

1.2.3. Czynniki zwiększające ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego

Głównym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka gruczołu sutkowego jest płeć. W 99% przypadków choroba ta dotyczy kobiet, podczas gdy tylko 1% stanowią przypadki zachorowań wśród mężczyzn⁷⁰. Kolejnym czynnikiem ryzyka jest wiek. Choroba ta dotyczy głównie kobiet powyżej 50. roku życia, chociaż coraz częściej odnotowuje się przypadki raka piersi wśród kobiet młodszych, dla których często obserwuje się wyższy stopień zaawansowania choroby, nadekspresję receptora HER-2 czy występowanie podtypu potrójnie ujemnego⁷¹. Dodatkowo wykazano, iż wśród kobiet w tym samym wieku w okresie okołomenopauzalnym, osoby po menopauzie w porównaniu do kobiet będących jeszcze przed menopauzą charakteryzowały się niższym ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego. Ponadto, czynnikiem ryzyka w tym badaniu był wysoki wskaźnik BMI (ang. *body mass index*). U kobiet przed menopauzą obniżał, podczas gdy u kobiet po menopauzie zwiększał ryzyko zachorowania⁷².

Czynniki ryzyka związane ze zmianami genetycznymi stanowią 5-10%⁷³ i najczęściej związane są z mutacjami w genach supresorowych *BRCA1* oraz *BRCA2*. Nosicielstwo tych mutacji zwiększa ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego

dziesięciokrotnie. Dodatkowo mutacja w genie *BRCA1* koreluje z występowaniem potrójnie ujemnego raka gruczołu sutkowego, podczas gdy dla genu *BRCA2* wiąże się z występowaniem raka ER⁺⁷⁴. Innymi czynnikami predysponującymi do zachorowania na raka gruczołu sutkowego są mutacje w genach *TP53* czy *PTEN*^{75,76}.

Ważnym czynnikiem ryzyka jest także otyłość. Wykazano, że wśród kobiet otyłych przed menopauzą zmniejsza się ryzyko wystąpienia hormonozależnego typu nowotworu⁷⁷. Jednakże w innych badaniach wysoki wskaźnik BMI korelował z wystąpieniem potrójnie ujemnego typu nowotworu⁷⁸. Otyłość sprzyja procesom nowotworzenia, ponieważ tkanka tłuszczowa jest źródłem wielu czynników stymulujących odpowiedź układu odpornościowego tj. chemokin, cytokin czy czynników proangiogennych⁷⁹. Nadmierna ilość tkanki tłuszczowej pogłębia stan hipoksji zwiększając wydzielanie VEGF oraz leptyny przy jednoczesnym obniżeniu działającej przeciwingiennie adiponektyny⁸⁰. Ponadto czynniki wydzielane przez adipocyty (leptyna czy CCL2) rozwijają lokalny stan zapalny poprzez aktywację ścieżki NF- κ B, w znajdujących się w tym otoczeniu makrofagach, i promowanie wydzielania przez makrofagi głównie IL-6, TNF α , INF- γ ⁸⁰. Cytokiny zapalne mają wpływ na zahamowanie procesu apoptozy, wzmożenie proliferacji komórek nowotworowych, co w konsekwencji przekłada się także na ich zwiększoną zdolność do inwazji i przerzutowania⁸¹. Ponadto chroniczny stan zapalny jest jednym z czynników ryzyka zachorowania na raka gruczołu sutkowego⁸². Markerem stanu zapalnego w badaniach klinicznych jest głównie białko C-reaktywne (CRP), którego poziom oznaczany jest w osoczu⁸³. W meta-analizie danych wykazano korelację pomiędzy wysokim poziomem CRP a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi⁸⁴. Dodatkowo Visser i wsp. wykazali że podwyższony poziom CRP związany był w 20,2% przypadków z otyłością wśród kobiet w średnim wieku w porównaniu do 4,8% przypadków wśród kobiet z wagą prawidłową⁸⁵. W innych badaniach dowiedziono, iż wysoki poziom CRP korelował ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego, a jednocześnie wysoki poziom leptyny wiązał się z obniżeniem ryzyka. Ponadto w grupie kobiet przed menopauzą wysoki poziom TNF α zwiększał ryzyko zachorowania, a wysoki poziom leptyny korelował z jego obniżeniem⁸⁶. Wysoka gęstość mammograficzna piersi jest także jednym z ważnych czynników ryzyka⁸⁷. Wykazano, iż enzym cyklooksigenaza 2 (COX-2; ang. *cyclooxygenase 2*), który jest głównym czynnikiem indukującym chroniczny stan zapalny poprzez syntezę prostaglandyn, korelował ze zwiększoną

gęstością mammograficzną oraz zwiększonym depozytem kolagenu w tkankach⁸⁸. W mikrośrodowisku raka gruczołu sutkowego wykazano także korelację ze zwiększonym depozytem kolagenu a obecnością makrofagów CD163⁺ oraz wysokim poziomem COX-2 w zrębie guza⁸⁹.

Innymi czynnikami ryzyka zachorowania na raka gruczołu sutkowego są: nisko różnicowana, bogata w tłuszcze odzwierzęce dieta, spożywanie alkoholu, palenie papierosów, promieniowanie jonizujące⁹⁰⁻⁹⁴.

1.2.4. Makrofagi, jako czynnik sprzyjający rozwojowi raka gruczołu sutkowego

W przypadku raka gruczołu sutkowego obecność TAMs w obrębie guza wiąże się z gorszymi rokowaniami. Dodatkowo, wysoki poziom TAMs koreluje z trójjemnym typem raka i wysokim stopniem złośliwości⁹⁵. Najczęściej stosowanym markerem pozwalającym zidentyfikować w tkance obecność TAMs w analizie IHC jest cząsteczka CD68. Wykazano, iż napływ makrofagów CD68⁺ koreluje z większymi wymiarami guzów, wyższym stopniem złośliwości, przerzutami do węzłów chłonnych oraz naczyń krwionośnych, krótszym czasem przeżycia wolnego od progresji choroby oraz przeżycia całkowitego chorych na raka gruczołu sutkowego^{96,97}. Ponadto obecność makrofagów CD68⁺ i korelacja z gorszymi parametrami klinicznymi oraz wyższym ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych była charakterystyczna dla grupy pacjentek ze zdiagnozowanym trójjemnym rakiem⁹⁸, a także grupy pacjentek o podtypie raka ER⁺⁹⁹. Jednakże obserwowano również korelację pomiędzy występowaniem makrofagów CD68⁺ a pozytywnymi rokowaniami wyrażonymi w przeżyciu wolnym od nawrotów choroby¹⁰⁰.

Marker CD163 jest także bardzo często stosowany w badaniach klinicznych jako cząsteczka charakterystyczna dla makrofagów klasy M2^{101,97}. Obserwuje się, iż infiltracja makrofagów CD163⁺ koreluje z gorszą charakterystyką kliniczną pacjentek oraz, tak jak w przypadku makrofagów CD68⁺, zależy od podtypu nowotworu – dotyczy głównie trójjemnego raka oraz HER-2⁺^{95,97,102,103}. Wykazano także, iż obecność makrofagów CD11c⁺ w zrębie guza korelowała z większymi wymiarami guzów¹⁰⁴. Innymi stosowanymi markerami makrofagów w raku gruczołu sutkowego są CD204¹⁰⁵ oraz CD206¹⁰⁶, jednakże zgromadzone dane wciąż nie są wystarczające do zastosowania ich jako czynników prognostycznych.

Funkcje jakie pełnią TAMs w raku gruczołu sutkowego związane są głównie z promowaniem wzrostu guza oraz wzmaganiem procesów przerzutowania. Wykazano, że obecność makrofagów CD68⁺CD163⁺ korelowała z brakiem ekspresji receptorów ER α oraz PR, a także wysokim indeksem Ki67. Dodatkowo sprawdzono wpływ mediów kondycjonowanych znad makrofagów różnicowanych do klas M1 oraz M2 (różnicowanych z monocytów krwi obwodowej zdrowych ochotników) na poziom proliferacji komórek raka gruczołu sutkowego o podtypie luminalnym A – T47D. Wykazano zahamowanie proliferacji tych komórek oraz obniżenie poziomu Ki67 przy jednoczesnym obniżeniu poziomu receptora ER α w tych komórkach¹⁰⁷. W badaniach nad wpływem makrofagów na proliferację komórek MDA-MB-231 (ludzki model inwazyjnego raka gruczołu sutkowego, TNBC) zaobserwowano, że komórki typu M2 wpłynęły na zwiększenie proliferacji komórek nowotworowych oraz ich zdolności migracyjnych, a także promowały wzrost guza w modelu *in vivo* z użyciem myszy szczepu BALB/c¹⁰⁸. Badania z użyciem mysiego modelu raka gruczołu sutkowego (model PyMT – myszy transgeniczne posiadające ekspresję środkowego antygenu T wirusa *Polyoma*, u których rozwija się rak gruczołu sutkowego przerzutujący do płuc¹⁰⁹ – z nokautem genu *Csf1*) wykazały udział makrofagów w procesie angiogenezy w guzach pierwotnych¹¹⁰. Ponadto dowiedziono, iż VEGF-A wydzielany przez TAMs, które charakteryzował wysoki poziom receptora wiążącego angiopoetynę – TIE2, miał istotny wpływ na proces intrawazacji do okołoguzowych naczyń krwionośnych i przerzutowania komórek nowotworowych w mysim modelu PyMT. Zarówno zablokowanie kinazy TIE2, jak i jej liganda – angiopoetyny 2 wiązało się z zahamowaniem tych procesów^{111,112}. Dodatkowo badania grupy Quian i wsp. dowodzą udziału makrofagów w procesie zasiedlania narządów odległych. Wykazali oni, że mechanizm zależny od aktywacji ścieżki CCL2-CCR2 w TAMs promował rekrutowanie makrofagów o charakterystyce prozapalnej w miejsce tworzenia niszy premetastatycznej, gdzie głównym czynnikiem aktywującym wynacznienie i zasiedlanie komórek nowotworowych był VEGF-A¹¹³.

Innym ważnym aspektem wpływającym na promowanie rozwoju raka gruczołu sutkowego jest obecność macierzystych komórek nowotworowych. Badania przeprowadzone z użyciem ludzkich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego wykazały, że kokultura makrofagów klasy M1 (CD44⁺/CD24⁻) z komórkami nowotworowymi wpływała na zwiększenie odsetka komórek ALDH1⁺ (ang. *aldehyde*

dehydrogenase 1) użytego w tym badaniu jako marker CSCs. Wykazano, że proces ten związany jest z aktywacją ścieżki Lin-28B-let-7-HMGA2 przez wydzielane przez makrofagi cytokiny prozapalne. Zablockowanie tych ścieżek wiąże się z zahamowaniem wywołanych obecnością komórek M1 markerów CSCs¹¹⁴. Inne badania dowodzą także wpływu wydzielanej przez makrofagi IL-8 oraz chemokiny GRO (ang. *growth-regulated oncogene*) na powstawanie macierzystych komórek nowotworowych w raku gruczołu sutkowego. Proces ten związany jest z aktywacją ścieżki JAK/STAT3¹¹⁵.

Wpływ makrofagów na mikrośrodowisko raka gruczołu sutkowego jest związany także z ich oddziaływaniem na efektorowe komórki układu odpornościowego, w tym głównie limfocyty T¹¹⁶. Wykazano, iż wydzielana przez komórki TAMs kinaza CaMKK2 (ang. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*) hamuje aktywność cytotoksyczną limfocytów T w mysim modelu raka gruczołu sutkowego¹¹⁷. Ponadto badania *in vivo* w modelu MMTV-PyMT wykazały wpływ wydzielanej przez TAMs IL-10 na zahamowanie proliferacji i aktywacji limfocytów T CD8⁺. Blokada napływu TAMs w otoczenie guza poprzez zastosowanie agonisty receptora CSF1R na ich powierzchni nie tylko przyczyniła się do zwiększenia populacji limfocytów T CD8⁺ w guzie, ale także wpłynęła na uwrażliwienie komórek nowotworowych na stosowany w tym badaniu chemioterapeutyk (paklitaksel)¹¹⁸. Ponadto makrofagi w środowisku objętym hipoksją, o wysokim poziomie czynnika HIF-1 α , wykazały podwyższoną ekspresję liganda PD-L1 hamującego aktywację limfocytów T w badaniach z użyciem mysiego oraz ludzkiego modelu raka gruczołu sutkowego¹¹⁹.

1.3. Witamina D₃

1.3.1. Metabolizm i podstawowe mechanizmy działania witaminy D₃

Witamina D jest związkiem z grupy sekosteroidów rozpuszczalnych w tłuszczach występującym w dwóch formach: ergokalcyferolu (D₂) oraz cholekacyferolu (D₃). Oprócz żywności bogatej w witaminę D (np. ryby, produkty mleczne, wątroba zwierzęca, jaja) głównym źródłem cholekacyferolu jest jego synteza w skórze (do 90%), w której z 7-dehydrocholesterolu w wyniku przemian fotochemicznych (promieniowanie UVB – 290 -315 nm) powstaje prewitamina D₃. Powstały w wyniku spontanicznej izomeryzacji (z prewitaminy D₃) cholekacyferol, transportowany w krwiobiegu w postaci związanej z białkiem wiążącym witaminę D₃ (DBP; ang. *vitamin D-binding protein*) lub albuminą, ulega w wątrobie reakcji hydroksylacji przy węglu C25, katalizowanej przez enzymy

z rodziny cytochromów P450 (najwyższe powinowactwo wykazuje CYP2R1¹²⁰). W ten sposób powstały kalcydiol (25(OH)D₃; 25-hydroksycholekalcyferol), jako główny metabolit witaminy D₃ krążący w organizmie, przedostaje się do nerek i tam ulega przekształceniu przez enzym 1 α -hydroksylazę (CYP27B1) do aktywnego biologicznie metabolitu witaminy D₃- kalcytriolu (1,25(OH)₂D₃; 1,25-dihydroksycholekalcyferol). Za katabolizm kalcytriolu odpowiada enzym 24-hydroksylaza (CYP24A1) przekształcający 1,25(OH)₂D₃ (ale także 25(OH)D₃¹²¹) do 24,25(OH)₂D₃ oraz 1,24,25(OH)₃D₃. Poziom kalcytriolu regulowany jest m.in. przez stężenie jonów wapnia oraz fosforu, parathormon (PTH), a także przez ujemne sprzężenie zwrotne związane z samym kalcytriolem, który wpływa bezpośrednio na aktywację CYP24A1 i hamowanie CYP27B1^{6,7,122}.

Stężenie 25(OH)D₃ w osoczu jest głównym markerem używanym w ocenie poziomu witaminy D₃ w organizmie. Okres półtrwania kalcydiolu, który wynosi 2-3 tygodni, jest zdecydowanie dłuższy w porównaniu do 4-6 godzinnego okresu półtrwania kalcytriolu¹²³. Zgodnie z nowelizacją rekomendacji dotyczących zasad suplementacji oraz leczenia witaminą D z 2018 roku możemy, w zależności od stężenia 25(OH)D₃ w osoczu, wyróżnić następujący podział: stężenie toksyczne (>100 ng/mL), stężenie wysokie (>50-100 ng/mL), stężenie optymalne (>30-50 ng/mL), stężenie suboptymalne (>20-30 ng/mL) oraz niedobór znaczny (>10-20 ng/mL)¹²⁴. Instytut Medycyny (*Institutes of Medicine*, IOM, amerykańska organizacja pozarządowa, Waszyngton, USA) oraz międzynarodowe Towarzystwo Endokrynologiczne (*The Endocrine Society*) uwzględniając plejotropowe i klasyczne działanie witaminy D oraz populację ogólną i chorych przyjęło jako wartość minimalną stężenia docelowego witaminy D, mierzonego jako stężenie 25(OH)D₃, 30 ng/mL, a wartości poniżej tego poziomu uznano za niedostateczne¹²³. Za prawidłowe stężenie (optymalne) 25(OH)D₃ dla zapewnienia korzyści zdrowotnych według zaleceń dla Europy Środkowej uznano stężenie 30- 50 ng/mL¹²⁵.

Podstawową funkcją kalcytriolu w organizmie jest zapewnienie homeostazy wapniowo-fosforanowej oraz wpływ na procesy związane z mineralizacją kości. Kalcytriol pełni funkcje biologiczne poprzez wiązanie się z receptorem dla witaminy D (VDR; ang. *vitamin D receptor*). VDR jest białkiem z grupy steroidowych receptorów jądrowych. Składa się on z dwóch funkcjonalnych domen: domeny wiążącej DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*) na końcu NH₂ oraz domeny wiążącej ligand (LBD, ang. *ligand binding domain*) na końcu COOH, oddzielonych od siebie regionem zawiasowym

(ang. *hinge region*). Po związaniu liganda i heterodimeryzacji z receptorem dla retinoidów X (RXR, ang. *retinoid X receptor*), VDR działa jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję wielu genów^{126,127}. Wykazano, że ponad 3000 genów posiada w swojej strukturze regiony zwane elementami odpowiedzi receptora witaminy D (VDRE)¹²⁸, mogą one ulegać aktywacji lub represji pod jego wpływem. W przypadku hamowania transkrypcji genów elementy odpowiedzi nazywa się negatywnymi tzw. nVDRE¹²⁹. Oprócz działania na poziomie transkrypcji genów, kalcytriol w komórkach uruchamia także szlaki tzw. szybkiej odpowiedzi poprzez aktywację receptora błonowego szybkiej odpowiedzi na steroidy – 1,25(OH)₂D₃-MARRS (ang. *membrane-associated, rapid response steroid-binding*, inaczej także PDIA3 ang. *protein disulfide-isomerase A3*). Niegenomowa odpowiedź na kalcytriol wiąże się z translokacją jonów wapnia w poprzek błony komórkowej oraz aktywacją cząsteczek sygnałowych, takich jak fosfolipaza A, fosfolipaza C, PI3K, cAMP i aktywacją kinaz białkowych, np. kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK) czy kinazy białkowej C¹³⁰.

Ekspresję VDR, a także enzymów hydroksylujących 25(OH)D obserwuje się nie tylko w tkankach jelita, nerek czy kości, ale także w komórkach raka gruczołu sutkowego oraz wielu typach komórek układu odpornościowego, w tym w makrofagach^{131,132}.

1.3.2. Witamina D a rak gruczołu sutkowego – obserwacje kliniczne

Po raz pierwszy związek pomiędzy ryzykiem zachorowania na raka a ekspozycją na promienie słoneczne i witaminą D opisał w 1980 roku Garland i wsp¹³³. W kolejnych latach wzrosło zainteresowanie tym zagadnieniem i powstało wiele prac traktujących o korelacji pomiędzy niskim poziomem witaminy D a ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego, czy wpływem na rozwój choroby i mechanizmy związane z wieloma procesami komórkowymi prowadzącymi do zmian nowotworowych (prolifracja, różnicowanie, migracja, apoptoza).

W badaniach epidemiologicznych wśród kobiet z wysokim stężeniem 25(OH)D w surowicy (≥ 45 ng/mL) zaobserwowano niższe ryzyko zachorowania na raka piersi w porównaniu do kobiet ze stężeniem niskim (mierzone w sezonie letnim), podczas gdy w ogólnej analizie nie wykazano znamienych statystycznie korelacji¹³⁴. W innym badaniu, biorącym pod uwagę grupy kobiet z niskim i wysokim stężeniem witaminy D wykazano istotny wpływ wysokiego stężenia 25(OH)D na zmniejszenie śmiertelności z powodu raka piersi¹³⁵. W kontekście ryzyka zachorowania obserwowano także, że

w kwantylu pacjentek z najwyższym poziomem 25(OH)D obserwuje się aż o 45% niższe ryzyko wystąpienia raka piersi w porównaniu z kwantylem o stężeniach najniższych¹³⁶. Obserwowano także, że w grupie pacjentek po menopauzie niski poziom witaminy D korelował z gorszymi parametrami rokowniczymi¹³⁷. Dodatkowo, meta analiza z 2019 roku wykazała odwrotną korelację pomiędzy stężeniem 25(OH)D w osoczu a ryzykiem zachorowania niezależnie od statusu menopauzalnego kobiet¹³⁸. W analizie badań klinicznych (RTC ang. *randomized controlled trials*) wykazano, że wpływ suplementacji witaminy D (ze średnią dawką dzienną wynoszącą 967 IU na dzień (ok. 24 µg/dzień) na zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka piersi nie był wyższy niż 30%¹³⁹. Jednakże w innym badaniu RTC – Women’s Health Initiative obserwowano, iż przyjmowanie dziennej dawki 400 IU witaminy D₃ (10 µg) oraz 1000 mg węglanu wapnia nie wpływało w sposób istotny na zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka piersi oraz innych raków inwazyjnych¹⁴⁰. Badanie o nazwie VITAL (ang. *Vitamin D and Omega-3 Trial*), w którym wzięło udział 25 871 uczestników oraz uczestniczek powyżej 55. roku życia zakładało otrzymywanie dziennej dawki 2000 IU witaminy D₃ (50 µg). Po pięciu latach obserwacji wyniki wstępne nie wskazały na wpływ suplementacji na zmniejszenie ryzyka zachorowania m.in. na raka gruczołu sutkowego, jednocześnie wskaźnik śmiertelności z powodu nowotworów (ogółem) był istotnie niższy w grupie otrzymującej witaminę D niż w grupie otrzymującej placebo¹⁴¹. Badanie kliniczne ViDA (ang. *Vitamin D Assessment*), które zakładało stosowanie witaminy D w dawkach miesięcznych 100 000 IU (2500 µg), nie wykazało żadnego wpływu suplementacji na zmniejszenie ryzyka zachorowania na nowotwory¹⁴². Podobne rezultaty otrzymano z badania Finnish Vitamin D Trial, jednak autorzy zaznaczają, że brak wpływu suplementacji może wynikać z prawidłowego osoczowego stężenia 25(OH)D wśród uczestników badania przed jej suplementacją¹⁴³.

1.3.3. Witamina D i mechanizmy jej działania w komórkach raka gruczołu sutkowego oraz jej wpływ na komórki występujące w mikrośrodowisku nowotworów

Kalcytriol, jak i białka związane z jego biologiczną funkcją (VDR, CYP24A1, CYP27B1) wpływają na szereg procesów komórkowych związanych z proliferacją, apoptozą, przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym, czy powstawaniem macierzystych komórek nowotworowych. W wielu badaniach wykazano, że niski poziom VDR związany jest z bardziej agresywnym typem raka gruczołu sutkowego. Dodatkowo jego obniżenie związane jest transformacją nowotworową co czyni komórki nowotworowe

mniej wrażliwymi na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu^{144,145}. Liczne badania wskazują także na udział receptora VDR w progresji raka gruczołu sutkowego. Efekt promowania wzrostu guza obserwowano u myszy z nokautem genu *Vdr*¹⁴⁶. W modelu 186FARN także obserwowano, iż wyciszenie genu *Vdr* w tych komórkach indukowało szybszy wzrost guza, a także promowało przerzutowanie komórek nowotworowych do wątroby¹⁴⁷. Wykazano również, że ścieżki sygnałowe związane z aktywnością kalcytriolu ulegają rozregulowaniu poprzez zmiany w poziomie CYP24A1 oraz CYP27B1. W wielu przypadkach związane jest to ze wzrostem poziomu białka CYP24A1 i obniżeniem CYP27B1, co sugeruje że w ten sposób komórki nowotworowe obniżają lokalne stężenie kalcytriolu w guzie^{144,148,149}. Wykazano także zależność przeciwnowotworowej funkcji kalcytriolu od białka CYP27B1 w myszach transgenicznym z nokautem genu *Cyp27b1*. Obserwowano, że traktowanie kalcytriolem hamowało powstawanie spontanicznych guzów u tych myszy, podczas gdy traktowanie nieaktywną biologicznie formą witaminy – 25(OH)D nie wpływało w żaden sposób na ich powstawanie czy wielkość, dowodząc tym samym ważnej funkcji 1 α -hydroksylazy na wczesnych etapach nowotworzenia¹⁵⁰.

Jednym z mechanizmów przeciwproliferacyjnego działania kalcytriolu w komórkach raka gruczołu sutkowego jest zwiększenie ekspresji genów kodujących inhibitory kinaz zależnych od cyklin (CKI) takich jak: *CDKN2D* (p19); *CDKN1A* (p21) i *CDKN1B* (p27), oraz zmniejszenie aktywności cyklin (np. CDK4/6), co w konsekwencji obniża poziom fosforylacji białka Rb, hamuje aktywację kompleksu czynnika transkrypcyjnego E2F i powoduje zatrzymanie komórek w fazie G1/G0¹⁵¹. Ponadto, wykazano, że w komórkach MCF-7 (ludzki model raka gruczołu sutkowego, ER⁺) indukcja C/EBP α powodowała wzrost mRNA genu *VDR*, co przyczyniło się do zwiększenia przeciwproliferacyjnej aktywności kalcytriolu wobec tych komórek¹⁵². W innych badaniach wykazano, że kalcytriol w modelu *in vivo* (MMTV-PyMT) hamował wzrost guza poprzez obniżenie poziomu Ki67, cykliny D1 oraz białka ErbB2¹⁵³.

Kalcytriol wpływa także na proces apoptozy poprzez obniżanie poziomu białek anty-apoptotycznych (Bcl-2, Bcl-x) i/lub zwiększanie poziomu pro-apoptotycznych białek (Bax, Bak)^{154–156}. Ponadto, obserwuje się wpływ kalcytriolu na ścieżkę sygnałową RAS/MEK/ERK. Wykazano, że w komórkach linii ludzkich raków gruczołu sutkowego MCF-7 oraz MDA-MB-231 kalcytriol obniżył poziom białka RAS, co w konsekwencji spowodowało zahamowanie dalszej kaskady fosforylacji MEK oraz ERK1/2

prowadzącej do zahamowania ekspresji genów związanych z proliferacją komórek⁸. Kalcytriol wpływa także na indukcję genów supresorowych np. *BRCA1* oraz *TP53*^{157,158}. Ponadto, wykazano że zmutowane pro-apoptotyczne białko p53 (R280K oraz R273H) w komórkach linii MDA-MB-231 oraz MDA-MB-468 może oddziaływać bezpośrednio z VDR i modulować jego aktywność transkrypcyjną w kierunku obniżenia ekspresji genów pro-apoptotycznych¹⁵⁹.

Kalcytriol wpływa także na procesy związane z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT; ang. *epithelial-mesenchymal transition*) będącym jednym z etapów przerzutowania. Wykazano, że w komórkach linii MDA-MB-231 kalcytriol w stężeniu 100 nM zwiększył poziom E-kadheryny (która jest markerem komórek o fenotypie nabłonkowym) poprzez demetylację promotora genu *CDH1*¹⁶⁰. Ponadto, wykazano że deficyt witaminy D₃ w diecie myszy MMTV-PyMT przyspieszył proces spontanicznego przerzutowania do płuc, co było skorelowane ze wzrostem poziomu markera EMT – białka z rodziny palca cynkowego E-Box wiążącego Homeobox 1 (*Zeb1* (ang. *zinc finger E-box binding homeobox 1*) oraz wysokim poziomem CXCL12 (ang. *C-X-C motif chemokine 12*)¹⁶¹. W badaniach prowadzonych z użyciem komórek linii MDA-MB-231 z wyciszoną ekspresją VDR, wykazano wzrost ich właściwości inwazyjnych *in vivo* oraz indukcję przerzutowania do kości. Obserwacje te korelowały z obniżeniem poziomu białek świadczących o fenotypie nabłonkowym komórek, takich jak: E-kadheryna, F-aktyna, β -katenina oraz z podwyższeniem poziomu wimentyny w tych komórkach¹⁶². Kolejnym mechanizmem przeciwnowotworowego działania kalcytriolu wobec komórek raka gruczołu sutkowego jest jego wpływ na zahamowanie czynnika pro-angiogenego VEGF. Wykazano, że w modelu *in vivo* z użyciem linii komórkowej MCF-7 z nadekspresją VEGF traktowanie myszy kalcytriolem wpłynęło na obniżenie liczby naczyń krwionośnych w guzie bez wpływu na jego wymiary¹⁶³. Dodatkowo kalcytriol ma wpływ na różnicowanie komórek raka gruczołu sutkowego. W badaniach Santos-Martinez i wsp. obserwowano, że ekspozycja komórek na kalcytriol stymuluje ekspresję receptora ER α w komórkach ER α ⁻ (SUM-229PE), ponadto wykazano jego funkcjonalność poprzez stosowanie związków z grupy antyestrogenów (fulwestrant oraz tamoksyfen). Obserwowano zwiększenie wrażliwości tych komórek na przeciwproliferacyjne działanie antyestrogenów po wstępnej stymulacji kalcytriolem¹⁶⁴.

Oprócz bezpośredniego wpływu na komórki nowotworowe kalcytriol moduluje także aktywność innych komórek znajdujących się w zrębie guza, takich jak: komórki

śródbłonna, fibroblasty towarzyszące nowotworom (CAFs; ang. *cancer-associated fibroblasts*) czy liczne infiltrujące guz komórki układu odpornościowego. Chung i wsp. wykazali, że komórki śródbłonna izolowane z guzów myszy z nokautem genu *Vdr* obarczonych komórkami linii TRAMP-C2 (mysi model raka prostaty) były odporne na przeciwo proliferacyjną aktywność kalcytriolu. Dodatkowo guzy tych myszy charakteryzowały się szybszą kinetyką wzrostu, a także wyższą ekspresją HIF-1 α , VEGF oraz angiopoetyny, co było zbieżne z silniejszym unaczynieniem tych guzów w porównaniu z myszami z prawidłową ekspresją VDR¹⁶⁵. Dowiedziono także, że kalcytriol hamuje indukowaną przez VEGF proliferację komórek śródbłonna, zmniejsza ich zdolność do formowania wydłużonych struktur i połączeń między komórkami w żelu kolagenowym¹⁶³. Kalcytriol wpływa także na CAFs w raku trzustki. Dowiedziono, że hamował on wydzielanie przez te komórki egzosomów, które zawierały miR-10a-5p (wykazujący działanie onkogenne), hamując tym samym właściwości migracyjne i inwazyjne komórek PANC-1¹⁶⁶. W raku jelita grubego obserwowano, że kalcytriol hamował pronowotworową aktywację CAFs, niezależnie od poziomu VDR w komórkach nowotworowych. Ponadto wysoki poziom VDR w CAFs korelował z dłuższym czasem przeżycia wśród pacjentów z rakiem jelita grubego¹⁶⁷. W komórkach CAFs izolowanych z guzów pierwotnych pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego wykazano wpływ kalcytriolu na obniżenie poziomu genów związanych z proliferacją (*NRG1*, *WNT5A*, *PDGFC*), przy jednoczesnym wzroście genów związanych z modulacją odpowiedzi odpornościowej (*NFKBIA*, *TREM-1*)¹⁶⁸.

Stan zapalny jest jednym z czynników indukujących powstawanie nowotworów¹. Wiele badań wskazuje także na przeciwzapalną aktywność witaminy D w TME². Wykazano, że kalcytriol obniża poziom iNOS, COX-2, prostaglanyn, IL-1 β , IL-6, a także MMP-3¹⁷⁰⁻¹⁷². W badaniu klinicznym wśród pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty wykazano, że wysoki poziom witaminy D koreluje z niższym poziomem COX-2 w guzach¹⁷³. Aktywacja receptorów PD-1 przez PD-L1 działa hamująco na odpowiedź zapalną. Wykazano, że kalcytriol bezpośrednio zwiększa ekspresję PD-L1 oraz PD-L2 w komórkach śródbłonna oraz komórkach linii mieloidalnej, co skutkuje obniżeniem aktywności limfocytów CD4⁺ oraz CD8⁺¹⁷⁴. Dodatkowo Palmer i wsp. dowiedli, że niedobór witaminy D sprzyja odpowiedziom autoimmunologicznym poprzez nadmierną aktywację komórek Th17, Th9 oraz zahamowanie limfocytów T regulatorowych produkujących IL-10¹⁷⁵. Kalcytriol hamuje także infiltrację komórek układu

odpornościowego do tkanki śledziony myszy, ekspresję *P65* oraz *ROR γ T* i *Il17* co zapobiega różnicowaniu się limfocytów w kierunku Th17¹⁷⁶. Wiele badań dowodzi także wpływu kalcytriolu na komórki dendrytyczne (DC; ang. *dendritic cells*). Wykazano, że hamuje on ich różnicowanie oraz zdolność do stymulacji odpowiedzi odpornościowej. Traktowanie komórek DC agonistą receptora VDR wpłynęło, oprócz obniżenia ekspresji cząsteczek kostyulujących limfocyty T na ich powierzchni (CD80, CD40, CD86), także na obniżenie ekspresji *IL-12* i podwyższenie ekspresji *IL-10 in vitro*^{177,178}.

1.3.4. Wpływ witaminy D₃ na makrofagi

Makrofagi (zarówno ludzkie, jak i mysie) wykazują konstytutywną ekspresję VDR oraz CYP27B1 co sprawia, że są komórkami, które odpowiadają na kalcytriol jak i same są w stanie go produkować. Dowiedziono, że czynnikami stymulującymi ekspresję CYP27B1 w makrofagach jest INF- γ czy LPS^{179–181}.

Kalcytriol wpływa na proces różnicowania monocytów do makrofagów. W roku 1981 wykazano, że komórki linii HL-60 (ludzka białaczka promielocytarna) pod wpływem kalcytriolu różnicują się w kierunku makrofagów. W badaniach grupy Abu-Amer i wsp. dowiedziono również, że makrofagi wywodzące się ze szpiku kostnego (BMDMs; ang. *bone marrow-derived macrophages*) myszy pozbawionych witaminy D w diecie charakteryzowały się niższym stopniem proliferacji oraz obniżoną aktywnością cytotoksyczną, czy poziomem antygenów specyficznych dla makrofagów. Natomiast dodatek *in vitro* kalcytriolu korygował obserwowane zmiany, co sugeruje jego istotny wpływ na proces różnicowania makrofagów¹⁸². Wykazano także udział mikroRNA w procesie stymulowanego kalcytriolem różnicowania makrofagów wywodzących się z monocytów (MDMs; ang. *monocyte-derived macrophages*). Analiza transkryptomu wykazała zmiany w 199 genach (związanych z modulowaniem odpowiedzi odpornościowej i stresem komórkowym) z czego aż 68% ulegało podwyższeniu pod wpływem kalcytriolu w porównaniu do kontroli. Zintegrowana analiza ekspresji miRNA oraz mRNA wykazała obniżenie poziomu trzech cząsteczek miRNA (miR-1972, miR-1273h-5p oraz miR-665), które regulują ekspresję genów *PDCD1LG2*, *CD274* (kodujące ligandy receptora PD-1, związanego z hamowaniem odpowiedzi zapalnej), ale także *IL-1B* (kodujący IL-1 β , będącą induktorem odpowiedzi zapalnej)¹⁸³.

Ponadto wykazano, że kalcytriol zwiększa właściwości cytotoksyczne makrofagów wobec patogenów poprzez zwiększenie produkcji białek, takich jak: defensyna β 2 czy

katelicyna (CAMP)¹⁸⁴. Obserwowano także, iż niedobory witaminy D₃ korelują ze zmniejszeniem aktywności kwaśniej fosfatazy i wydzielania H₂O₂, czynników istotnych w przeciwbakteryjnej aktywności makrofagów¹⁸⁵. W innych badaniach, prowadzonych z użyciem komórek pochodzenia monocytarnego, wykazano natomiast stymulowane kalcytriolem obniżenie poziomu receptorów TLR2, TLR4 oraz TLR9 przy jednoczesnym podwyższeniu poziomu cząsteczki CD14, co mimo wszystko wpłynęło na redukcję wrażliwości tych komórek na wzorce molekularne związane z patogenami (PAMPs; ang. *pathogen-associated molecular patterns*). Obserwowano zahamowanie translokacji czynnika transkrypcyjnego NFκB do jądra komórkowego i obniżenie fosforylacji białek p38 oraz p42/44, markerów świadczących o indukcji ścieżki sygnałowej związanej z aktywacją receptorów TLR. Poprzez zastosowanie agonisty receptora VDR (ZK159222) dowiedziono, że obserwowany efekt zależny jest od aktywacji VDR¹⁸⁶.

Kalcytriol ma wpływ także na proces polaryzacji makrofagów poprzez regulację ekspresji cytokin pro- lub przeciwzapalnych oraz poprzez wpływ na zmiany poziomu antygenów specyficznych dla makrofagów. Wykazano, że ekspresja *CD14* oraz *CD11b* ulega podwyższeniu w komórkach linii THP-1 (model komórkowy wywodzący się z komórek pochodzenia monocytarnego) pod wpływem działania kalcytriolu w sposób zależny od aktywacji ścieżki sygnałowej PI3K¹⁸⁷. Kalcytriol wpływa także na obniżenie poziomu cząsteczek, takich jak: MHCII¹⁸⁸ czy CD80 oraz CD86, co w konsekwencji hamuje aktywność limfocytów T CD4⁺¹⁸⁹. Wykazano, że makrofagi wywodzące się z nasierdziowej tkanki tłuszczowej zwierząt karmionych karmą z deficytem witaminy D wykazały cechy charakterystyczne dla makrofagów klasy M1, w porównaniu do grupy zwierząt karmionych karmą z jej prawidłowym poziomem. Ponadto, obserwowano korelację wysokiego poziomu 25(OH)D w osoczu ze wzrostem poziomu markera CD206 – charakterystycznego dla klasy makrofagów M2¹⁹⁰. Wpływ kalcytriolu na polaryzację do klasy makrofagów M2 wykazali także Liang i wsp. w modelu mysich makrofagów RAW 264.7. Poddając komórki działaniu kalcytriolu zaobserwowali zwiększenie poziomu białka Tim-3 (uznawanego za nowy czynnik wpływający na proces różnicowania makrofagów) oraz podwyższenie poziomu sekrecji IL-10 i TGFβ przy jednoczesnym obniżeniu poziomu cytokin zapalnych TNFα oraz IL-6¹⁹¹. Co więcej, w komórkach RAW 264.7 (mysie makrofagi pochodzące z organizmu obciążonego nowotworem wywołanym wirusem mysiej białaczki Abelsona) stymulowanych kalcytriolem wykazano obniżenie ekspresji genu kodującego iNOS, co korelowało

z obniżeniem wydzielania NO przez te komórki¹⁹². W badaniach Young i wsp. wykazano w mysim modelu uszkodzenia tkanki płuc (z użyciem czynnika wywołującego proces włóknienia w płucach), że witamina D₃ zwiększyła zdolność do autofagii w napływających w miejsce uszkodzenia makrofagach. Ponadto, zmieniała polaryzację makrofagów z klasy M1 do M2 (obserwowano obniżenie ekspresji mRNA TNF α oraz IL-6, przy jednoczesnym podwyższeniu IL-10 oraz TGF β w porównaniu do kontroli)¹⁹³. Obserwuje się także, że metabolizm kalcytriolu w komórkach MDMs zależy jest od kierunku ich polaryzacji. Wykazano, że komórki MDMs różnicowane do klasy makrofagów M2a produkują więcej kalcytriolu w porównaniu do MDMs klas M2c, M1 oraz M0. Ponadto wykazano, że MDMs produkują także metabolit witaminy D: 3-epi-25-hydroksy-witaminę D. Dowiedziono także, że degradacja aktywnej formy witaminy D w tych komórkach odbywa się przez CYP24A1¹⁹⁴.

Istnieje kilka prac badawczych dotyczących bezpośredniego oddziaływania kalcytriolu na makrofagi w raku gruczołu sutkowego. W badaniach z użyciem mysich komórek raka gruczołu sutkowego – E0771 wykazano *in vivo*, że u myszy suplementowanych witaminą D₃ obserwuje się niższy w porównaniu do grupy kontrolnej odsetek infiltrujących węzły chłonne oraz znajdujących się w śledzionie makrofagów¹⁹⁵. Zhang i wsp. wykazali, że kokultura makrofagów RAW 264.7 z komórkami mysiego raka gruczołu sutkowego – 4T1 wpływa na obniżenie w nich poziomu VDR (podobny efekt wykazano także wobec ludzkiej linii komórkowej MCF-7), dodatkowo obniża poziom E-kadheryny przy jednoczesnej indukcji alfa aktyny mięśni gładkich (α -SMA ang. *α -smooth muscle actin*). Wykazano, że czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowany wynik jest wydzielany przez makrofagi TNF α , natomiast kokultura makrofagów z komórkami 4T1 z nadekspresją VDR nie prowadzi do zmian w poziomie tych białek, nie obserwuje się także efektu wzmaganie ich zdolności do migracji oraz inwazji¹⁹⁶, sugerując tym samym istotny udział VDR w komórkach nowotworowych w zapobieganiu wpływowi makrofagów na wzmaganie ich pronowotworowych właściwości. W tych badaniach jednak nie sprawdzano bezpośredniego wpływu kalcytriolu na makrofagi, jednakże w badaniach *in vivo* wykazano, że traktowanie kalcytriolem myszy obarczonych komórkami 4T1 z nadekspresją VDR hamowało przerzutowanie tych komórek do płuc. W 65-80% przypadków przerzutującego raka gruczołu sutkowego miejscem obecności ognisk przerzutowych jest szpik kostny¹⁹⁷. Obecność przerzutów w kościach związana jest ze znacznym wzrostem osteolizy. Quinn

i wsp. wykazali, że TAMs izolowane z guzów pierwotnych raka gruczołu sutkowego w kulturze ze szczurzymi osteoblastami (UMR 106) w obecności kalcytriolu oraz M-CSF różnicowały się w kierunku osteoklastów wykazujących obecność markerów, takich jak: kwaśna fosfataza oporna na winian (TRAP; ang. *tartrate-resistant acid phosphatase*) oraz receptor dla witronektyny (VNR; ang. *vitronectin receptor*)¹⁹⁸. Staquicinie i wsp. dowiedli, że stosowanie peptydu CSSTRESAC (wykazującego powinowactwo do receptora witaminy D₃ – PDIA3 (inaczej także 1,25(OH)₂D₃-MARRS) powoduje zmianę polaryzacji makrofagów izolowanych z guzów EF43.*fgf4* (komórki mysiego raka gruczołu sutkowego, TNBC) w kierunku M1, co wyrażało się we wzroście ekspresji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , TNF α czy IL-6, przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji cytokin przeciwzapalnych TGF β , IL-10 oraz Arg-1. Natomiast stosowanie kalcytriolu w połączeniu z CSSTRESAC hamowało obserwowane efekty, obserwowano także iż kalcytriol (wykazując wyższe powinowactwo) konkuruje z badaną cząsteczką o miejsce wiążące w kieszeni hydrofobowej białka DBP. W badaniach *in vivo* CSSTRESAC opóźniał wzrost guza, oraz liczbę makrofagów M2 w guzie. W tej pracy wykazano także, że receptor PDIA3 może być nowym markerem makrofagów klasy M2 i celem terapeutycznym, sugerując udział kalcytriolu w pronowotworowym ukierunkowaniu makrofagów¹⁹⁹.

W badaniach prowadzonych w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN wykazano, że kalcytriol w makrofagach wywodzących się ze szpiku myszy zdrowych (BMDMs) wpłynął na wzmocnienie polaryzacji makrofagów w kierunku M2. Obserwowano wzrost ekspresji mRNA *Cd206* (gen kodujący CD206) oraz *Spp1* (gen kodujący osteopontynę, OPN), jak również zwiększenie poziomu CCL2 i aktywność Arg-1 w makrofagach stymulowanych do klasy M2 i poddanych działaniu kalcytriolu w porównaniu do kontroli nietraktowanej. Jednocześnie traktowanie kalcytriolem makrofagów stymulowanych do klasy M1 obniżało ekspresję mRNA *Cd80* oraz *Spp1*, a także poziom wydzielania IL-1, IL-6, OPN. Ponadto medium kondycjonowane znad komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1 (CM; ang. *conditioned medium*) w obecności kalcytriolu wykazało silniejszy wpływ na wzrost ekspresji mRNA *Vdr* w komórkach BMDM, niż pozostałe stosowane CM (znad komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 67NR oraz linii prawidłowej Eph4-Ev). Wykazano także, że medium znad komórek M2 różnicowanych w obecności kalcytriolu

silnie stymulowało migrację komórek 4T1 oraz 67NR przez fibronektynę i kolagen typu IV²⁰⁰.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Niedobór witaminy D związany jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi – jest to jedno z przeważających stwierdzeń wynikające z badań obserwacyjnych, jednak liczne opracowania danych klinicznych nie rozstrzygają jednoznacznie tego zagadnienia⁸.

Komórki zmienione nowotworowo posiadają zmieniony metabolizm oraz zaburzone szlaki sygnałowe powiązane z różnymi mechanizmami działania witaminy D, w związku z tym w różny sposób odpowiadają na jej właściwości przeciwproliferacyjne. Ponieważ wyniki wcześniejszych badań wykazały wzmacnianie właściwości przerzutowych komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1 pod wpływem działania kalcytriolu¹⁰ (jest to model niewrażliwy *in vitro* na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu) postanowiono poszerzyć wiedzę na temat wpływu witaminy D na skomplikowaną sieć zależności pomiędzy składowymi mikrośrodowiska guza.

Celem niniejszej pracy jest charakterystyka makrofagów (TAMs*, BMDMs** oraz MDMs***) towarzyszących przerzutującym i nieprzerzutującym rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D₃/kalcytriolu na ich polaryzację pro- lub przeciwnowotworową. Cele szczegółowe to:

1. Ocena ukierunkowania pro- lub przeciwnowotworowego TAMs jako skutek wysokich stężeń lub niedoboru witaminy D₃ w organizmie, a także podawania kalcytriolu w korelacji z właściwościami komórek nowotworowych, które determinują skład i funkcjonowanie swojego mikrośrodowiska w mysich modelach raka gruczołu sutkowego (4T1, 67NR, E0771).
2. Charakterystyka BMDMs pochodzących ze szpiku myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ oraz traktowanych kalcytriolem, obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 oraz 67NR.
3. Charakterystyka BMDMs (pochodzących ze szpiku myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych znad komórek 4T1.
4. Ocena ukierunkowania pro- lub przeciwnowotworowego TAMs jako skutek wysokich stężeń lub niedoboru witaminy D₃ w organizmie pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego zlokalizowanym miejscowo.
5. Charakterystyka fenotypowa makrofagów MDMs i ich zdolności do polaryzacji *ex vivo* do klas makrofagów M0, M1, M2a, M2c pod wpływem działania kalcytriolu, pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego zlokalizowanym miejscowo oraz w stadium rozsianym.

*TAMs – makrofagi towarzyszące nowotworom (ang. *tumor associated macrophages*); ** BMDMs – makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego (ang. *bone marrow derived macrophages*); *** MDMs – makrofagi pochodzące z monocytów krwi obwodowej (ang. *monocyte derived macrophages*)

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Badania przeprowadzone z użyciem mysiego modelu raka gruczołu sutkowego

3.1.1. Linie komórkowe

Do badań przeprowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy użyto mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego: 4T1 (ATCC, ang. American Type Cell Culture, Rockville, MD, USA), 67NR (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI, USA) oraz E0771 (University of Queensland, Tumor Microenvironment Laboratory, WIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia). Hodowle komórkowe prowadzono w wilgotnej atmosferze, w temperaturze 37°C oraz 5% CO₂, na szalkach plastikowych (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Pasaże wykonywano co 2-3 dni z użyciem roztworu trypsyno-wersenu o pH=8 (Pracownia Chemii Ogólnej (PChO) IITD PAN, Wrocław, Polska), a skład mediów hodowlanych dla poszczególnych linii oraz ich krótką charakterystykę przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka linii komórkowych użytych w eksperymentach *in vivo* oraz *in vitro*.

Nazwa linii komórkowej	Krótką charakterystyka	Skład medium hodowlanego
4T1	Pochodzi ze spontanicznie wyrosłego guza u samicy myszy szczepu BALB/c ²⁰¹ . Mysi model ludzkiego raka gruczołu sutkowego w IV stadium zaawansowania. Nabłonkowa morfologia komórek, model scharakteryzowano jako spontanicznie przerzutujący, m.in. do płuc, kości ²⁰² . Komórki odporne na 6-tioguaninę ²⁰³ , niewrażliwa na przeciwproliferacyjne działanie kalcytriolu ¹⁰ .	RPMI G.MAX (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA), płodowa surowica bydłęca 10%, (FBS ang. <i>fetal bovine serum</i> , HyClone GE Healthacre, Chicago, Illinois, USA), glukoza 3,5 g/L (Merck, Darmstadt, Niemcy), 1mM pirogronian (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), streptomycyna 0,1 mg/mL i penicylina 100 U/mL (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska).
67NR	Pochodzi z tego samego guza co linia 4T1 (BALB/c) ²⁰¹ . Nie wykazano jej spontanicznego przerzutowania ²⁰² . Komórki wrażliwe na przeciwproliferacyjne działanie kalcytriolu ¹⁰ .	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA), płodowa surowica cielęca 10% (CBS; ang. <i>calf bovine serum</i> , ATCC, Manassas, Wirginia, USA), L- Glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), aminokwasy 1% (Merck, Darmstadt, Niemcy), streptomycyna 0,1 mg/mL i penicylina 100 U/mL (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska).

E0771	Mysi model raka gruczołu sutkowego wyizolowany ze spontanicznie wyrosłego guza u myszy szczepu C57BL/6. Nabłonkowa morfologia komórek ²⁰⁴ . Komórki niewrażliwe na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu ²⁰⁵ .	Płyn Dulbecco (Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA), 10% FBS, GE Healthacre, Chicago, Illinois, USA), L-Glutamina 2 mM (Merck, Darmstadt, Niemcy), imipenem 2,5 µg/ml (Fresenius Kabi, Bad Hamburg, Hessen, Niemcy)
--------------	--	--

Przygotowywanie mediów kondycjonowanych z nad komórek 4T1 oraz hodowla mysich komórek raka gruczołu sutkowego (4T1, 67NR, E0771) w obecności kalcytriolu in vitro

Komórki 4T1 wysiewano w liczbie $0,2 \times 10^6$ na szalkę hodowlaną o średnicy 10 cm. Dwie godziny po wysianiu komórek dodawano kalcytriol w stężeniu 100 nM, etanol (jako kontrola rozpuszczalnika, w stężeniu 0,1% (o/o) – taka sama ilość jak w stosowanym stężeniu kalcytriolu) lub czyste medium hodowlane. Stymulacja kalcytriolem trwała przez 72 godziny. Następnie, warstwę komórek o około 90% konfluencji przemywano dwukrotnie PBS i dodawano świeże medium bez dodatku FBS. Po 24 godzinach inkubacji, tak uzyskane medium kondycjonowane (CM) zbierano, odwirowywano ($10\,000 \times g$, 10 min, 4°C) i mrożono do dalszych analiz (-80°C). Kontrolę medium (KM) stanowiło medium bez FBS, które zostało dodane na pustą szalkę, przechowywane w inkubatorze przez 24 godziny, a następnie poddane mrożeniu, tak samo jak w przypadku CM. Schemat generowania oraz użycia mediów CM przedstawiono na Ryc.5 w rozdziale 3.1.3.

Jednocześnie po 72 godzinnej inkubacji z kalcytriolem (100 nM)/0,1% etanolem/kontrolnym medium, przygotowywano lizaty z komórek linii 4T1, 67NR oraz E0771 w celu ich dodatkowej charakterystyki – analizy qPCR i western blot – szczegóły w sekcjach dotyczących poszczególnych metod. Po upływie czasu inkubacji, warstwę komórek przemywano dwukrotnie PBS, a komórki lizowano w 1 mL roztworu trizolu (do analiz qPCR; TRI Reagent ®; MRC Inc., Cincinnati, OH, USA) lub 100 µL buforu RIPA (do analiz western blot; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.1.2. Badania *in vivo*

Badania zostały przeprowadzone z udziałem ok. 6-8 tygodniowych samic myszy szczepu BALB/c oraz C57BL/6 pochodzących z laboratoriów Charles River (Sulzfeld,

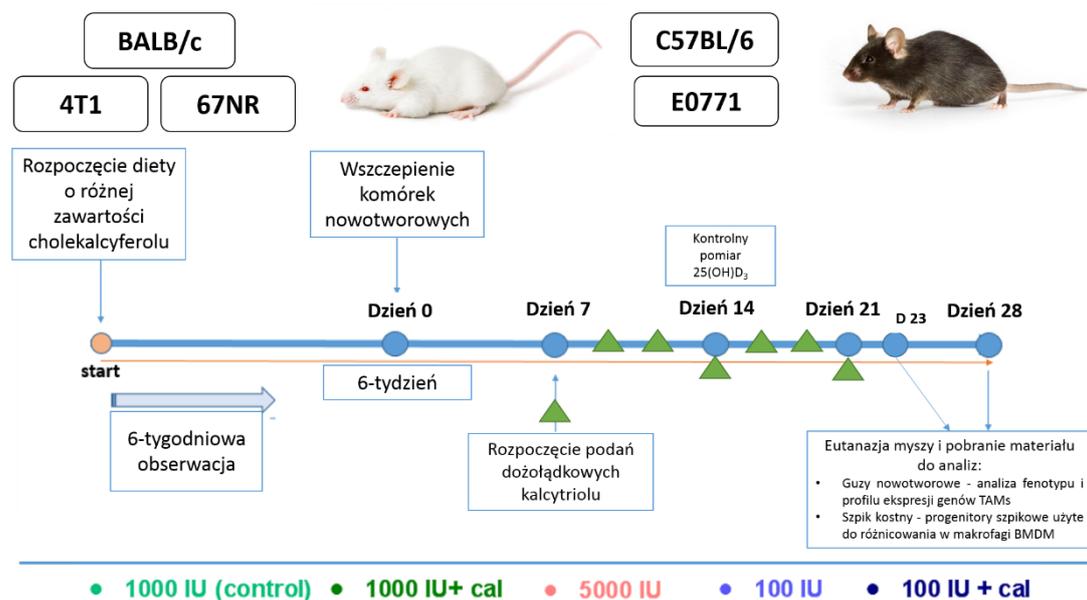
Germany). Zwierzęta utrzymywano w pomieszczeniach klimatyzowanych, z regulacją oświetlenia dzień/noc 12/12, w warunkach SPF w Zwierzętarni Doświadczalnej IITD PAN we Wrocławiu. Wszystkie procedury (wymiany karmy, ważenie myszy, pomiary guzów) odbywały się w warunkach aseptycznych. Doświadczenia przeprowadzono za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu o numerze 66/2018, zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2010/63/EU na temat ochrony zwierząt laboratoryjnych wykorzystywanych do celów naukowych.

Myszy przez cały czas trwania eksperymentu miały dostęp do karmy o różnej zawartości cholekalcyferolu (witaminy D₃) (AIN67, ZooLab, Sędziszów, Poland). Po okresie 4 tygodni mierzono poziom metabolitów witaminy D₃ w osoczu celem kontroli efektywności stosowanej diety do uzyskania statystycznie istotnych zmian w poszczególnych grupach, które przedstawiały się następująco: 1000 IU cholekalcyferolu/kg – grupa o normalnej zawartości witaminy D₃ w diecie (grupa kontrolna); 5000 IU cholekalcyferolu/kg – grupa z wysoką zawartością witaminy D₃ w diecie; 100 IU cholekalcyferolu/kg – grupa o niskiej zawartości witaminy D₃ w diecie. Zmiany w poziomie metabolitów witaminy D₃ sprawdzano po 4 tygodniu podawania karmy, natomiast istotne statystycznie zmiany w ich poziomie uzyskano w 5 tygodniu eksperymentu. W 6 tygodniu wszczepiano myszom komórki nowotworowe w liczbie: 1×10^4 , 2×10^5 , 5×10^4 odpowiednio dla komórek 4T1, 67NR oraz E0771. Wszczepienia dokonano drogą iniekcji ortotopowej do podściółki tłuszczowej gruczołu sutkowego w zawiesinie płynu Hanksa (PChO, Wrocław, Polska) z matryzelem (Matrigel Corning Inc., Nowy Jork, NY, USA) w stosunku 9:1 i objętości końcowej zawiesiny 50 μ L. W 7 dniu od wszczepienia komórek nowotworowych rozpoczęto dodatkowe podania dożołądkowe kalcytriolu w grupach 1000 IU oraz 100 IU (grupy opisano dalej jako 1000 IU + cal oraz 100 IU + cal). Podań dokonywano w dniach 7, 9, 11, 14, 16, 18 oraz 21 (łącznie 7 podań), sondą dożołądkową w dawce 1 μ g/kg masy ciała. Kalcytriol przygotowywano w 80% roztworze glikolu polietylenowego przygotowanego w PBS. W trakcie trwania eksperymentu monitorowano poziom 25(OH)D₃ pobierając krew z żyły jarzmowej. Kontrolę dla eksperymentu stanowiły myszy nieobarczone nowotworem, traktowane w analogiczny sposób, jak opisano powyżej.

Szczegółowy schemat eksperymentu przedstawiono na Ryc. 3. Wyniki i opis wykonania eksperymentu *in vivo* znajdują się także w publikacji Anisiewicz i wsp.²⁰⁵,

a tkanki pozyskane od zwierząt zostały poddane analizom w ramach niniejszej rozprawy (analizy dotyczące makrofagów), a także w ramach rozprawy doktorskiej pani Natalii Łabędź (analizy dotyczące fibroblastów).

W dniu zakończenia eksperymentu pobierano materiał do dalszych analiz (guzy nowotworowe, krew oraz szpik kostny). Szczegółowy opis procedur dotyczących przygotowania poszczególnych tkanek znajduje się w poniższych sekcjach niniejszego rozdziału.



Rycina 3. Schemat eksperymentu *in vivo*. Myszy szczepów BALB/c oraz C57BL/6 karmiono karmą o różnej zawartości witaminy D₃ przez 6 tygodni. Następnie, w dniu wyznaczonym jako dzień 0 wszczęto ortotopowo komórki nowotworowe odpowiednio: 4T1 i 67NR myszom szczepu BALB/c oraz E0771 myszom szczepu C57BL/6. Dietę kontynuowano przez cały czas trwania eksperymentu. W dniu 7 (od momentu kiedy guzy były wyczuwalne) rozpoczęto podania dożołądkowe kalcytriolu w dawce 1 µg/kg w grupach myszy na diecie kontrolnej (1000 IU + cal) i niedoborowej (100 IU + cal). Podania kalcytriolu kontynuowano trzy razy w tygodniu do dnia 28 (dla myszy BALB/c) lub dnia 23 (dla myszy C57BL/6). W dniu zakończenia eksperymentów pobrano krew, guzy i szpik do dalszych analiz. Nazewnictwo grup doświadczalnych oraz odpowiadające im kolory prezentowane są w dolnej części ryciny: ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

3.1.3. Badania *ex vivo* z użyciem komórek szpiku kostnego

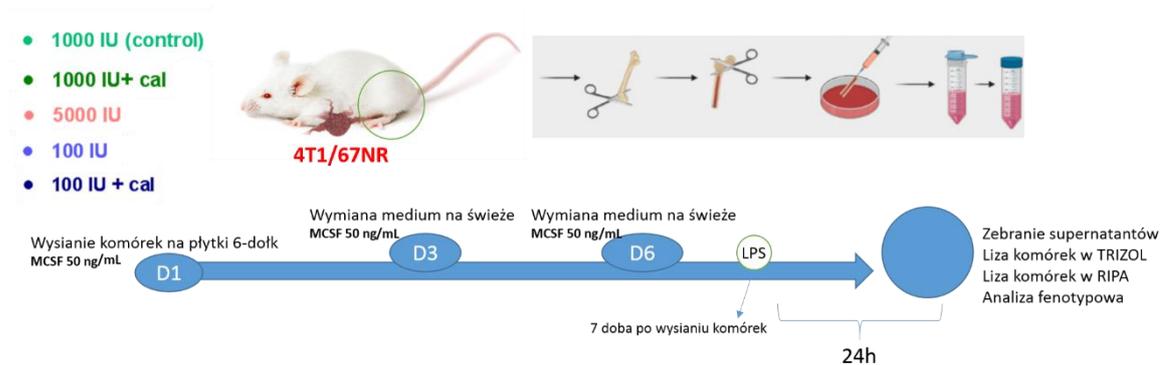
Po procedurze eutanazji, kości (udową i piszczelową) myszy szczepu BALB/c obciążonych nowotworem 4T1, 67NR lub zdrowych oddzielono od tkanki mięśniowej za pomocą skalpela i nożyczek. Następnie umieszczono je w zimnym roztworze antybiotyków w PBS (PChO IITD, Wrocław, Polska) bez naruszania stawu kolanowego i biodrowego w celu utrzymania sterylności szpiku kostnego. Kolejnym krokiem było usunięcie nasad obu kości w warunkach sterylnych, a każdą z nich płukano z obu stron za pomocą strzykawki i igły (0,5 × 25 mm) w roztworze PBS do całkowitej objętości

10 mL. Zawiesinę komórek szpiku kostnego wirowano ($432 \times g$, 7 min, 4°C), a następnie zawieszono w roztworze surowicy płodowej cieląt (FBS; ang. *fetal bovine serum*) z DMSO (9:1; Tocris Bioscience, Bristol, Wielka Brytania) i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz. W dniu rozmrożenia, liczbę i żywotność komórek określano używając roztworu błękitu trypanu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

W celu różnicowania BMDMs, komórki szpiku wysiewano na płytki 6-dołkowe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) w liczbie 2×10^6 komórek na dołek. BMDMs hodowano w medium (DMEM Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 4 nM L-glutamina (Merck, Darmstadt, Niemcy); 10% (o/o) FBS, 1% (o/o) roztworu aminokwasów MEM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); 0,1 mg/mL streptomycyny i 100 U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)) z dodatkiem mysiego rekombinowanego czynnika wzrostu kolonii makrofagów (M-CSF; 50 ng/mL; ang. *macrophage colony-stimulating factor*; BioLegend, San Diego, CA, USA) w 37°C w wilgotnej atmosferze z 5% CO_2 łącznie przez 9 dni. W dniu 3 i 6 połowę medium poddawano odświeżeniu nową porcją medium zawierającego 50 ng/mL M-CSF. 24 godziny przed zabezpieczeniem materiału, hodowlę komórek płukano dwukrotnie roztworem PBS i wymieniano na medium z dodatkiem lipopolisacharydu (LPS) w stężeniu 100 ng/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) stosowanego do stymulacji komórek do produkcji oraz wyrzutu cytokin. Po upływie czasu inkubacji medium z komórek BMDMs zbierano i zabezpieczano w temperaturze -80°C , a komórki przemywano dwukrotnie PBS i zbierano w 1 mL roztworu trizolu (TRI Reagent®; MRC Inc., Cincinnati, OH, USA) do analizy qPCR lub w 50 μL buforu RIPA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) do analiz western blot. Ponadto, zbierano komórki do analizy fenotypowej wykonywanej przy użyciu cytometrii przepływowej (schemat eksperymentu Ryc.4).

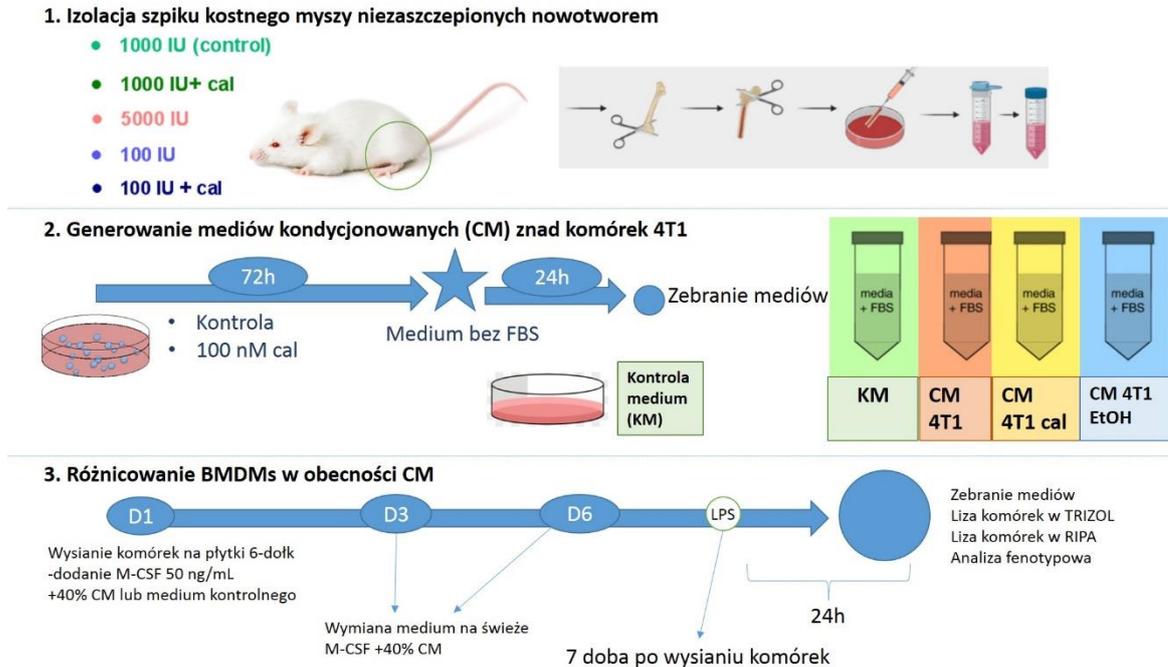
Dodatkowo szpik kostny myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 sprawdzono pod kątem obecności przerzutów. W tym celu wykorzystano oporność komórek 4T1 na 6-tioguaninę (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Na szalkę o średnicy 10 cm wysiewano zawiesinę komórek w liczbie 10 mln, po 24 godzinach od rozpoczęcia hodowli komórek szpikowych dodawano 6-tioguaninę w stężeniu 10 μM . Po 14 dniach hodowli (37°C ; 5% CO_2 ; wilgotność 95%) barwiono wyrosłe kolonie

komórek 4T1 używając 20% (w/o) roztworu fioletu krystalicznego (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w 80% (o/o) metanolu (Avantor, Gliwice, Polska) w PBS i liczone.



Rycina 4. Schemat eksperymentu *ex vivo* z użyciem komórek szpikowych myszy BALB/c obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Komórki wysiewano w medium z dodatkiem M-CSF. Po serii wymian medium w dniach 3 oraz 6, komórki stymulowano LPS przez 24 godziny w 7 dobie po rozpoczęciu hodowli. W dniu 8 zbierano supernatant z nad komórek (test ELISA), a komórki wykorzystano do analizy fenotypowej lub wykonano lizę komórkową w odczynniku TRIZOL (qPCR) lub w buforze RIPA (western blot). M-CSF: 50 ng/mL; LPS: 100 ng/mL.

Szpik kostny zdrowych myszy BALB/c izolowano zgodnie z powyższym opisem. Komórki szpikowe pochodzące od myszy nieobciążonych nowotworem wykorzystano do różnicowania BMDMs w obecności mediów kondycjonowanych pochodzących z nad komórek 4T1 (CM 4T1). Procedura generowania CM została opisana w rozdziale 3.1.1. Proces różnicowania makrofagów trwał 7 dni, do tego celu użyto medium z dodatkiem 40% (o/o) mediów kondycjonowanych i 50 ng/mL M-CSF. W dniach 1, 3 i 6 dokonywano wymian medium na świeże. W 7 dniu, po przepłukaniu komórek roztworem PBS, dodawano medium z 100 ng/mL LPS. Po 24 godzinach, zebrano supernatanty (do testu ELISA) oraz komórki do cytometrii przepływowej. Do analizy qPCR komórki lizowano w 500 μ L roztworu trizolu oraz w 50 μ L buforu RIPA do analizy western blot – szczegóły w sekcjach dotyczących poszczególnych metod. Schemat eksperymentu – Ryc.5.



Rycina 5. Schemat eksperymentu *ex vivo* z użyciem komórek szpikowych pochodzących od zdrowych myszy BALB/c (punkt 1). Wykorzystano medium kontrolne (KM) oraz media kondycjonowane (CM) pochodzące z nad hodowli komórek 4T1 (CM 4T1) oraz z nad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal) lub etanolem (kontrolą rozpuszczalnika dla kalcytriolu w stężeniu 0,1%) (CM 4T1 EtOH) (punkt 2 - procedura kondycjonowania medium opisana w podrozdziale 4.1.1.). Proces różnicowania komórek BMDMs w obecności mediów kondycjonowanych trwał 7 dni (w dniach 3 oraz 6 dokonywano wymiany medium). W 7 dobie od rozpoczęcia hodowli komórki traktowano LPS przez kolejne 24 godziny, a następnie zbierano supernatant z nad komórek (test ELISA), a same komórki wykorzystywano do analizy fenotypowej oraz wykonano ich lizę w odczynniku TRIZOL (qPCR) lub w buforze RIPA (western blot). M-CSF: 50 ng/mL; LPS: 100 ng/mL (punkt 3).

3.2. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem tkanek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego

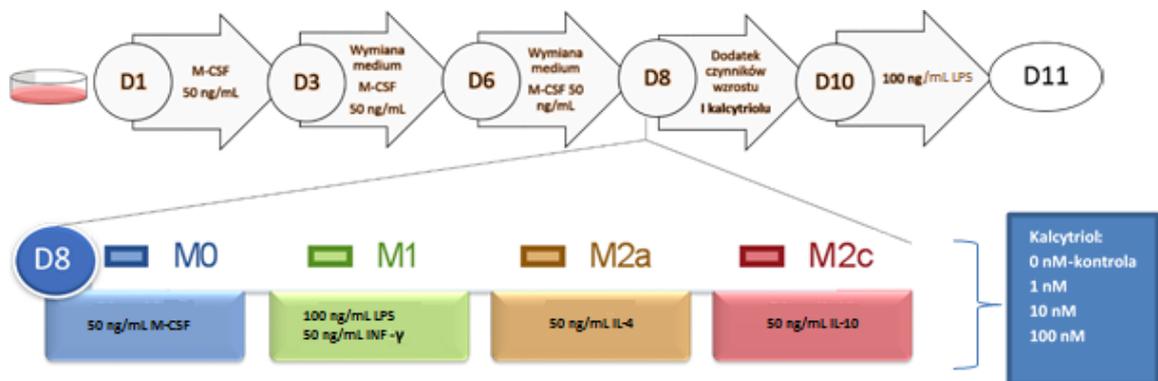
Na badania z użyciem tkanek (krew i fragmenty guzów) pochodzących od pacjentek leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii (DCOPiH) uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o numerze 603/2018 oraz 855/2019. Kryteriami włączenia pacjentek do badania było rozpoznanie inwazyjnego raka gruczołu sutkowego w biopsji (bez względu na stopień zaawansowania), zakwalifikowanie do pierwotnego leczenia chirurgicznego (wymiar guza większy niż 1 cm i bez znacznika po biopsji) oraz podpisanie świadomej zgody przez pacjentki na udział w badaniu. Od zakwalifikowanych pacjentek, oprócz pobrania fragmentu tkanki zmienionej nowotworowo (kontrolę nad wycięciem fragmentu guza sprawował patomorfolog), pobierano również krew żylną (pacjentki ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego oraz w stadium uogólnionym/rozsiałym). Wszystkie pacjentki ze

zlokalizowanym miejscowo rakiem w ocenie klinicznej (w tym w badaniach obrazowych) według klasyfikacji TNM wykazywały status N0 (brak przerzutów do węzłów chłonnych) oraz M0 (brak przerzutów odległych), natomiast w ostatecznym wyniku pooperacyjnego badania histopatologicznego preparatu pooperacyjnego wykazano wśród niektórych pacjentek obecność przerzutów w dole pachowym. Pełne dane kliniczne oraz wyniki ankiet otrzymano od DCOPIH w formie pliku bez danych wrażliwych pacjentów.

3.2.1. Izolacja i różnicowanie monocytów z krwi obwodowej pacjentek

Krew żylną pacjentek zakwalifikowanych do badania w liczbie 3 ampulek o objętości 9 ml każda (zawierających EDTA-S-Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) wirowano w temperaturze 4°C celem zabezpieczenia osocza do dalszych analiz (-80 °C). Po odwirowaniu pozostałe elementy morfotyczne krwi rozcieńczano dwukrotnie w płynie Hanksa (PChO, Wrocław, Polska). Otrzymaną zawiesinę nawarstwiano na roztwór ficollu w temperaturze pokojowej (Ficoll Paque™ Premium – 1.073 GE Healthcare, Chicago, IL, USA) do dwóch probówek 15 ml. Próbkę wirowano (400 × g przez 30 min) w temperaturze pokojowej. Następnie, zbierano powstały kożuch frakcji mononuklearów- PBMC, który tworzy się na powierzchni ficollu. Komórki płukano dwukrotnie poprzez wirowanie w roztworze PBS, następnie zawieszano w końcowej objętości 5 mL i liczone. W zależności od liczby uzyskanych komórek, dodawano odpowiednią ilość przeciwciała anti-CD14 koniugowanego z kulkami magnetycznymi (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) stosując zalecenia producenta – 20 µL przeciwciała oraz 80 µL buforu do separacji na każde 10 milionów komórek. Dokładną procedurę separacji magnetycznej opisano w rozdziale 3.3.1. Wyseparowane w ten sposób monocyty liczone i wysiewano na minimum 8 dołeków płytki 12-dołkowej (Greiner Cell Suspension, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) w liczbie 5×10^5 komórek na dołek, w objętości 1 mL medium hodowlanego (RPMI G.MAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 5% (o/o) FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); 5% (o/o) surowicy końskiej (HS; ang. *horse serum*, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4 mM l-glutaminy; 2,5 g/L glukozy; 1 mM pirogronianu; 1% (o/o) aminokwasów (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); 0,1 mg/mL streptomycyny i 100 U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)) z dodatkiem ludzkiego rekombinowanego M-CSF w stężeniu 50 ng/mL (BioLegend, San Diego, CA, USA). Wykonywano także sprawdzenie czystości izolacji dla co trzeciej próbki stosując przeciwciała anti- CD14 BV-421 oraz anti-CD45. Średnia czystość próbek (procent

komórek CD14⁺) wynosiła około 90%. Wyizolowane monocyty z krwi obwodowej pacjentek po 7 dniowym procesie różnicowania do makrofagów przy użyciu czynnika M-CSF (50 ng/mL; wymiany medium w dniach 3 oraz 6) poddawano polaryzacji do poszczególnych klas makrofagów (MDMs; ang. *monocyte derived macrophages*; szczegóły Ryc. 6) bez lub w obecności kalcytriolu stosowanego w trzech różnych stężeniach (1 nM, 10 nM, 100 nM) od ósmego dnia hodowli. Następnie po 48 godzinach różnicowania do klas makrofagów: M0 (komórki wyjściowe, czynnik stymulujący: M-CSF 50 ng/mL), M1 (czynnik stymulujący: LPS 100 ng/mL, INF- γ 50 ng/mL), M2a (czynnik stymulujący: IL-4 50 ng/mL) oraz M2c (czynnik stymulujący: IL-10 50 ng/mL), przeprowadzano 24 godzinną aktywację komórek za pomocą LPS w stężeniu 100 ng/mL. W dniu 11 komórki zbierano używając roztworu akutazy (300 μ L/dolek; Accutase solution, Merck, Darmstadt, Niemcy). Zebrane w powyższy sposób komórki z poszczególnych grup były zawieszane w 1 mL roztworu PBS z dodatkiem 2% (o/o) FBS i poddawane analizie cytometrycznej (3.3.4.) w celu zmierzenia poziomu/obecności markerów na ich powierzchni rozróżniających je na subpopulacje makrofagów M1, M2a bądź M2c i monitorowania ich zmian pod wpływem różnicowania w obecności kalcytriolu.



Rycina 6. Schemat różnicowania monocytów z krwi obwodowej (MDMs) pacjentek do klas makrofagów M0, M1, M2a, M2c w obecności kalcytriolu stosowanego w stężeniach 1 nM, 10 nM oraz 100 nM. Komórki różnicowano w obecności M-CSF od dnia rozpoczęcia hodowli do 7 doby (D8) z wymianą mediów na świeże w dniach 3 oraz 6. W ósmym dniu komórki MDMs poddawano działaniu czynników różnicujących je do klas makrofagów: M0 (komórki wyjściowe, czynnik stymulujący: M-CSF 50 ng/mL), M1 (czynnik stymulujący: LPS 100ng/mL, INF- γ 50 ng/mL), M2a (czynnik stymulujący: IL-4 50 ng/mL) oraz M2c (czynnik stymulujący: IL-10 50 ng/mL). Proces różnicowania prowadzono bez lub w obecności kalcytriolu stosowanego w stężeniach 1 nM; 10 nM oraz 100 nM. Po 48 godzinach komórki poddawano działaniu LPS przez kolejne 24 godziny. W dniu 11 zbierano komórki do analizy fenotypowej (analiza cytometryczna). M-CSF – ang. *macrophage colony stimulating factor*: 50 ng/mL; LPS – ang. *Lypopolisaccharide*: 100 ng/mL; INF- γ – *interferon gamma*: 50 ng/mL; IL-4 – interleukina 4: 50 ng/mL; IL-10 – interleukina 10: 50 ng/mL.

3.3. Metody

3.3.1. Separacja magnetyczna TAMs z guzów pochodzenia mysiego i ludzkiego oraz monocytów z krwi obwodowej pacjentek

Fragmety guzów, zarówno pochodzenia mysiego, jak i ludzkiego, zabezpieczone w momencie pobrania w roztworze medium hodowlanego przenoszono na jałową szalkę Petriego (w przypadku guzów pochodzących z tkanki pooperacyjnej pacjentek medium zawierało primocin w stężeniu 0,1 mg/mL (InvivoGen, San Diego, CA, USA). W celu zachowania jak najwyższej żywotności izolowanych komórek wszystkie etapy izolacji przeprowadzano na lodzie. Fragment guza zalewano 1 mL medium (RPMI G.MAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 5% (o/o) FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); 5% (o/o) surowicy końskiej (HS; ang. *horse serum*, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4 mM L-glutaminy; 2,5 g/L glukozy; 1 mM pirogronianu; 1% (o/o) roztworu aminokwasów (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); 0,1 mg/mL streptomycyny i 100 U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska)) i dokonywano mechanicznej dezintegracji tkanki za pomocą skalpela. Wstępnie rozdrobniony materiał przenoszono do probówki (10 mL) i uzupełniano do objętości 4 mL medium z dodatkiem 1 mg/mL enzymów kolagenazy IV (Collagenase from *Clostridium histolyticum*; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) oraz DNAzy I (Roche, Bazylea, Szwajcaria) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godziny z lekkim wytrząsaniem. Następnie otrzymany w ten sposób homogenat przesączało przez filtr (*cell strainer*) o wielkości porów 70 µm do jałowej probówki (50 mL) i uzupełniano do objętości 20 mL roztworem PBS z 2% (o/o) FBS. Zawiesinę komórek wirowano (10 min, 300 × g, 4°C), a następnie po zawieszeniu w 5 mL buforu do separacji, liczone i oceniano żywotność komórek.

Kolejne czynności są zbieżne dla materiału pochodzącego z krwi oraz guzów. Do każdego z dalszych etapów izolacji używano buforu, w skład którego wchodził PBS o pH 7,2 oraz 0,5% (w/o) BSA (ang. *bovine serum albumin*) i 2 mM EDTA (oba odczynniki z Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), którego użyto aby zapobiegać niechcianej agregacji komórek podczas separacji i odczytu w cytometrze przepływowym.

Po otrzymaniu zawiesin komórkowych, do separacji stosowano przeciwciała anti-CD14 lub anti-F4/80 połączone z kulkami magnetycznymi w przypadku izolacji odpowiednio ludzkich lub mysich monocytów/makrofagów (Miltenyi Biotec, Auburn,

CA, USA). Używano następującego przelicznika przeciwciała/bufor: 20 μ L/80 μ L przeciwciała anti-CD14 oraz 10 μ L/90 μ L przeciwciała anti-F4/80 na każde 10^7 komórek. W przypadku materiału pochodzącego z guzów stosowano dodatkowo 5 minutowe blokowanie receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał używając w tym celu przeciwciał anti-CD16/CD32 (TruStain FcX BioLegend, San Diego, CA, USA; numery katalogowe dla anti-ludzkich i anti-mysich przeciwciał odpowiednio #422302 oraz #101320) zwiększając tym samym czystość separacji. Inkubację z przeciwciałami prowadzono przez 30 min w temperaturze 4°C. Po upływie tego czasu zawiesinę komórek płukano i ponownie zawieszano w buforze (1 mL). Kolumnę do separacji (MS) umieszczano w polu magnetycznym i aktywowano płuczając ją 1-krotnie objętością 500 μ L buforu. Następnie, nawarstwiano roztwór komórek i po grawitacyjnym przejściu płynu przez kolumnę, płukano ją 3-krotnie objętością 500 μ L buforu i umieszczano (po procesie płukania już poza polem magnetycznym) w probówce (10 mL) i wypychano tłokiem objętość 1 mL buforu przez kolumnę, w której znajdować powinny się komórki CD14 dodatnie (materiał pochodzenia ludzkiego) bądź F4/80 dodatnie (materiał pochodzenia mysiego). W ten sposób wyseparowane komórki poddawano dalszym analizom.

TAMs izolowane z guzów myszy obarczonych komórkami 4T1 oraz 67NR poddano krótkoterminowej hodowli (72 godziny) w celu oczyszczenia materiału po separacji z martwych komórek (medium hodowlane tożsame ze stosowanym w przypadku BMDMs – bez dodatku M-CSF, płytka 12-dołkowa (Greiner Cell Suspension, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Następnie 24 godziny przed lizą w TRI Reagent® TAMs stymulowano LPS (100 ng/mL). Tak przygotowany materiał przechowywano w temperaturze -80 °C do dalszych analiz (Real-time PCR).

3.3.2. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA

Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Wszystkie próbki zabezpieczone w TRI Reagent® (MRC Inc., Cincinnati, OH, USA) poddane zostały procesowi izolacji całkowitego RNA przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH, Tustin, CA, USA). Po wykonaniu protokołu izolacji zgodnie z instrukcją producenta (stosując traktowanie materiału DNAzą I bezpośrednio na kolumnach do izolacji, celem usunięcia pozostałości genomowego DNA) mierzono stężenie całkowitego RNA przy użyciu

spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA użyte do reakcji odwrotnej transkrypcji w przypadku TAMs stanowił materiał z 2-4 separacji, ponieważ ilość materiału zabezpieczona z pojedynczej separacji, na którą składał się materiał z 3 myszy, była niewystarczająca. W przypadku BMDMs materiał do reakcji odwrotnej transkrypcji stanowiło RNA pochodzące od 3 myszy. Maksymalnie 2,5 µg całkowitego RNA użyto do reakcji przy użyciu zestawu SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (dotyczy wszystkich próbek TAMs oraz BMDMs). Zestawu iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) używano do reakcji odwrotnej transkrypcji 1 µg RNA w przypadku eksperymentów dotyczących charakterystyki *in vitro* komórek linii 4T1, 67NR, E0771. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze Veritii 9902 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) w warunkach przedstawionych w Tabeli 2.

Tabela 2. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

iScript cDNA Synthesis Kit	SuperScript IV VILO Master Mix
25°C 5 min	25°C 5 min
50°C 10 min	46°C 20 min
85°C 5 min	85°C 5 min

Po zakończeniu reakcji odwrotnej transkrypcji próbki cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz.

Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA z użyciem płytek mikrofluidowych

Profil ekspresji 59 genów (numery identyfikacyjne użytych sond znajdują się w Tabelach 9-10, natomiast pełne nazwy genów załączono w Tabeli S-1) związanych z metabolizmem witaminy D lub właściwościami TAMs przeanalizowano za pomocą specjalnie zaprojektowanych macierzy qPCR (TaqMan™ Array Cards, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). W tym celu użyto 75 ng cDNA na jeden port płytki (mieszanka cDNA i wody DEPC oraz 2x TaqMan™ Gene Expression Master Mix) w objętości nakładanej: 100 µL/port. Eksperymenty przeprowadzone zostały zgodnie z instrukcją producenta w urządzeniu ViiA™7 przy użyciu odczynników TaqMan® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono stosując program: 95°C 15 sekund, następnie 60°C 60 sekund przez 40 cykli. Ekspresję genów na poziomie mRNA obliczano przy użyciu metody $\Delta\Delta C_t$, następnie

liczono parametr RQ, który oznaczał krotność zmian w stosunku do zastosowanego kalibratora (grupa 1000 IU). Dane analizowano przy użyciu oprogramowania ExpressionSuite Software v1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). W obliczeniach zastosowano kilka kontroli endogennych (w oprogramowaniu – *multiple controls analysis*; 18S-Hs99999901_s1; B2m-Mm00437762_m1; Actb-Mm01205647_g1; Gapdh-Mm99999915_g1).

Real-time PCR

Analiza ekspresji wybranych genów w pojedynczych próbkach prowadzona była z użyciem 25 ng cDNA na reakcję (10 μ L objętość końcowa reakcji), 2x TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz sond TaqMan™ wyszczególnionych w Tabeli 3 i dodatku wody wolnej od RNaz – DEPC. Każdą z próbek nakładano w dwóch technicznych powtórzeniach na płytkę 96 dołkową typu Fast, reakcję prowadzono jak w badaniach przesiewowych. Przeprowadzono porównawczą analizę $\Delta\Delta C_t$ i wybrano kontrole endogenne na podstawie wcześniej uzyskanych wyników (*Gapdh* dla BMDMs i *Hprt* dla linii komórkowych). Jako kalibratory do uzyskania parametru RQ wybrano nietraktowane kontrole lub grupę 1000 IU. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ExpressionSuite Software v1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Tabela 3. Lista użytych sond.

Nazwa genu		Numer identyfikacyjny sondy
<i>Gapdh</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Mm99999915_g1
<i>Hprt</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>	Mm00446968_m1
<i>Cyp27b1</i>	<i>cytochrome p450 family 27 subfamily b member 1</i>	Mm01165918_g1
<i>Cyp24a1</i>	<i>cytochrome p450 family 24 subfamily a member 1</i>	Mm00487244_m1
<i>Vdr</i>	<i>vitamin d receptor</i>	Mm00437297_m1
<i>Il6</i>	<i>interleukin 6</i>	Mm00446190_m1
<i>Il23a</i>	<i>interleukin 23 subunit alpha</i>	Mm00518984_m1
<i>Irf4</i>	<i>interferon regulatory factor 4</i>	Mm00516431_m1
<i>Fn1</i>	<i>fibronectin 1</i>	Mm01256744_m1
<i>Mrc1</i>	<i>mannose receptor c-type 1</i>	Mm01329362_m1

3.3.3. Analiza poziomu białek

Przygotowanie lizatów białkowych i pomiar poziomu białka

Lizaty białkowe przygotowywano w buforze RIPA z dodatkiem koktajlu inhibitorów fosfataz 2 i 3 oraz proteaz (1 μ L na 100 μ L buforu; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Materiał z eksperymentów *in vitro* stanowiły hodowle komórek

adherentnych, w związku z tym przed dodaniem buforu lizującego szalki płukano dwukrotnie roztworem PBS, a następnie po dokładnym zebraniu resztek PBS nakrapiano 100 μ L buforu RIPA na szalkę o średnicy 100 mm (lub 50 μ L w przypadku płytek 6-cio dołkowych). Po 20 minutowej inkubacji na lodzie, komórki zdrapywano skrobaczką, a gęstą zawiesinę lizatu przenoszono do probówek typu eppendorf i mrożono w ciekłym azocie. Próbkę przechowywano do dalszych analiz w temperaturze -80°C .

Tkanki z eksperymentów *in vivo*, zabezpieczone podczas sekcji w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C , były rozmrażane, ważone, a następnie przenoszone do ampulek homogenizacyjnych zawierających kulki ceramiczne i odpowiednią ilość buforu RIPA z koktajlem inhibitorów proteaz i fosfataz (na każde 300 mg tkanki przypadało 500 μ L buforu). Tak przygotowane próbki poddawano homogenizacji w urządzeniu FastPrep (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, USA) przy parametrach CY 24 \times 2, 5,5 m/s, t=40 s, cykl wykonano dwukrotnie. W ten sposób przygotowane lizaty przenoszono do probówek typu eppendorf, mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C .

W dniu przygotowywania materiału do analizy western blot próbki rozmrażano na lodzie. Następnie wirowano je przy $10\,000 \times g$ w 4°C przez 10 min, w celu pozbycia się gęstego osadu zdenaturowanego DNA. Supernatanty przenoszono do nowych probówek i oznaczano stężenie białka stosując zmodyfikowaną metodę Lowry'ego (DC Protein Assay Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Do określenia stężenia białka w próbce stosowano krzywą standardową BSA (2 mg/mL-0,125 mg/mL; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu czytnika Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Western blot

Próbki zawierające odpowiednią ilość białka przygotowywano w buforze $4 \times$ Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) zawierającym β -merkaptoetanol (Merck, Darmstadt, Niemcy). Na ścieżkę żelu nakładano objętość zawierającą 50 μ g białka, po uprzednim zagotowaniu mieszaniny w 98°C przez 5 minut.

Do rozdzielania elektroforetycznego (SDS-PAGE) stosowano żełe poliakrylamidowe o różnej gęstości (których skład przedstawiono w Tabeli 4), w zależności od wielkości (kDa) oznaczanych białek. Jako kontrolę wielkości białek

poddawanych detekcji stosowano marker mas PageRuler Prestained Protein Ladder (#26616; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Tabela 4. Skład żeli rozdzielających do elektroforezy białek. Podane w tabeli objętości roztworów dotyczą dwóch płytek o wymiarach 100 × 80 × 1 mm.

Żel zagęszczający			
Nazwa odczynnika	Dodawana objętość		
Bufor B	0,65 mL		
Bufor C	2,5 mL		
Woda MilliQ	1,8 mL		
10% APS	50 µL		
TEMED (N,N,N',N'-czterometrylo-1,2-diaminoetan)	10 µL		
Żel rozdzielający			
Nazwa odczynnika	7,5 %	10 %	12 %
Bufor B	3,75 mL	5,0 mL	6 mL
Bufor A	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL
Woda MilliQ	3,75 mL	2,5 mL	1,5 mL
10% (w/o) APS	75 µL	75 µL	75 µL
TEMED (N,N,N',N'-czterometrylo-1,2-diaminoetan)	15 µL	15 µL	15 µL

Bufor A: 45,4 g Tris-HCl, 1 g SDS (PChO IITD PAN, Wrocław, Polska); Bufor B: akrylamid/ bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); Bufor C: 15,1 g Tris-HCl, pH 6,8, 1 g SDS, 0,5 l woda MilliQ (PChO IITD PAN, Wrocław, Polska); APS: nadsiarazan amonu, (NH₄)₂S₂O₈ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); TEMED: N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (BioShop, Burlington, Ontario, Kanada).

Bufor do elektroforezy składał się z glicyny, SDS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), Trizma-Base (Merck, Darmstadt, Niemcy) rozpuszczonych w wodzie MilliQ w następujących proporcjach: 1,44 g; 0,302 g; 0,1 g/1 L. Rozdział prowadzono stosując parametry 100 V (parametr stały); 0,6 A; 300 W, przez około 1 godzinę i 20 minut. Kolejnym etapem był transfer póluchy rozdzielonych białek z żelu na membranę PVDF (6 × 9 cm) (Immobilon®- FL, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy) w bibułach (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) namoczonych w buforze do transferu zawierającym glicynę (7,2 g); Trizma-Base (1,51 g); metanol (100 mL; Polskie Odczynniki Chemiczne SA, Gliwice, Polska); 400 mL wody MilliQ (PChO IITD PAN, Wrocław, Polska). Proces ten trwał godzinę przy 0,3 A (parametr stały) oraz 25 V.

Membranę po transferze blokowano przez godzinę stosując w tym celu roztwór odłuszczonego mleka rozpuszczonego w TBS z 0,1% (o/o) Tween-20 (TBST). Następnie, po serii 4 płukań (4 × 5 min) membranę inkubowano przez noc w 4°C z roztworem przeciwciał sporządzonym w odpowiednim stężeniu (wyszczególnione

w Tabeli 5) w TBST z 5% (w/o) dodatkiem roztworu blokującego. Następnego dnia membrany inkubowano dodatkowe 30 minut w temperaturze pokojowej z przeciwciałem I-rzędowym. Po kolejnej serii płukań (TBST; 4 × 5 min) nakładano przeciwciało II-rzędowe – mysie antykrólicze IgG-HRP (1:10000) (sc-2357; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) lub kozie antymysie IgG-HRP (1:2000) (P0447; Dako, Carpinteria, CA, USA) w zależności od stosowanego przeciwciała I-warstwy. Po upływie czasu inkubacji membrany ponownie płukano (TBST; 4 × 5 min) i wykonywano odczyt z użyciem odczynnika Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Chemiluminescencję wizualizowano korzystając z urządzenia ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Analizę densytometryczną przeprowadzono przy użyciu programu ImageJ 1.48r (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) porównując intensywność prążków badanych białek do β -aktyny, która stanowiła kontrolę załadowania ścieżek.

Tabela 5. Przeciwciała użyte do immunodetekcji białek.

Białko	Pochodzenie	Klon/Numer katalogowy	Rozcieńczenie przeciwciał*
EpCAM	królicze	21050-1-AP	1:1000
OPN	królicze	22952-1-AP	1:1000
TGF β	królicze	21898-1-AP	1:500
Zeb1	królicze	21544-1-AP	1:1000
E-kadheryna	królicze	20874-1-AP	1:5000
VDR	królicze	D2K6W/ #12550	1:1000
CYP24A1	królicze	H-87/#sc-66851	1:1000
CYP27B1	królicze	EPR20271/ab206655	1:1000
MMP-3	królicze	JM46-22/NBP2-75931	1:1000
COX-2	mysie	33/Cox-2/ BD 610203	1:1000

*Przeciwciała rozcieńczano w roztworze TBST z dodatkiem roztworu blokującego (10:1)
 EpCAM – cząsteczka adhezji komórek nabłonkowych; OPN – osteopontyna; TGF β – transformujący czynnik wzrostu β ; Zeb1 – białka z rodziny palca cynkowego E-Box wiążącego Homeobox 1; VDR – receptor witaminy D; CYP24A1 – 24-hydroksylaza; CYP27B1 – 1 α -hydroksylaza; MMP-3 – metaloproteinaza 3; COX-2 – cyklooksygenaza 2

ELISA

W materiale pochodzącym z eksperymentów *in vivo* (lizaty z guzów, osocze, supernatanty znad krótkoterminowych hodowli TAMs) oraz *ex vivo* (supernatanty znad hodowli komórek BMDMs lub 4T1) wykonano oznaczenia IL-6, IL-23, FGF23, TGF β oraz PGE2 za pomocą techniki ELISA. Komercyjnie dostępne testy ELISA użyte to oznaczeń przedstawiono w Tabeli 6, a ich wykonanie było zgodne z instrukcjami producentów. W przypadku każdego rodzaju materiału, jak i oznaczanych czynników stosowane w teście stężenie dobierano indywidualnie przed przystąpieniem do

właściwych oznaczeń. Odczyt absorbancji został przeprowadzony z użyciem czytnika płytek Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), a otrzymane w ten sposób wyniki przeliczono na zawartość białka zgodnie ze sporządzoną krzywą standardową dla poszczególnych zestawów oznaczanych białek. Wzór krzywej standardowej o najdokładniejszym dopasowaniu wyznaczano w programie Curve Expert (Hyams, D. G., CurveExpert software, <http://www.curveexpert.net>, 2010).

Tabela 6. Lista komercyjnych zestawów ELISA użytych do detekcji poszczególnych cząsteczek.

Nazwa	Materiał badany	Producent
IL-6	Guzy, osocze, supernatanty	Wuhan EIAab Science Co, Ltd, Wuhan, Chiny
IL-23	Supernatanty	Bio-techné® R&D System, Minneapolis, USA
FGF23	Guzy, osocze	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TGFβ	Guzy, osocze	eBioscience, Amsterdam, NL
PGE2	Supernatanty	Bio-techné® R&D System, Minneapolis, USA

IL – interleukina; FGF23 – czynnik wzrostowy fibroblastów 23; TGFβ – transformujący czynnik wzrostu β; PGE2 – prostaglandyna E2

3.3.4. Analiza markerów powierzchniowych TAMs metodą cytometrii przepływowej

Analizę cytometryczną przeprowadzano na świeżo wyseparowanych z guzów TAMs w dniu eutanazji myszy lub w dniu otrzymania tkanki pooperacyjnej pacjentek. Analizowano także komórki BMDMs oraz MDMs w ostatnim dniu eksperymentów *ex vivo* prowadzonych w celu różnicowania mysich komórek szpikowych lub monocytów ludzkich do makrofagów (szczegółowy opis eksperymentów i uzyskania materiału znajduje się w sekcjach: 3.1.2; 3.1.3; 3.2.1 oraz 3.3.1). Komórki do analizy zbierano w roztworze PBS z 2% (o/o) FBS. Następnie, wirowano je przy $324 \times g$ w $4^{\circ}C$ przez 5 min. W przypadku BMDMs oraz MDMs blokowano receptory dla fragmentów Fc przeciwciał używając w tym celu przeciwciał anti-CD16/CD32 (5 min; temperatura pokojowa, $0.1 \mu g/100 \mu L$; TruStain FcX BioLegend, San Diego, CA, USA numery katalogowe dla anty-ludzkich i anty-mysich przeciwciał odpowiednio: #422302 oraz #101320), natomiast (blokowaną przed procesem separacji) zawiesinę komórek TAMs w PBS barwiono przez 30 minut w temperaturze $4^{\circ}C$ przy użyciu barwnika eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 ($0.1 \mu L/100 \mu L$; Invitrogen, Waltham, MA, USA) umożliwiającego oddzielenie w analizie komórek martwych od żywych. Po odpłukaniu roztworu blokującego lub barwnika (poprzez wirowanie przy $324 \times g$ w $4^{\circ}C$),

komórki zawieszono w roztworze zawierającym mieszaninę przeciwciał (Tabela 7). Komórki inkubowano przez 30 minut w temp. 4 °C. Następnie, kolejno próbki płukano w roztworze 2% (o/o) FBS w PBS, zawieszano w 200 µL PBS i dokonywano odczytu przy użyciu cytometru przepływowego BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Celem usunięcia fałszywie pozytywnego sygnału wynikającego z nakładania się widm emisji i wzbudzenia barwników używanych jednocześnie, w każdym eksperymencie wykonano kontrole pozytywne znakowane pojedynczo dla każdego ze stosowanych przeciwciał. Stanowiły one podstawę do ustawień kompensacji, którą stosowano do analizy poszczególnych eksperymentów. Analizę wyników przeprowadzono używając programu BD FACS Diva™ 6.2 wyznaczając procent pozytywnych względem danego barwnika komórek lub intensywność fluorescencji w stosunku do nieznakowanej kontroli (MFI; *median fluorescence intensity*).

Tabela 7. Spis przeciwciał użytych w analizie cytometrycznej.

	Nazwa-barwnik	Pochodzenie	Klon/Producent
Anty-mysie	F4/80- BV421	szczurze	BM8/BD BioLegend
	CD11b-APC	szczurze	M1/70 /BD Biosciences
	(HLA-DR) MHCII-PerCP-Cy5.5	szczurze	M5/114.15.2 BioLegend
	CD204-BV650	szczurze	268318/BD Biosciences
	CD80-PeCy7	chomicze	16-10A1/BioLegend
	CD44-BV510	szczurze	IM7/BioLegend
	CD163-PE	szczurze	TNKUPJ/Thermo Fisher
	EpCAM-FITC	szczurze	G8.8/ BioLegend
Anty-ludzkie	CD11b- FITC	mysie	ICRF44 /BioLegend
	CD14-BV-421	mysie	M5E2/BioLegend
	CD200R-APC	mysie	OX-108/BioLegend
	(HLA-DR)MHCII PerCP/Cy5.5	mysie	Tü36/BioLegend
	CD163-PE	mysie	GHI/61/ BioLegend
	EpCAM- PE-Cy7	mysie	9C4/ BioLegend
	CD204- BV650	mysie	U23-56/BD Biosciences
	CD80- BV785	mysie	2D10/ BioLegend
	CD44- BV510	szczurze	IM7/BioLegend

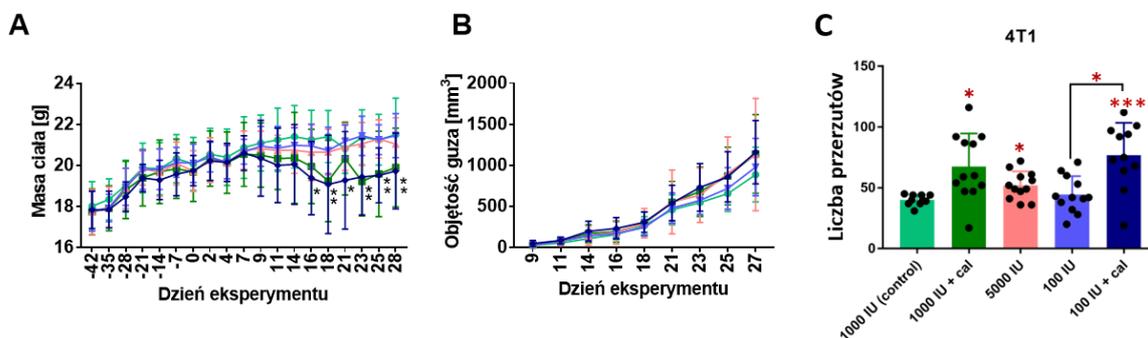
3.3.5. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie do analizy i wizualizacji danych GraphPad Prism 7.01 (GraphPad Software Inc., USA). Po sprawdzeniu normalności rozkładu danych przy użyciu testu Shapiro-Wilk'a przeprowadzono odpowiednio test ANOVA (one-way/two-way ANOVA) lub w przypadku danych, które odbiegały od rozkładu Gaussa przeprowadzono analizę testem Kruskal-Wallis'a. Dla sprawdzenia istotności statystycznej pomiędzy poszczególnymi grupami używano także testów: test *t* lub Mann-Whitney U. Każdy z użytych testów wyszczególniono w podpisach rycin, a różnice istotne statystycznie uznawano gdy $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Analiza tkanek pochodzących od myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu sutkowego

Pierwszym etapem badań było sprawdzenie wpływu różnej zawartości witaminy D₃ w diecie myszy oraz traktowania ich kalcytriolem na kinetykę wzrostu guzów w eksperymentach *in vivo* z wykorzystaniem trzech modeli komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego (4T1, 67NR, E0771). Dodatkowo, ocenie poddano zmiany masy ciała myszy w trakcie trwania eksperymentu oraz liczbę przerzutów do płuc. W przypadku guzów 67NR obserwowano przejściowy efekt zahamowania wzrostu guza w dniu 23 w grupie 1000 IU + cal w porównaniu do kontroli 1000 IU. W przerzutującym modelu E0771 nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu podawanej diety lub traktowania kalcytriolem na zmiany w liczbie przerzutów do płuc oraz w objętości guzów pierwotnych (wyniki dla linii komórkowych 67NR oraz E0771 opisano szczegółowo w pracy Anisiewicz i wsp.²⁰⁵). Natomiast, w modelu 4T1 wykazano zwiększoną obecność przerzutów w płucach myszy w grupie suplementowanej witaminą D₃ (5000 IU) oraz w grupach myszy traktowanych kalcytriolem, zarówno karmionych karmą o normalnej (1000 IU + cal), jak i deficytowej (100 IU + cal) zawartości witaminy D₃ w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU. Jednocześnie obserwowano brak różnic w objętości guzów pomiędzy badanymi grupami oraz istotne statystycznie obniżenie masy ciała od 16-go dnia eksperymentu w grupach 100 IU + cal oraz 1000 IU + cal (Ryc. 7)²⁰⁵.



Rycina 7. Wpływ diety o zróżnicowanej zawartości witaminy D₃ oraz traktowania kalcytriolem na: A. masę ciała myszy BALB/c obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. D0 - dzień wszczepienia komórek nowotworowych, D7 - dzień rozpoczęcia dożołądkowych podań kalcytriolu 1 µg/kg masy ciała w grupach 1000 IU oraz 100 IU (odpowiednio 1000 IU + cal oraz 100 IU + cal); **B.** kinetykę wzrostu guzów 4T1 u myszy szczepu BALB/c; **C.** liczbę ognisk przerzutowych w płucach myszy szczepu BALB/c obarczonych rakiem 4T1 - ocena makroskopowa. Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe²⁰⁵. Statystyka: test Sidaka dla wielokrotnych porównań. *p<0,05 w porównaniu do kontroli 1000 IU lub jak wskazano na wykresie. Oznaczenia: ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

Następnie oceniono wpływ diety o zróżnicowanej zawartości witaminy D₃ i traktowania kalcytriolem na liczbę monocytów we krwi myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Analiza liczby monocytów we krwi obwodowej myszy wykazała ich istotny statystycznie wzrost w grupie 100 IU + cal w porównaniu z grupą kontrolną (1000 IU) oraz grupą niedoborową (100 IU). U myszy obarczonych rakiem 4T1 obserwowano najwyższą liczbę monocytów we krwi pełnej w porównaniu z pozostałymi badanymi modelami, czy myszami nieobarczonymi komórkami nowotworowymi (wynik ten prezentowano w publikacji Anisiewicz i wsp.²⁰⁵). Artur Anisiewicz oraz Joanna Banach odpowiadali za przeprowadzenie procedur na myszach (podania kalcytriolu, pomiary masy ciała, wielkości guza, pobrania krwi z żyły jarzmowej w celu oceny poziomu metabolitów witaminy D₃ w osoczu), podczas gdy zadaniem moim oraz Natalii Łabędź było asystowanie w wykonywanych eksperymentach, a także ważenie myszy, zmiana karmy oraz podawanie myszom podskórnie buprenorfiny w dniu przeprowadzenia sekcji myszy nieobarczonych komórkami raka gruczołu sutkowego. Konrad Kowalski (Masdiag sp. z o.o.) wykonał analizy metabolitów witaminy D₃. Artur Anisiewicz i Joanna Banach wykonali makroskopową ocenę liczby ognisk przerzutowych w płucach. Lizaty z tkanek guzów do analizy western blot oraz testów ELISA, jak i same procedury zostały wykonane przeze mnie oraz Natalię Łabędź.

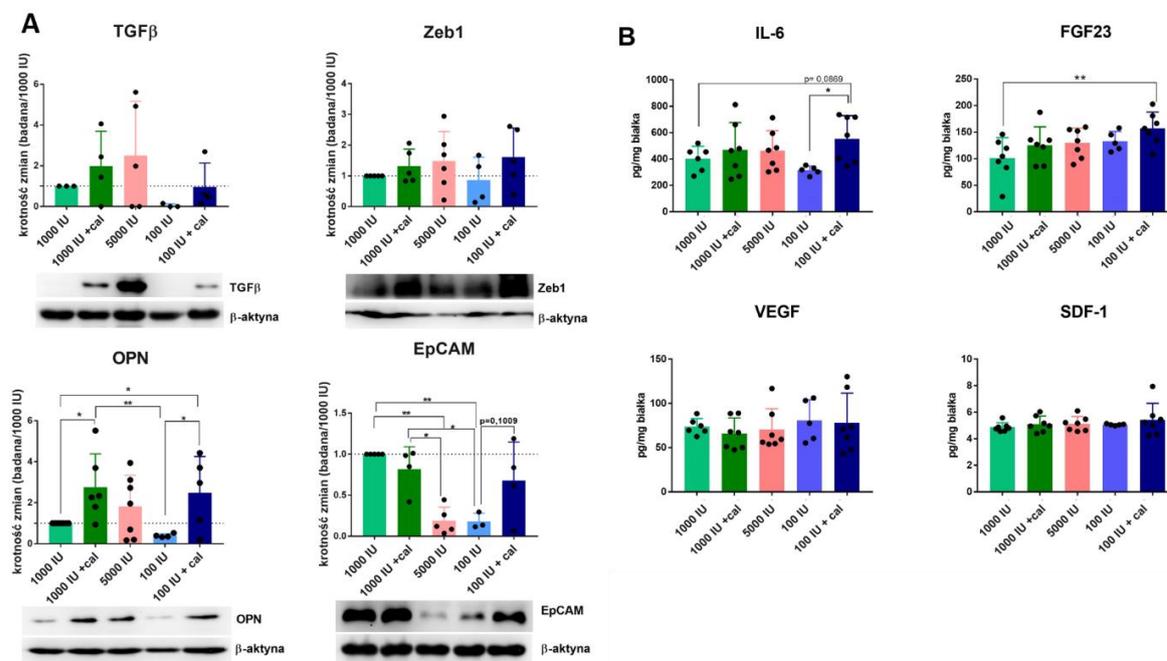
Tabla 8. Liczba monocytów we krwi obwodowej myszy (n=10-12) karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ oraz traktowanych kalcytriolem, zdrowych i obarczonych komórkami mysich raków gruczołu sutkowego. Kontrolą dla modeli 4T1 oraz 67NR były myszy zdrowe BALB/c, natomiast dla E0771 myszy zdrowe C57BL/6. Analiza statystyczna: Test Sidaka dla porównań wielokrotnych. * p<0,05 w porównaniu do kontroli 1000 IU; @p <0,05 w porównaniu do grupy 100 IU.

	Nazwa grupy	Szczep myszy / nazwa linii komórkowej				
		BALB/c	4T1	67NR	C57BL/6	E0771
Mon (10 ³ /μL)	1000 IU	0,3 ± 0,2	23,8 ± 18,3	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,4
	1000 IU+cal	0,3 ± 0,2	38,3 ± 30,8	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,6
	5000 IU	0,3 ± 0,1	35,2 ± 25,7	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3
	100 IU	0,2 ± 0,1	18,3 ± 13,2	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,5
	100 IU+cal	0,2 ± 0,0	52,7 ± 52,5*,@	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,4

4.1.1. Charakterystyka guzów 4T1 pochodzących od myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

Wykonano analizę poziomu wybranych białek związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym w lizatach z guzów 4T1 wykorzystując w tym celu metody western blot oraz ELISA. Przy użyciu techniki western blot oznaczono poziom

TGF β , Zeb1, osteopontyny (OPN) oraz EpCAM. Przy użyciu testu ELISA ocenie poddano poziom IL-6, FGF23, VEGF oraz chemokiny CXCL12 (SDF-1).



Rycina 8. Charakterystyka guzów 4T1 pochodzących od myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem pod kątem poziomu wybranych białek. A. Analiza western blot wraz z reprezentatywnym blotem oceny poziomu białek TGF β , Zeb1, EpCAM oraz OPN w lizatach z guzów 4T1. Wyniki analizy densytometrycznej przedstawiono jako wartości znormalizowane względem β -aktyny w odniesieniu do grupy kontrolnej 1000 IU. Wartości na wykresach przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: EpCAM: Test Holm-Sidak, OPN: test Dunna lub test t dla porównań poszczególnych grup (1000 IU do 1000 IU + cal oraz 1000 IU do 100 IU + cal * p <0,05; ** p <0,01. **B.** Ocena poziomu białek IL-6, FGF23, VEGF oraz SDF-1 (CXCL12) w lizatach z guzów 4T1 za pomocą testu ELISA wyrażone w pg/mg białka. n =4-7 próbek. Analiza statystyczna: Test Sidaka dla wielokrotnych porównań. * p <0,05; ** p <0,01. Oznaczenia: ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

W przypadku białka TGF β zaobserwowano tendencję do wzrostu jego poziomu w grupach 1000 IU + cal, 5000 IU oraz 100 IU + cal w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU, wartości te nie były jednak istotne statystycznie. Podobne tendencje w grupach traktowanych kalcytriolem bądź w grupie suplementowanej witaminą D₃ odnotowano w przypadku białka Zeb1. Poziom OPN także wzrastał w tych grupach. Istotne statystycznie różnice w poziomie tego białka odnotowano pomiędzy grupami 1000 IU + cal (p =0,0147) oraz 100 IU + cal (p =0,0455) a grupą kontrolną 1000 IU. Obserwowano także istotny statystycznie wzrost poziomu OPN w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grupy 100 IU (p =0,0143). Natomiast, w grupie 100 IU wykazano istotne statystycznie obniżenie poziomu OPN w porównaniu do grupy 1000 IU + cal (p =0,0066). Poziom

EpCAM ulegał istotnemu statystycznie obniżeniu w grupach 5000 IU oraz 100 IU w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU (odpowiednio $p=0,0011$ oraz $0,0038$). W grupie 100 IU + cal odnotowuje się tendencję do podwyższenia poziomu EpCAM względem grupy 100 IU ($p=0,1009$). (Ryc. 8 A)

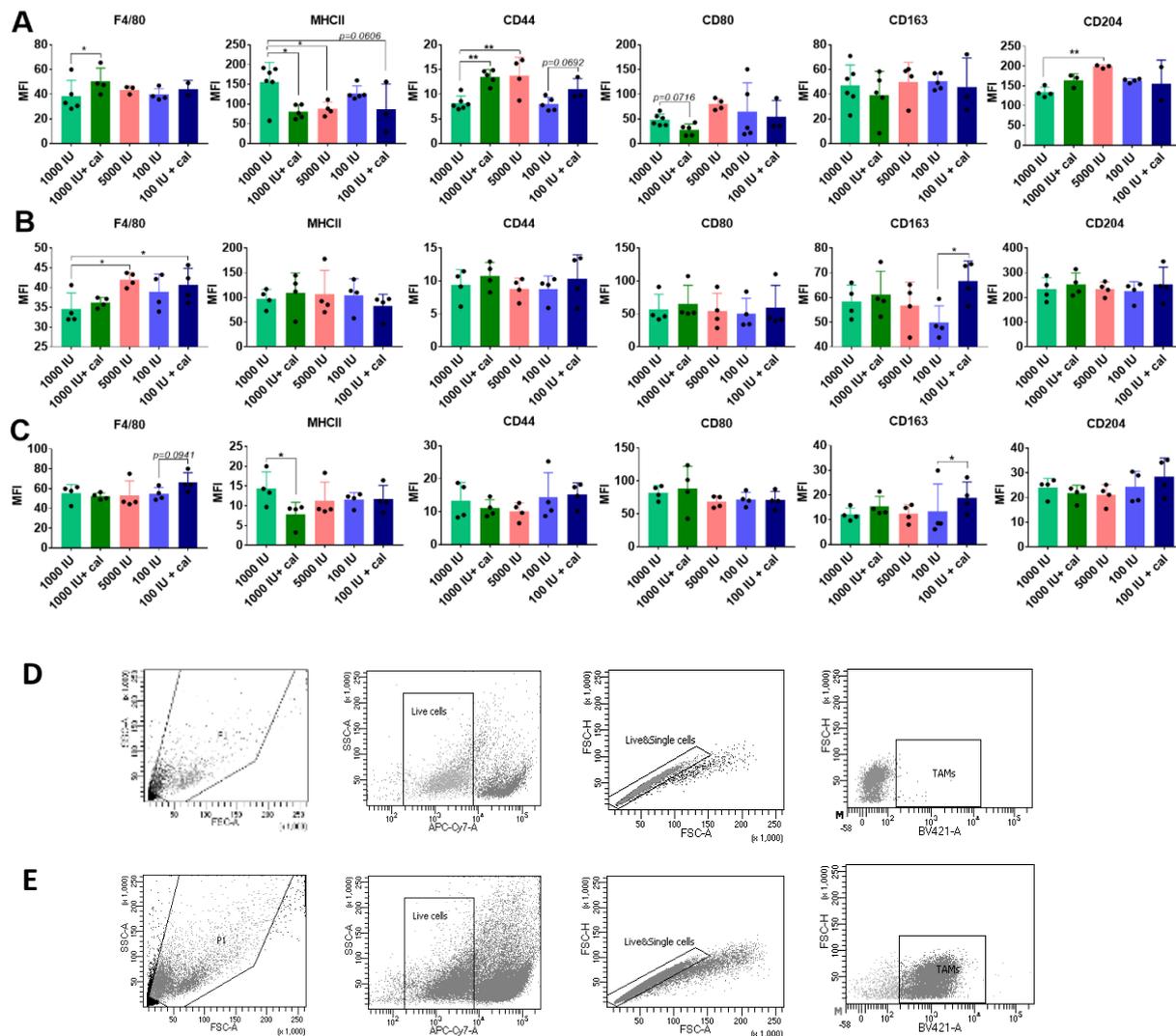
Poziom IL-6 w lizatach z guzów pochodzących od myszy obarczonych rakiem 4T1 ulegał istotnemu statystycznie podwyższeniu w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grupy 100 IU ($p=0,0124$). W grupie 100 IU + cal odnotowuje się tendencję do wzrostu poziomu tej interleukiny w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU ($p=0,0869$). Poziom FGF23 ulegał podwyższeniu w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU w sposób istotny statystycznie ($p=0,0026$). W przypadku białek VEGF oraz SDF-1 nie odnotowano zmian w ich poziomach pomiędzy poszczególnymi grupami (Ryc. 8 B). Wyniki z testu ELISA zarówno z guzów 4T1, jak i 67NR oraz E0771 zostały opublikowane i szczegółowo opisane w pracy Łabędź i wsp.²⁰⁶, w której moją rolą było wykonanie testów ELISA na materiale pochodzącym z osocza oraz tkanek guzów.

4.1.2. Fenotyp TAMs izolowanych z guzów myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

Wykonano charakterystykę TAMs izolowanych z guzów myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem, pod kątem obecności markerów powierzchniowych umożliwiających ich sklasyfikowanie jako makrofagi klasy M1 lub M2. Analizy dokonano przy pomocy cytometrii przepływowej ze świeżo izolowanych komórek posiadających na swojej powierzchni marker F4/80 (komórki F4/80⁺; schemat bramkowania oraz reprezentatywne histogramy załączono w suplemencie Ryc. S-1) z guzów myszy obarczonych komórkami mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1, 67NR oraz E0771 (odpowiednio: TAMs 4T1, TAMs 67NR oraz TAMs E0771).

Wpływ różnej zawartości witaminy D₃ w diecie i traktowania myszy kalcytriolem na zmiany fenotypu TAMs odnotowano w szczególności w modelu 4T1 (Ryc. 9 A). Poziom markera makrofagów F4/80 w TAMs 4T1 izolowanych z guzów myszy z grupy 1000 IU + cal był podwyższony w porównaniu do grupy 1000 IU (wzrost MFI z wartości średniej 38 na 50; $p=0,0459$) (Ryc. 9 A). Komórki te charakteryzowało istotne statystycznie

obniżenie MHCII na ich powierzchni ze średniej wartości MFI 155 w grupie kontrolnej do odpowiednio 80 i 87 w grupie 1000 IU+ cal oraz 5000 IU ($p=0,0119$, $p=0,0436$); dla grupy 100 IU + cal odnotowano podobną tendencję ($p=0,0606$). Jednocześnie obserwowano istotne statystycznie podwyższenie poziomu białka CD44 z wartości średniej MFI w grupie kontrolnej wynoszącej 8 do 13,5 w grupie 1000 IU + cal ($p=0,0021$) oraz 13,7 w grupie 5000 IU ($p=0,0025$). Tendencję do wzrostu poziomu tego białka ($p=0,0690$) wykazano także w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grupy 100 IU. Dodatkowo obserwowano 1,7-krotne obniżenie poziomu CD80 na powierzchni TAMs 4T1 w grupie 1000 IU + cal ($p=0,0716$) w porównaniu do grupy kontrolnej (1000 IU). Komórki TAMs 4T1 charakteryzowały się wysokim poziomem białka CD204 na swojej powierzchni z najwyższym poziomem w grupie 5000 IU w porównaniu z grupą kontrolną (wzrost z wartości średniej MFI 133 do wartości 199; $p=0,0017$). TAMs 67NR z grupy 5000 IU oraz 100 IU + cal charakteryzowały się podwyższonym poziomem markera F4/80 na swojej powierzchni (MFI z wartości średniej 34,5 na 42; $p=0,0342$ oraz z wartości średniej 34,5 na 40,6; $p=0,0365$) w porównaniu do grupy 1000 IU (Ryc. 9 B). Białko CD163 posiadały na swojej powierzchni wszystkie wyizolowane TAMs (4T1, 67NR oraz E0771). Wpływ diety z różną zawartością witaminy D₃ oraz traktowania kalcytriolem na zmiany poziomu tego białka obserwowano tylko w grupach 100 IU + cal TAMs 67NR (wzrost MFI z wartości średniej 50 na 67; $p=0,0107$) oraz TAMs E0771 (wzrost MFI z wartości średniej 13 na 19; $p=0,0486$) w porównaniu do grupy 100 IU (Ryc. 9 B, C). W TAMs E0771 wykazano istotny statystycznie spadek poziomu MHCII w grupie 1000 IU + cal w porównaniu z grupą kontrolną 1000 IU (MFI z wartości średniej 14,3 na 8; $p=0,0198$) (Ryc. 9 C).



Rycina 9. Analiza fenotypowa TAMs izolowanych z guzów 4T1 (A), 67NR (B) i E0771 (C). Analizę wykonano metodą cytometrii przepływej. Ocenie poddano poziom następujących markerów makrofagowych: F4/80, MHCII, CD44, CD80, CD163, CD204. Dane przedstawiono jako medianę intensywności fluorescencji (MFI) w stosunku do kontroli niebarwionych. $n=3-4$ niezależne separacje TAMs. Analiza statystyczna: test Dunna dla wielokrotnych porównań; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. **D,E.** Schemat bramkowania TAMs. Reprezentatywne dot ploty odpowiednio dla kontroli niezakowanej (D) oraz znakowanej przeciwciałami (E). Z ogólnej populacji komórek bramkowano komórki żywe – APC-Cy-7 (live cells), z tej populacji kolejno komórki pojedyncze (live&single cells) i wykazujące obecność markera F4/80-BV-421 (TAMs). Oznaczenia: ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

4.1.3. Analiza przesiewowa ekspresji genów na poziomie mRNA w komórkach TAMs izolowanych z guzów myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

Wykonano przesiewową analizę ekspresji genów związanych z właściwościami makrofagów oraz mechanizmem działania witaminy D₃ w komórkach TAMs izolowanych z guzów 4T1 oraz 67NR. Linia komórkowa 67NR jako izogeniczna, wrażliwa na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu oraz nieprzerzutująca spontanicznie stanowi punkt odniesienia dla linii 4T1.

Tabela 9. Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA związanych z właściwościami pro- lub przeciwnowotworowymi makrofagów i mechanizmem działania witaminy D₃ w TAMs izolowanych z guzów 4T1 i 67NR. Analizę wykonano stosując metodę $\Delta\Delta C_t$ jako kalibrator stosując grupę 1000 IU. Prezentowane wartości stanowią krotność zmian ekspresji - RQ. Próbkę stanowiło cDNA składające się w równej części z materiału pochodzącego z 2-4 separacji, na jedną separację składał się materiał pochodzący od trzech myszy z poszczególnych grup. ND - *not determined* - w przypadku gdy nie odnotowano ekspresji genów. Pełne nazwy genów znajdują się w suplemencie (Tabela S-1).

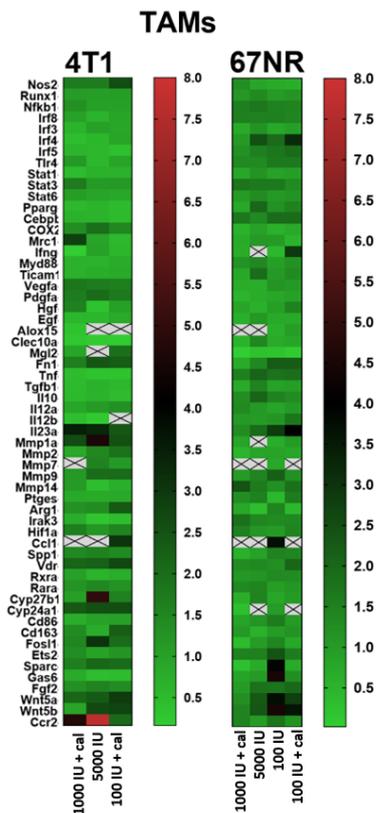
Nazwa genu / numer identyfikacyjny sondy	RQ						
	4T1			67NR			
	1000+cal	5000	100+cal	1000+cal	5000	100	100+cal
Nos2-Mm00440502_m1	1,724	1,698	2,606	1,237	0,787	0,685	0,605
Runx1-Mm01213405_m1	1,089	1,028	1,059	1,065	1,323	1,000	1,128
Nfkb1-Mm00476361_m1	1,328	1,007	1,011	1,530	1,681	1,480	1,459
Irf8-Mm00492567_m1	0,999	0,641	0,924	1,510	1,482	1,510	1,411
Irf3-Mm00516784_m1	0,659	1,011	0,898	0,706	1,138	0,757	0,914
Irf4-Mm00516431_m1	0,456	0,585	0,933	1,030	2,446	1,923	3,154
Irf5-Mm00496477_m1	0,632	0,572	0,421	1,188	1,528	1,697	1,906
Tlr4-Mm00445273_m1	1,138	0,577	0,925	1,334	1,318	1,646	1,640
Stat1-Mm00439531_m1	0,480	0,679	0,687	0,762	1,132	0,857	0,929
Stat3-Mm01219775_m1	1,722	1,120	1,157	1,751	1,654	1,648	1,308
Stat6-Mm01160477_m1	1,059	0,926	0,871	1,011	1,268	1,017	1,146
Pparg-Mm01184322_m1	0,550	0,649	0,493	0,746	1,987	1,182	1,471
Cebpb-Mm00843434_s1	0,680	0,648	0,522	1,679	1,341	1,903	1,909
COX2-Mm03294838_g1	1,372	1,948	1,494	0,536	0,860	0,570	0,730
Mrc1-Mm01329362_m1	2,829	0,942	0,546	0,672	1,046	0,990	0,505
Ifng-Mm01168134_m1	0,162	0,980	0,593	0,652	ND	0,445	2,892
Myd88-Mm00440338_m1	0,687	0,659	0,781	1,142	1,363	0,913	1,170
Ticam1-Mm00844508_s1	0,691	0,751	0,826	0,745	1,874	1,022	1,298
Vegfa-Mm00437306_m1	1,816	1,706	1,650	0,648	0,640	1,128	1,014
Pdgfa-Mm01205760_m1	1,703	2,008	1,766	0,492	0,646	0,769	0,881
Hgf-Mm01135193_m1	1,602	0,372	1,017	0,791	0,573	0,914	1,470
Egf-Mm00438696_m1	0,600	0,593	0,827	0,593	1,058	0,718	0,708
Alox15-Mm00507789_m1	0,362	ND	ND	ND	ND	0,586	0,944
Clec10a-Mm00546124_m1	0,269	0,184	0,169	0,514	1,396	0,697	0,784
Mgl2-Mm00460844_m1	0,938	ND	1,959	0,020	0,222	0,204	0,067

Fn1-Mm01256744_m1	1,649	2,420	2,284	0,689	1,369	2,229	2,218
Tnf-Mm00443258_m1	0,473	0,353	0,337	1,505	2,059	1,764	1,853
Tgfb1-Mm01178820_m1	0,509	0,673	0,574	0,695	1,452	0,868	0,928
Il10-Mm01288386_m1	0,537	0,652	0,469	1,256	2,056	1,473	1,294
Il12a-Mm00434169_m1	0,889	1,106	1,322	1,322	1,027	0,795	1,024
Il12b-Mm00434174_m1	0,466	0,232	ND	1,025	0,985	1,097	1,702
Il23a-Mm00518984_m1	3,504	3,324	2,392	1,275	1,926	2,836	3,998
Mmp1a-Mm00473485_m1	2,618	4,587	2,531	0,813	ND	0,634	0,998
Mmp2-Mm00439506_m1	0,857	1,484	1,891	0,492	0,805	0,820	0,772
Mmp7-Mm01168420_m1	ND	1,564	1,149	ND	ND	0,752	ND
Mmp9-Mm00442991_m1	1,173	1,999	2,029	0,981	1,433	2,158	1,202
Mmp14-Mm00485054_m1	1,106	0,453	0,728	2,390	1,634	1,204	1,808
Ptges-Mm00452105_m1	0,835	0,798	0,851	1,241	1,483	0,425	1,604
Arg1-Mm00475988_m1	1,301	1,387	2,368	0,757	0,325	1,43	0,433
Irak3-Mm00518541_m1	0,761	0,314	0,455	1,819	1,391	1,302	1,376
Hif1a-Mm00468869_m1	1,652	1,204	1,552	1,508	1,082	1,005	1,408
Ccl1-Mm00441236_m1	ND	ND	3,058	ND	ND	3,702	ND
Spp1-Mm00436767_m1	1,443	1,577	1,431	0,571	0,861	1,451	1,401
Vdr-Mm00437297_m1	2,142	2,232	2,702	1,282	1,329	1,213	2,006
Rxra-Mm00441185_m1	1,021	0,650	0,768	1,065	1,128	1,310	1,271
Rara-Mm01296312_m1	1,249	1,470	1,302	1,326	1,434	0,916	1,088
Cyp27b1-Mm01165918_g1	1,024	4,959	1,610	0,604	1,446	0,765	0,994
Cyp24a1-Mm00487244_m1	2,361	2,570	2,603	0,287	ND	0,975	ND
Cd86-Mm00444543_m1	0,742	0,991	1,005	0,832	1,12	1,586	1,009
Cd163-Mm00474091_m1	1,387	0,787	2,268	1,022	0,553	0,959	1,131
Fos11-Mm00487429_m1	1,518	3,101	2,001	0,350	0,973	1,394	0,742
Ets2-Mm00468977_m1	1,369	0,974	1,244	1,487	1,501	2,391	1,578
Sparc-Mm00486332_m1	1,639	2,094	2,028	0,264	0,675	3,915	0,700
Gas6-Mm00490378_m1	0,805	0,467	0,472	0,836	1,003	4,465	1,228
Fgf2-Mm01285715_m1	1,319	1,571	1,393	0,991	1,791	1,752	1,982
Wnt5a-Mm00437347_m1	2,121	2,358	2,916	1,216	2,277	3,735	2,787
Wnt5b-Mm00437350_m1	0,929	2,668	2,765	1,422	2,322	4,465	3,603
Ccr2-Mm00438270_m1	4,765	7,692	2,036	1,458	0,987	1,752	1,149

Tabela 9 c.d.

Celem sprawdzenia wpływu witaminy D₃ na komórki mikrośrodowiska nowotworu przerzutującego (4T1) i nieprzerzutującego spontanicznie (67NR) wykonano macierze PCR na materiale pochodzącym z TAMs izolowanych z guzów myszy BALB/c obarczonych wyżej wymienionymi komórkami nowotworowymi. W przypadku TAMs izolowanych z guzów 4T1 nie udało się uzyskać wystarczającej ilości materiału RNA do analizy tych komórek z grupy 100 IU.

Zaobserwowano odwrotne tendencje zmian ekspresji poszczególnych genów w TAMs izolowanych z guzów pomiędzy modelem przerzutującym (4T1) a nieprzerzutującym (67NR) (Tabela 9; Ryc. 10). W grupach traktowanych kalcytriolem i suplementowanej witaminą D₃ (1000 IU + cal, 100 IU + cal, 5000 IU) TAMs izolowane



Rycina 10. Mapa ciepłna wyników przedstawionych w Tabeli 9. × - ND, brak ekspresji genu.

z guzów 4T1 (TAMs 4T1) w porównaniu do grupy 1000 IU charakteryzowały się podwyższoną ekspresją mRNA genów kodujących syntazę tlenu azotu (*Nos2*; 1,7-2,6-krotnie wyższa), podjednostkę A czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (*Pdgfa*; 1,7-2-krotnie), metaloproteinazę 1a (*Mmp1a*; 2,5-4,5-krotnie), arginazę 1 (*Arg1*; 1,3- 2,3-krotnie), podjednostkę czynnika transkrypcyjnego AP-1 (*Fos11*; 1,5-3-krotnie) i receptor dla chemokiny CCL2 (*Ccr2*; 2-7,7-krotnie). Podczas gdy w przypadku TAMs izolowanych z guzów myszy obarczonych komórkami 67NR (TAMs 67R) nie obserwuje się podwyższenia ekspresji ww. genów względem kontroli 1000 IU. TAMs 4T1 charakteryzowały się obniżeniem ekspresji genów kodujących czynnik regulacyjny interferonu 4 oraz 5 (*Irf4*, *Irf5*; 1,6-2,4-krotne obniżenie), czynnik transkrypcyjny C/EBPB (*Cebp*; 1,4-2-krotne), czynnik martwicy nowotworów (*Tnf* ; 2-3-krotne), oraz IL-10

(*Il10*; 1,5-2 krotne) w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU. Podczas gdy TAMs 67NR charakteryzowały się podwyższeniem ekspresji ww. genów względem kontroli 1000 IU.

W przypadku obu modeli nowotworów w grupach 1000 IU + cal, 5000 IU, 100 IU + cal oraz 100 IU (w przypadku TAMs 67NR) obserwuje się podwyższenie ekspresji mRNA genu kodującego podjednostkę p19 interleukiny 23 (*Il23a*) w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU odpowiadającej poszczególnym modelom (Tabela 9).

Clec10a, *Il12b* (w grupie 100 IU + cal brak jej ekspresji), *Tgfb*, a także *Gas6* i *Irak3* w przypadku grup 5000 IU oraz 100 IU + cal wykazywały około 2-5-krotne obniżenie

ekspresji w przypadku TAMs 4T1 w porównaniu do grupy 1000 IU. Są to geny kodujące białka odpowiednio: CD301, IL-12b, TGFβ, białko specyficzne dla zatrzymania wzrostu 6 oraz kinazę 3 związaną z receptorem interleukiny-1.

W przypadku genów kodujących białka związane z metabolizmem witaminy D obserwowano wyższą indukcję ekspresji mRNA genu kodującego receptor witaminy D (*Vdr*) w TAMs 4T1 niż w TAMs 67NR pod wpływem suplementacji witaminą D₃ w diecie – 5000 IU, jak i w grupach traktowanych kalcytriolem – 1000 IU + cal; 100 IU + cal. Ponadto odnotowano wyższą ekspresję mRNA genu kodującego enzym hydroksylazę-24 kalcytriolu (*Cyp24a1*) w tych samych grupach. W przypadku genu kodującego 1α-hydroksylazę kalcydiolu (*Cyp27b1*) jego najwyższą ekspresję odnotowano w TAMs 4T1 z grupy 5000 IU (RQ 4,959). W TAMs 67NR także w tej grupie obserwuje się najwyższy poziom tego genu w porównaniu do pozostałych grup (Tabela 9).

TAMs izolowane z guzów 4T1 myszy z grupy 100 IU + cal charakteryzowały się podwyższoną ekspresją mRNA genu kodującego marker makrofagów M2 – CD163 (*Cd163* – RQ 2,268) w stosunku do grupy kontrolnej 1000 IU. W przypadku TAMs 67NR nie zaobserwowano zmian w ekspresji mRNA tego genu. Ponadto, nie obserwowano wpływu zróżnicowanej diety na ekspresję genu kodującego marker makrofagów M1–CD86 w TAMs, zarówno pochodzących z guzów 4T1, jak i 67NR (Tabela 9). W przypadku genów kodujących białka z rodziny Wnt (*Wnt5a*, *Wnt5b*) zaobserwowano ich podwyższoną ekspresję na poziomie mRNA w każdej z badanych grup TAMs 4T1 oraz TAMs 67NR w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU (Tabela 9).

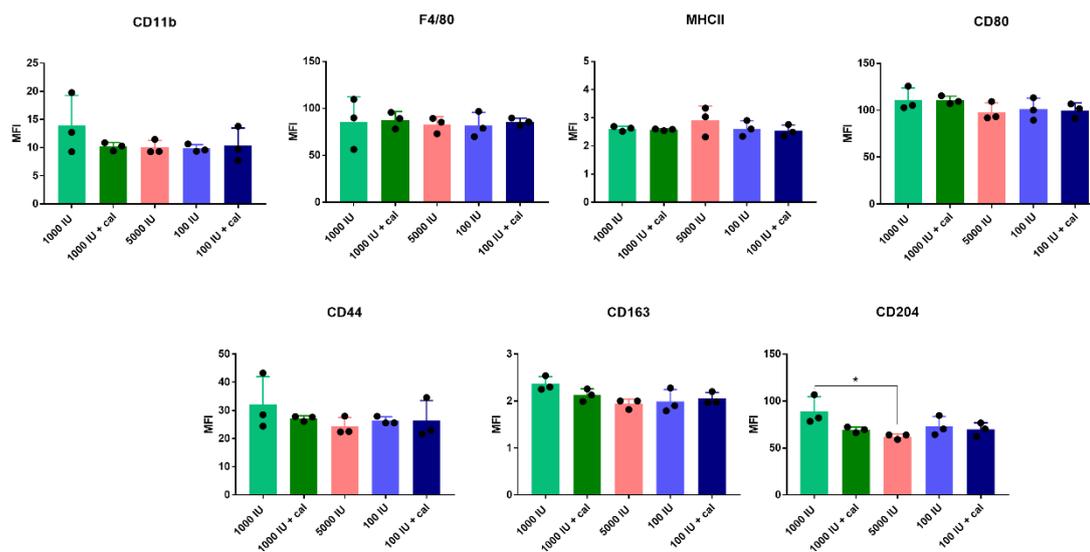
W związku z tym, iż liczba TAMs była wystarczająca jedynie do analiz fenotypu i przesiewowej analizy ekspresji genów nie było więc możliwości wykonania analiz qPCR dla pojedynczych próbek.

4.1.4. Fenotyp BMDMs izolowanych ze szpiku myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

Materiał do dalszych badań stanowiły makrofagi różnicowane z komórek szpikowych (BMDMs) pochodzące od myszy obciążonych nowotworem 4T1 karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

(schemat bramkowania oraz reprezentatywne histogramy załączono w suplemencie Ryc. S-2).

Analiza cytometryczna wykazała nieznaczny wpływ wyżej wymienionych czynników na zmiany w fenotypie BMDMs. W grupie 5000 IU obserwowano 30% obniżenie poziomu markera CD204 wyrażone w MFI w porównaniu z grupą kontrolną (spadek z wartości średniej MFI 89 do 62; $p=0,0349$) (Ryc. 11).



Rycina 11. Analiza fenotypowa BMDMs różnicowanych czynnikiem M-CSF z komórek szpikowych myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Wynik przedstawia średnią \pm odchylenie standardowe z trzech powtórzeń. Wyniki przedstawiono jako medianę intensywności fluorescencji – MFI. Analiza statystyczna: Test Dunna dla porównań wielokrotnych $*p<0,05$. Oznaczenia: ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

4.1.5. Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA w komórkach BMDMs izolowanych ze szpiku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 oraz 67NR karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

Komórki BMDMs pochodzące ze szpiku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1, różnicowane do makrofagów pod wpływem czynnika M-CSF poddano przesiewowej analizie ekspresji mRNA na płytках mikrofluidowych, w taki sam sposób, jak w przypadku TAMs izolowanych z guzów.

Największe różnice w ekspresji mRNA genów pomiędzy BMDMs pochodzącymi ze szpiku myszy obarczonych komórkami 4T1 zaobserwowano w grupach 1000 IU + cal oraz 5000 IU dla *Irf4* (3-krotne podwyższenie ekspresji). W grupach myszy traktowanych kalcytriolem (1000 IU + cal; 100 IU + cal) bądź suplementowanych witaminą D₃ (5000 IU) wykazano wyższą ekspresję mRNA genów *Mrc1*, *Fnl* (3-7-krotne podwyższenie ekspresji) i *Il23a* (12-16-krotne podwyższenie ekspresji mRNA tego genu) w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU. W przypadku BMDMs pochodzących od myszy obarczonych komórkami 67NR nie obserwuje się zmian w ekspresji ww. genów, dodatkowo nie odnotowano w nich ekspresji mRNA genu *Il23a*. Natomiast, w BMDMs 4T1 obserwuje się obniżenie ekspresji *Il10* w grupach 5000 IU, 100 IU oraz 100 IU + cal (1,3-1,9-krotne) w porównaniu do grupy 1000 IU, podczas gdy w BMDMs 67NR obserwuje się wzrost ekspresji tej interleukiny (Tabela 10, Ryc.12).

W komórkach BMDMs obserwowano podwyższoną ekspresję *Vdr* w grupach traktowanych kalcytriolem bądź suplementowanej witaminą D₃ w przypadku materiału pochodzącego zarówno od myszy obarczonych komórkami 4T1, jak i 67NR. W komórkach BMDMs 67NR nie obserwowano ekspresji mRNA genu *Cyp27b1* w żadnej z badanych grup, natomiast w przypadku BMDMs 4T1 wykazano 2-3-krotne obniżenie poziomu mRNA tego genu w grupie 1000 IU + cal i 100 IU + cal w porównaniu do grupy 1000 IU. Nie obserwowano ekspresji mRNA genu *Cyp24a1* w żadnej z analizowanych próbek w przypadku obu badanych modeli komórkowych (Tabela 10, Ryc.12).

Podobnie jak w przypadku TAMs pochodzących z guzów 4T1 obserwowano wzrost ekspresji mRNA genu *Cd163* w komórkach BMDMs z grupy 100 IU + cal (RQ 1,9 względem kontroli 1000 IU). Podczas gdy dla komórek BMDMs 67NR obserwowano

obniżenie jego poziomu we wszystkich grupach za wyjątkiem 5000 IU (RQ 1,370) w porównaniu do kontroli 1000 IU. W przypadku *Cd86* nie odnotowano zmian w jego ekspresji (Tabela 10, Ryc.12).

Tabela 10. Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA związanych z właściwościami pro- lub przeciwnowotworowymi makrofagów i mechanizmem działania witaminy D₃ w BMDMs pochodzących ze szpiku myszy BALB/c obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR. Analizę wykonano stosując metodę $\Delta\Delta C_t$ jako kalibrator stosując grupę 1000 IU. Prezentowane wartości stanowią krotność zmian ekspresji- RQ. Próbkę stanowiło cDNA składające się w równej części z materiału pochodzącego od trzech myszy z danej grupy. ND - *not determined* - w przypadku gdy nie odnotowano ekspresji genów. Pełne nazwy genów znajdują się w suplemencie (Tabela S-1).

Nazwa genu / numer identyfikacyjny sondy	RQ							
	4T1				67NR			
	1000+ cal	5000	100	100+ cal	1000+ cal	5000	100	100+ cal
Nos2-Mm00440502_m1	0,632	0,815	0,707	0,707	1,201	0,713	0,685	0,915
Runx1-Mm01213405_m1	0,696	0,833	0,808	0,853	0,984	1,106	0,877	0,996
Nfkb1-Mm00476361_m1	1,180	1,027	1,247	0,956	1,000	1,018	0,827	1,050
Irf8-Mm00492567_m1	1,026	1,020	1,224	0,977	1,030	1,076	0,919	1,070
Irf3-Mm00516784_m1	1,188	1,226	1,283	1,110	0,975	1,163	0,909	1,200
Irf4-Mm00516431_m1	3,673	2,859	0,816	0,771	1,012	0,831	1,518	1,638
Irf5-Mm00496477_m1	1,303	1,051	1,355	1,136	1,053	0,821	0,917	1,058
Tlr4-Mm00445273_m1	1,154	1,230	1,255	1,068	0,572	0,673	0,539	0,569
Stat1-Mm00439531_m1	1,306	0,885	1,334	0,796	0,976	0,796	0,759	0,963
Stat3-Mm01219775_m1	1,833	2,996	1,653	1,499	1,700	1,250	0,866	1,186
Stat6-Mm01160477_m1	0,896	1,016	1,200	1,058	1,085	1,047	0,88	1,041
Pparg-Mm01184322_m1	0,531	0,414	0,361	0,287	0,768	0,635	0,616	0,708
Cebpb-Mm00843434_s1	0,851	0,956	0,992	0,913	1,036	1,267	0,900	1,091
COX2-Mm03294838_g1	0,810	0,953	1,377	1,223	0,907	0,984	0,921	1,100
Mrc1-Mm01329362_m1	3,321	4,814	1,842	7,987	0,606	1,327	1,402	1,943
Ifng-Mm01168134_m1	0,48	ND	0,72	0,473	ND	ND	ND	ND
Myd88-Mm00440338_m1	0,974	0,976	1,03	1,032	1,014	1,202	1,036	1,197
Ticam1-Mm00844508_s1	0,774	0,896	1,124	0,883	0,870	0,987	0,876	1,132
Vegfa-Mm00437306_m1	0,676	0,923	0,879	0,68	0,904	0,872	0,829	1,097
Pdgfa-Mm01205760_m1	1,589	0,834	1,594	1,104	0,757	1,043	0,741	0,721
Hgf-Mm01135193_m1	0,669	1,047	0,796	0,592	1,443	1,112	0,930	1,965
Egf-Mm00438696_m1	0,573	0,572	1,904	1,189	2,901	2,952	2,062	1,588
Alox15-Mm00507789_m1	ND	ND	ND	ND	0,835	0,765	0,794	ND
Clec10a-Mm00546124_m1	0,937	1,09	1,424	1,082	0,865	1,045	0,942	0,869
Mgl2-Mm00460844_m1	ND	ND	ND	ND	ND	1,315	ND	0,646
Fn1-Mm01256744_m1	3,059	4,256	1,071	3,312	0,884	1,744	1,186	1,563
Tnf-Mm00443258_m1	0,779	0,636	1,086	0,639	0,960	1,070	0,831	0,883
Tgfb1-Mm01178820_m1	0,890	1,050	1,343	1,177	1,300	1,204	0,925	1,129
Il10-Mm01288386_m1	1,626	0,639	0,775	0,524	1,324	1,401	0,885	1,336
Il12a-Mm00434169_m1	0,721	1,002	0,947	1,181	1,059	1,575	1,045	1,109
Il12b-Mm00434174_m1	0,554	1,219	1,208	0,306	0,765	0,615	0,425	0,341
Il23a-Mm00518984_m1	15,833	11,680	1,851	14,443	ND	ND	ND	ND
Mmp1a-Mm00473485_m1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Mmp2-Mm00439506_m1	0,271	0,581	0,312	0,442	1,204	0,675	0,714	1,309
Mmp7-Mm01168420_m1	ND	ND	ND	ND	ND	0,382	ND	ND
Mmp9-Mm00442991_m1	0,733	0,671	0,623	0,840	0,682	2,064	1,114	0,939
Mmp14-Mm00485054_m1	0,999	0,905	0,998	0,998	1,251	1,305	1,035	0,995
Ptges-Mm00452105_m1	0,689	0,768	0,825	0,744	1,078	1,199	0,946	1,074
Arg1-Mm00475988_m1	1,671	1,650	1,601	2,700	0,990	1,024	0,830	0,787
Irak3-Mm00518541_m1	1,007	0,960	1,055	1,112	1,059	1,116	0,865	0,918
Hif1a-Mm00468869_m1	0,888	1,065	1,182	1,099	0,924	1,075	0,933	0,965
Ccl1-Mm00441236_m1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spp1-Mm00436767_m1	1,403	1,838	0,903	1,218	0,861	0,962	0,861	1,593
Vdr-Mm00437297_m1	1,936	1,896	0,465	1,550	2,712	1,708	1,340	2,150
Rxra-Mm00441185_m1	1,367	1,210	1,243	1,253	1,103	1,17	0,918	1,269
Rara-Mm01296312_m1	1,360	1,427	1,590	1,372	0,971	0,983	0,937	1,268
Cyp27b1-Mm01165918_g1	0,567	ND	ND	0,289	ND	ND	ND	ND
Cyp24a1-Mm00487244_m1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd86-Mm00444543_m1	0,715	1,063	0,868	0,794	1,071	0,852	1,054	1,256
Cd163-Mm00474091_m1	0,985	0,429	1,706	1,909	0,450	1,37	0,267	0,430
Fos11-Mm00487429_m1	1,439	1,323	0,78	1,946	1,024	1,261	0,467	0,973
Ets2-Mm00468977_m1	0,521	0,810	0,823	0,859	0,984	1,087	1,059	1,643
Sparc-Mm00486332_m1	1,003	1,249	0,503	0,613	0,914	1,396	0,789	1,777
Gas6-Mm00490378_m1	1,244	1,075	1,165	0,960	1,162	1,172	1,11	1,367
Fgf2-Mm01285715_m1	ND	ND	ND	ND	1,254	0,911	1,087	2,150
Wnt5a-Mm00437347_m1	0,920	0,440	0,292	0,277	0,356	0,200	0,260	0,521
Wnt5b-Mm00437350_m1	0,579	1,177	ND	0,383	ND	0,943	2,089	ND
Ccr2-Mm00438270_m1	0,765	0,899	1,098	0,916	3,327	0,963	0,972	0,819
Epcam-Mm00493214_m1	98,537	27,822	6,892	77,115	1,139	1,007	0,912	0,913

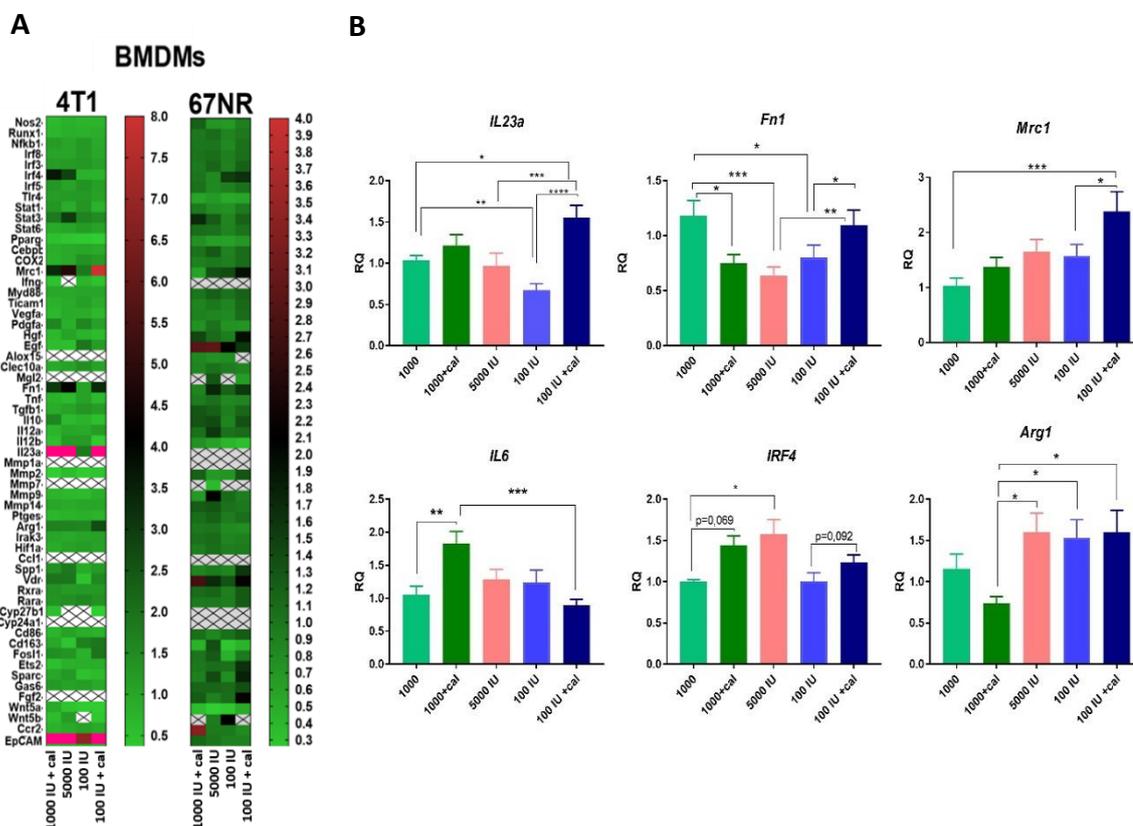
Tabela 10 c.d.

Obserwowano wysoką ekspresję genu kodującego cząsteczkę adhezji komórek nabłonkowych (*Epcam*), zwłaszcza w grupach myszy traktowanych kalcytriolem (1000 IU + cal – RQ 98,537; 100 IU + cal – RQ 77,115) lub w grupie myszy suplementowanych witaminą D₃ (5000 IU – RQ 27,822), w związku z tym w dalszej części pracy sprawdzono obecność przerzutów w kościach. Jednakże, w analizie pojedynczych próbek skupiono się na komórkach BMDMs pochodzących ze szpiku myszy BALB/c obarczonych komórkami 4T1 i wybrano geny kodujące białka: podjednostkę p19 interleukiny 23 (*Il23a*), interleukinę 6 (*Il6*; ponieważ obok IL-23 jest jednym z ważniejszych induktorów odpowiedzi Th17¹¹ – nie ujęta w panelu przesiewowym), fibronektynę 1 (*Fnl*), receptor mannozowy typu 1 (*Mrc1*), czynnik regulacyjny interferonu 4 (*Irf4*) oraz arginazę 1 (*Arg1*).

W grupie 100 IU + cal komórki BMDMs charakteryzowały się podwyższoną ekspresją mRNA genu *Il23a*, zwłaszcza w porównaniu z grupą 100 IU

($p < 0,0001$) lub 5000 IU ($p = 0,0006$). W BMDMs z grupy 100 IU obserwowano obniżenie poziomu mRNA tej interleukiny w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU ($p = 0,0027$). W przypadku genu *Fnl* zauważono odwrotną tendencję w grupach z normalnym poziomem witaminy D₃ w diecie (1000 IU), a niedoborem i dodatkowo traktowanych kalcytriolem (1000 IU + cal; 100 IU + cal). W grupie 1000 IU + cal poziom *Fnl* ulegał obniżeniu ($p = 0,0124$) względem grupy 1000 IU, podczas gdy w grupie 100 IU + cal podwyższał się ($p = 0,0463$) w porównaniu do grupy 100 IU. W grupie 5000 IU odnotowano najniższy poziom mRNA tego genu spośród wszystkich grup (2-krotny w porównaniu do kontroli; $p = 0,0017$). Analogicznie do wyników uzyskanych z przesiewowej analizy PCR, poziom mRNA genu *Mrc1* wzrastał dwukrotnie w grupie 100 IU + cal ($p = 0,0036$) względem grupy 1000 IU. Wykazano odwrotną tendencję w ekspresji mRNA genu *Il6* pomiędzy grupami z normą witaminy D₃ w diecie (1000 IU) a niedoborem (100 IU) traktowanymi kalcytriolem: w grupie 1000 IU + cal jego poziom wzrastał ($p = 0,0011$) w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU, podczas gdy w grupie 100 IU + cal ulegał obniżeniu (wynik nieistotny statystycznie w porównaniu do grupy 100 IU; przy porównaniu do 1000 IU + cal $p = 0,0008$). Czynniki *Irf4* wykazywał najwyższą ekspresję w BMDMs z grupy 5000 IU ($p = 0,0425$) w porównaniu z kontrolą 1000 IU. Obserwowano także tendencję do podwyższenia poziomu mRNA tego genu pod wpływem traktowania kalcytriolem w BMDMs z pozostałych grup względem kontroli 1000 IU, jednak wartości te nie były istotne statystycznie. Gen *Arg1* posiadał najwyższą ekspresję w grupach 100 IU + cal; 100 IU oraz 5000 IU. Traktowanie kalcytriolem myszy z normalnym poziomem witaminy D₃ w diecie (1000 IU + cal)

powodowało obniżenie poziomu mRNA tego genu w stosunku do ww. grup w komórkach BMDMs (odpowiednio $p=0,0103$; $0,0059$; $0,0042$).



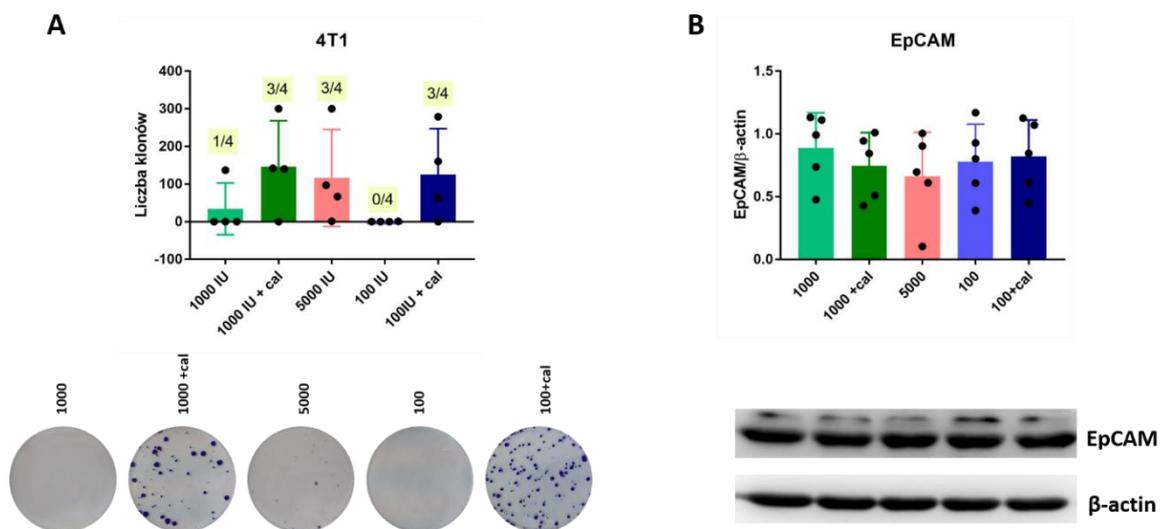
Rycina 12. Przesiewowa analiza ekspresji mRNA genów w komórkach BMDMs pochodzących ze szpiku myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (BMDMs 4T1) A. Mapa cieplna wyników przedstawionych w Tabeli 10. × - ND, brak ekspresji genu. Wartości powyżej skali oznaczono kolorem różowym. **B.** Wyniki otrzymane dla pojedynczych próbek BMDMs 4T1 ($n=5-6$ myszy). Analizę wykonano stosując metodę $\Delta\Delta Ct$, jako kalibrator stosując grupę 1000 IU. Prezentowane wartości stanowią krotność zmiany ekspresji- RQ, przedstawiona jako wartość średnia \pm błąd standardowy średniej. Analiza statystyczna: test Dunna dla wielokrotnych porównań; * $p<0,05$. Oznaczenia: ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

4.1.6. Analiza obecności przerzutów w kościach myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 karmionych karmią o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem

W celu sprawdzenia obecności przerzutów w kościach myszy BALB/c obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 wykorzystano oporność tych komórek na 6-tioguaninę. W grupach myszy traktowanych kalcytriolem (1000 IU + cal, 100 IU + cal) bądź suplementowanych witaminą D₃ (5000 IU) zaobserwowano obecność kolonii komórek 4T1 w przypadku 75% (3/4) myszy, podczas gdy w grupie kontrolnej 1000 IU w przypadku 25% (1/4) myszy. W próbkach szpiku pochodzących od myszy

z niedoborem witaminy D₃ nie potwierdzono obecności przerzutów w kościach (Ryc. 13 A).

W związku z nadekspresją mRNA *Epcam* w próbkach szpiku pochodzących od myszy obarczonych komórkami 4T1, postanowiono sprawdzić poziom tego białka w lizatach BMDMs, z których została wykonana analiza qPCR. Wynik western blot nie był zbieżny z wynikami qPCR, gdzie najwyższą ekspresję mRNA genu *Epcam* obserwowano w grupach 1000 IU + cal, 5000 IU oraz 100 IU + cal (Tabela 10). Natomiast na poziomie białka nie wykazano różnic w poziomie cząsteczki EpCAM w komórkach BMDMs pomiędzy poszczególnymi grupami (Rycina 13 B).



Rycina 13. Analiza obecności przerzutów w kościach myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 karmionych karmią o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. A. Liczba klonów obecnych po 14. dniowej hodowli komórek szpiku kostnego inkubowanego z 6-tioguaniną oraz reprezentatywne zdjęcia kolonii komórek 4T1. Liczby nad poszczególnymi słupkami przedstawiają liczbę myszy z potwierdzoną obecnością przerzutów w kościach w stosunku do ogólnej liczby myszy poddanych tej analizie. **B.** Poziom białka EpCAM w lizatach komórek BMDMs pochodzących ze szpiku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. Analizę wykonano metodą western blot, jako kontrolę zastosowano β-aktynę. Wyniki densytometrii przedstawiono jako wartość średnia ± odchylenie standardowe. Oznaczenia : ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

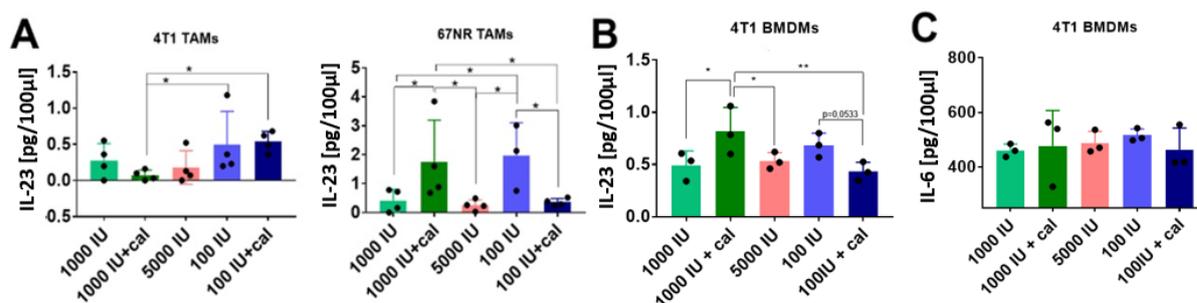
4.1.7. Analiza poziomu wydzielania wybranych cytokin przez TAMs oraz BMDMs pochodzących od myszy obarczonych komórkami mysich raków gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR

Poziom IL-23 oznaczano w próbkach TAMs 4T1 i TAMs 67NR (Ryc. 14 A) oraz BMDMs 4T1 (Ryc. 14 B), natomiast poziom IL-6 oznaczano tylko w przypadku BMDMs 4T1 (Ryc. 14 C).

W przypadku TAMs 4T1 obserwuje się spadek wydzielania IL-23 w grupie 1000 IU + cal względem grup niedoborowych (100 IU $p=0,0446$; 100 IU + cal $p=0,0251$). TAMs 67NR pochodzące z grupy myszy 1000 IU + cal wydzielają więcej IL-23 w porównaniu z kontrolą i grupami 1000 IU ($p=0,0380$); 5000 IU ($p=0,0222$) oraz 100 IU + cal ($p=0,0115$). W grupie 100 IU + cal obserwuje się odwrotną tendencję niż w grupie 1000 IU + cal. Poziom IL-23 obniżył się pod wpływem traktowania kalcytriolem w grupie 100 IU + cal względem grupy 100 IU ($p=0,0230$) (Ryc. 14 A).

Dla BMDMs 4T1 obserwuje się te same zależności jak w przypadku TAMs 67NR. Wzrostowi IL-23 w grupie 1000 IU + cal ($p=0,0194$) względem kontroli towarzyszy spadek w grupie 100 IU + cal ($p=0,0533$) względem grupy 100 IU. Ponadto, wykazano istotny statystycznie spadek poziomu IL-23 w supernatantach BMDMs pochodzących z grup 5000 IU ($p=0,0351$) oraz 100 IU + cal ($p=0,0078$) względem grupy 1000 IU + cal (Ryc. 14 B).

Poziom wydzielania IL-6 pod wpływem stymulacji LPS w komórkach BMDMs 4T1 nie był zależny od zróżnicowanego poziomu witaminy D₃ w diecie myszy BALB/c czy traktowania kalcytriolem (Ryc. 14 C). Obserwuje się jednak jej bardzo wysokie stężenie względem niewielkiego poziomu wydzielania IL-23.



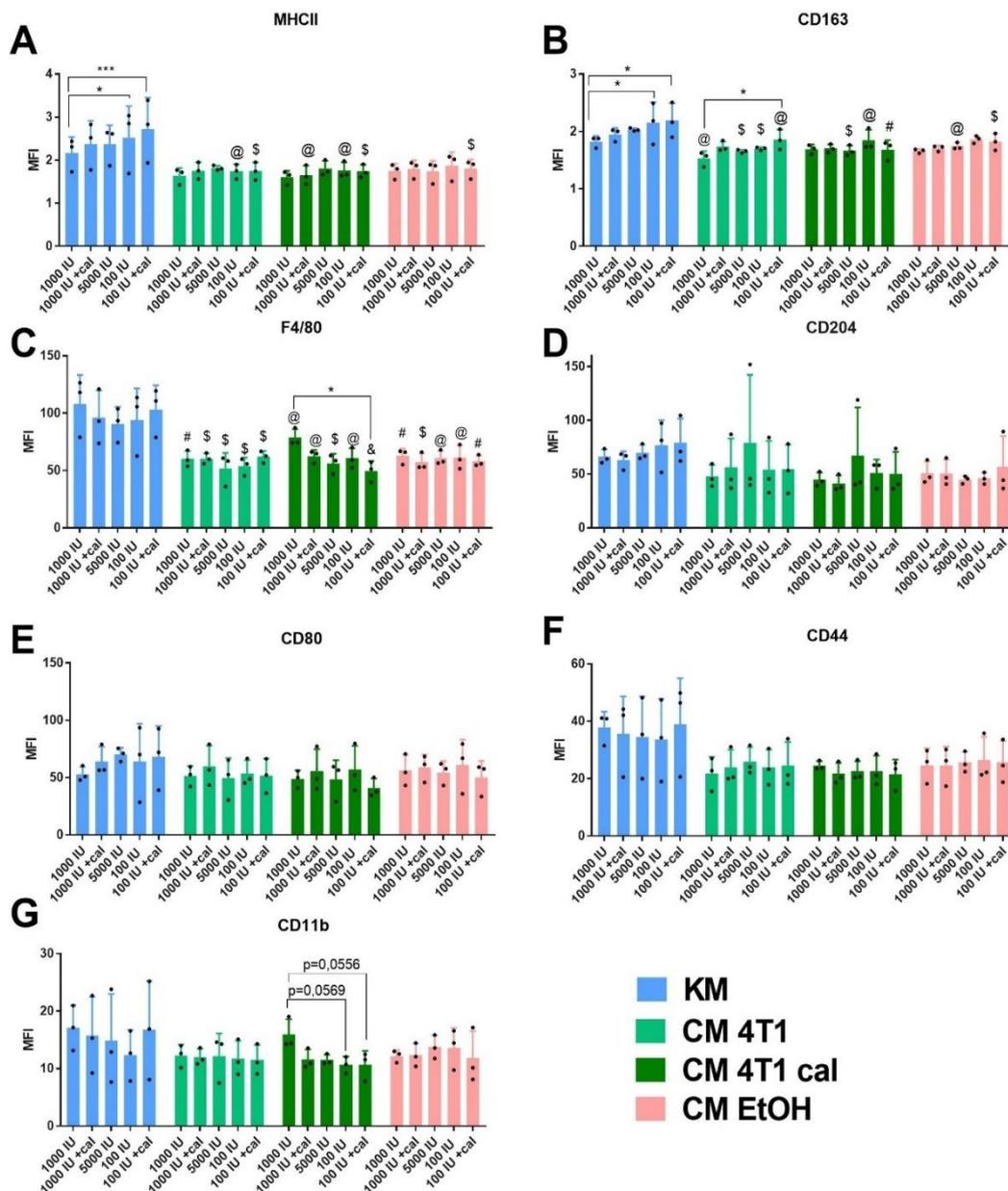
Rycina 14. Ocena stymulowanego LPS (100 ng/mL - 24 h) wydzielania IL-23 (A, B) oraz IL-6 (C) przez komórki TAMs (n=4 izolacje; na jedną składał się materiał pochodzący od 3 myszy) oraz BMDMs (n= 3 myszy) izolowane z guzów oraz szpiku myszy BALB/c karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem, obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR (tylko TAMs). Poziom tych białek oznaczono wykorzystując test ELISA. Wyniki przedstawiono jako wartość średnia ± odchylenie standardowe. Statystyka: test Holm Sidak dla wielokrotnych porównań; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Oznaczenia : ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.**

4.1.8. Analiza fenotypowa BMDMs (izolowanych ze szpiku myszy BALB/c zdrowych, nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych

Ponieważ komórki BMDMs pochodzące od myszy obarczonych komórkami 4T1 okazały się być w jakimś stopniu zanieczyszczone komórkami nowotworowymi, postanowiono sprawdzić, czy uzyskane rezultaty będą miały pokrycie w prostszym układzie eksperymentalnym. Zbadano oddziaływania zachodzące między komórkami nowotworowymi a makrofagami analizując wpływ czynników wydzielanych przez stymulowane kalcytriolem komórki 4T1 (supernatanty z nad hodowli) na makrofagi BMDMs różnicowane w obecności tych czynników. W tym celu użyto komórki szpikowe pochodzące od myszy, którym nie został wszczepiony nowotwór, a które pozostawały na diecie z różną zawartością witaminy D₃, a także traktowane były kalcytriolem w sposób tożsamy jak myszy obarczone komórkami mysich raków gruczołu sutkowego. Schemat bramkowania oraz reprezentatywne histogramy znajdują się w suplemencie – Ryc. S-3.

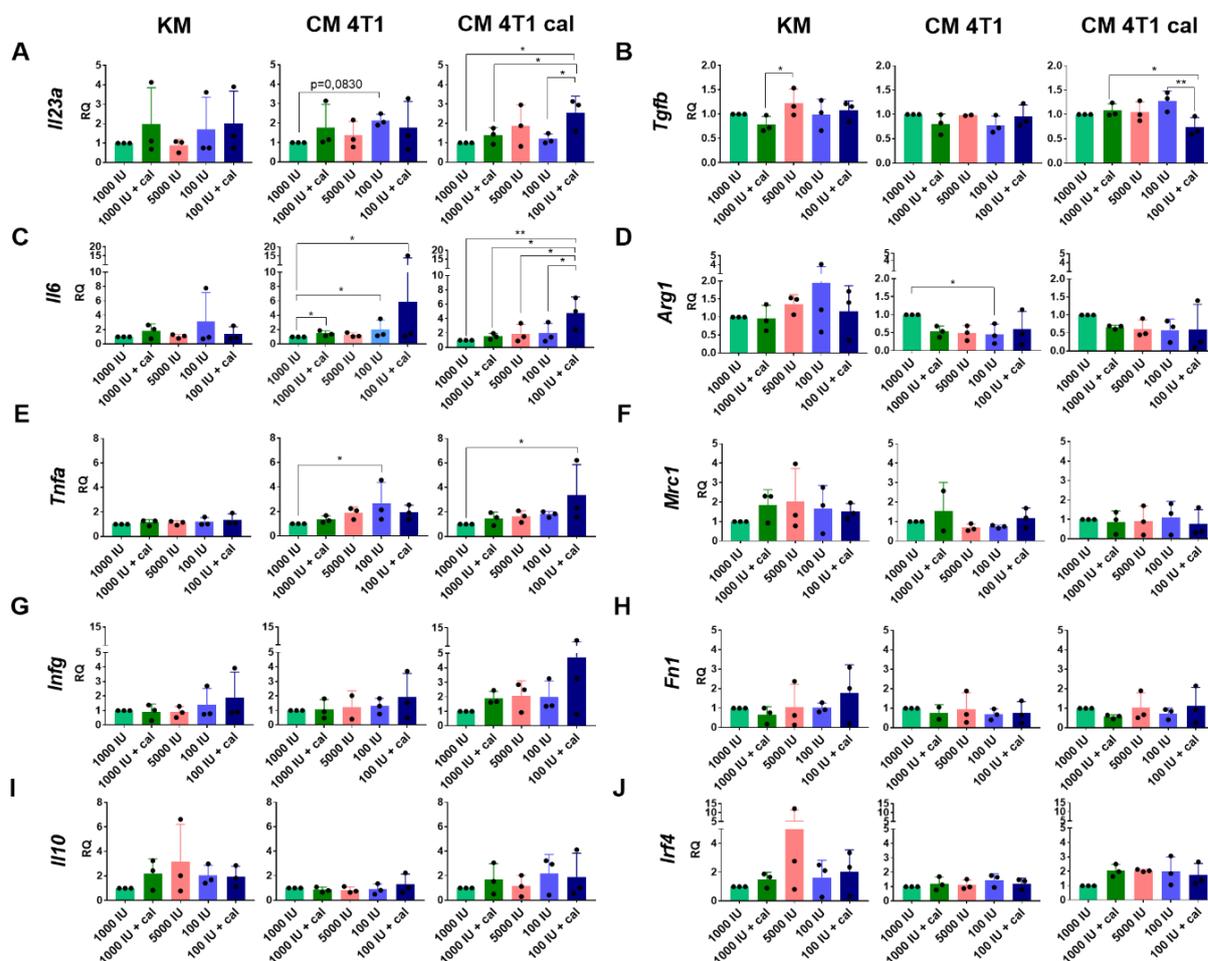
Analiza cytometryczna wykazała, iż różnicowane w medium kontrolnym (KM) komórki BMDMs pochodzące ze szpiku myszy z grup 100 IU oraz 100 IU + cal charakteryzowały się wyższą wartością parametru MFI dla cząsteczki MHCII w porównaniu do kontroli 1000 IU ($p=0,0223$; $p=0,0004$) (Ryc. 15 A). Dodatkowo zaobserwowano ogólny spadek poziomu tego białka w komórkach BMDMs różnicowanych w medium kondycjonowanym (CM) względem KM (istotności statystyczne wskazano na Ryc. 15 A). Poziom cząsteczki CD163 w komórkach różnicowanych w KM ulegał podwyższeniu w grupie BMDMs pochodzących ze szpiku myszy z grupy 100 IU oraz 100 IU + cal względem grupy kontrolnej 1000 IU ($p=0,0384$; $p=0,0173$) (Ryc. 15 B). Podobny wzrost zaobserwowano w komórkach różnicowanych w CM 4T1 w przypadku grupy 100 IU + cal ($p=0,0358$) (Ryc. 15 B). Obserwowano także obniżenie poziomu białka CD163 w grupach BMDMs różnicowanych w obecności CM (bez względu na stymulację komórek 4T1), w porównaniu do BMDMs różnicowanych w KM. Poziom białka F4/80 w grupie komórek różnicowanych w obecności CM 4T1 cal spadał w komórkach BMDMs pochodzących ze szpiku myszy z grupy 100 IU + cal względem grupy kontrolnej 1000 IU ($p=0,0102$) (Ryc. 15 C). Ponadto poziom tego białka spadał we wszystkich grupach BMDMs różnicowanych w obecności CM względem KM.

W przypadku białek CD204, CD80 oraz CD44 nie obserwowano znamienych statystycznie różnic pomiędzy grupami (Ryc. 15 D-F). Poziom białka CD11b w grupie komórek różnicowanych w CM 4T1 cał obniżał się w BMDMs pochodzących ze szpiku myszy z grup 100 IU oraz 100 IU + cał względem grupy 1000 IU. Zmiany te nie były jednak istotne statystycznie ($p=0,0569$; $p=0,0556$) (Ryc. 15 G).



Rycina 15. Analiza fenotypowa BMDMs pochodzących od myszy zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. BMDMs różnicowane w obecności medium kondycjonowanego (CM) znad komórek 4T1 (CM 4T1) oraz znad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal) lub kontrolą rozpuszczalnika dla kalcytriolu- 0,1 % etanolem (CM 4T1 EtOH). KM- kontrola medium. Wartości z trzech niezależnych powtórzeń przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe jako parametr MFI. Badane białka powierzchniowe przedstawiają się następująco: **A.** MHCII, **B.** CD163, **C.** F4/80, **D.** CD204, **E.** CD80, **F.** CD44, **G.** CD11b. Analiza statystyczna: Test Dunnetta dla porównań wielokrotnych względem grupy 1000 IU; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ lub znaki bezpośrednio nad słupkami: @ - $p < 0,05$; \$ - $p < 0,01$; # - $p < 0,001$; & - $p < 0,0001$ porównanie w obrębie poszczególnych grup myszy względem różnicowania BMDMs w obecności KM.

4.1.9. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA w komórkach BMDMs (izolowanych ze szpiku myszy BALB/c zdrowych, nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych



Rycina 16. Analiza qPCR poziomu wybranych genów w BMDMs pochodzących od zdrowych myszy BALB/c, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. BMDMs różnicowane w obecności medium kondycjonowanego (CM) znad komórek 4T1 (CM 4T1) oraz znad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal). Analizę wykonano stosując metodę $\Delta\Delta C_t$ jako kalibrator stosując próbki z grupy 1000 IU. KM- kontrola medium. Prezentowane wartości stanowią krotność zmian ekspresji- RQ. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: Test Fishera (LSD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Oznaczenia : ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

Na podstawie wyników uzyskanych z wcześniejszych analiz oraz danych z piśmiennictwa wytypowano 10 genów związanych z pronowotworową polaryzacją makrofagów. Ponieważ nie obserwowano wpływu CM 4T1 EtOH na fenotyp oraz nie wykazano wpływu 0,1% EtOH na komórki linii 4T1 w licznych testach *in vitro*

wykonywanych w naszym zespole oraz w badaniach własnych, w dalszej części analiz dotyczących BMDMs pominięto tę grupę badaną.

Różnicowanie BMDMs w medium kontrolnym (KM) nie wpłynęło w sposób istotny statystycznie na poziom mRNA genu *Il23a*. Zaobserwowano, iż komórki BMDMs różnicowane w CM 4T1 z grupy 100 IU + cal wykazywały bliski istotności statystycznej wzrost w poziomie mRNA genu *Il23a* względem kontroli 1000 IU ($p=0,0830$). Natomiast różnicowanie BMDMs w CM 4T1 cal wpłynęło w sposób istotny statystycznie na wzrost mRNA *Il23a* w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grup 1000 IU ($p=0,0147$), 1000 IU + cal ($p=0,0495$) oraz 100 IU ($p=0,0274$) (Ryc. 16 A).

Komórki BMDMs z grupy 5000 IU różnicowane w KM wykazywały wzrost poziomu mRNA genu *Tgfb* względem grupy 1000 IU + cal ($p=0,0352$). Medium CM 4T1 nie wpłynęło na zmiany w poziomie mRNA genu *Tgfb*, podczas gdy różnicowanie BMDMs w CM 4T1 cal spowodowało istotne statystycznie obniżenie poziomu tego genu w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grup 1000 IU + cal ($p=0,0436$) oraz 100 IU ($p=0,0050$) (Ryc. 16 B).

W przypadku ekspresji mRNA genu *Il6* w grupie BMDMs różnicowanych w KM nie obserwowano zmian w jego poziomie pomiędzy badanymi grupami. Natomiast, różnicowanie komórek BMDMs w obecności CM 4T1 powodowało istotny statystycznie wzrost poziomu mRNA tego genu w komórkach BMDMs z grup 1000 IU + cal ($p=0,0279$), 100 IU ($p=0,0220$) oraz 100 IU + cal ($p=0,0220$) względem grupy 1000 IU. Różnicowanie BMDMs w CM 4T1 cal powodowało wzrost ekspresji mRNA *Il6* w BMDMs 100 IU + cal względem grupy kontrolnej 1000 IU ($p=0,0056$) oraz w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych ($p<0,05$) (Ryc. 16 C).

Ekspresja mRNA genu *Arg1* w komórkach BMDMs z grupy 100 IU uległa obniżeniu pod wpływem różnicowania w CM 4T1 względem grupy 1000 IU ($p=0,0392$). W przypadku pozostałych grup nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w ekspresji mRNA tego genu (Ryc. 16 D).

W przypadku mRNA genu *Tnfa* nie obserwowano zmian w jego ekspresji pomiędzy badanymi grupami w BMDMs różnicowanych w KM. Wykazano wzrost poziomu mRNA tego genu pod wpływem różnicowania w CM 4T1 cal w BMDMs

z grupy 100 IU w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU ($p=0,0322$). Dodatkowo, CM 4T1 cał spowodowało wzrost poziomu mRNA *Tnfa* w komórkach z grupy 100 IU + cał względem grupy 1000 IU ($p=0,0311$) (Ryc. 16 E).

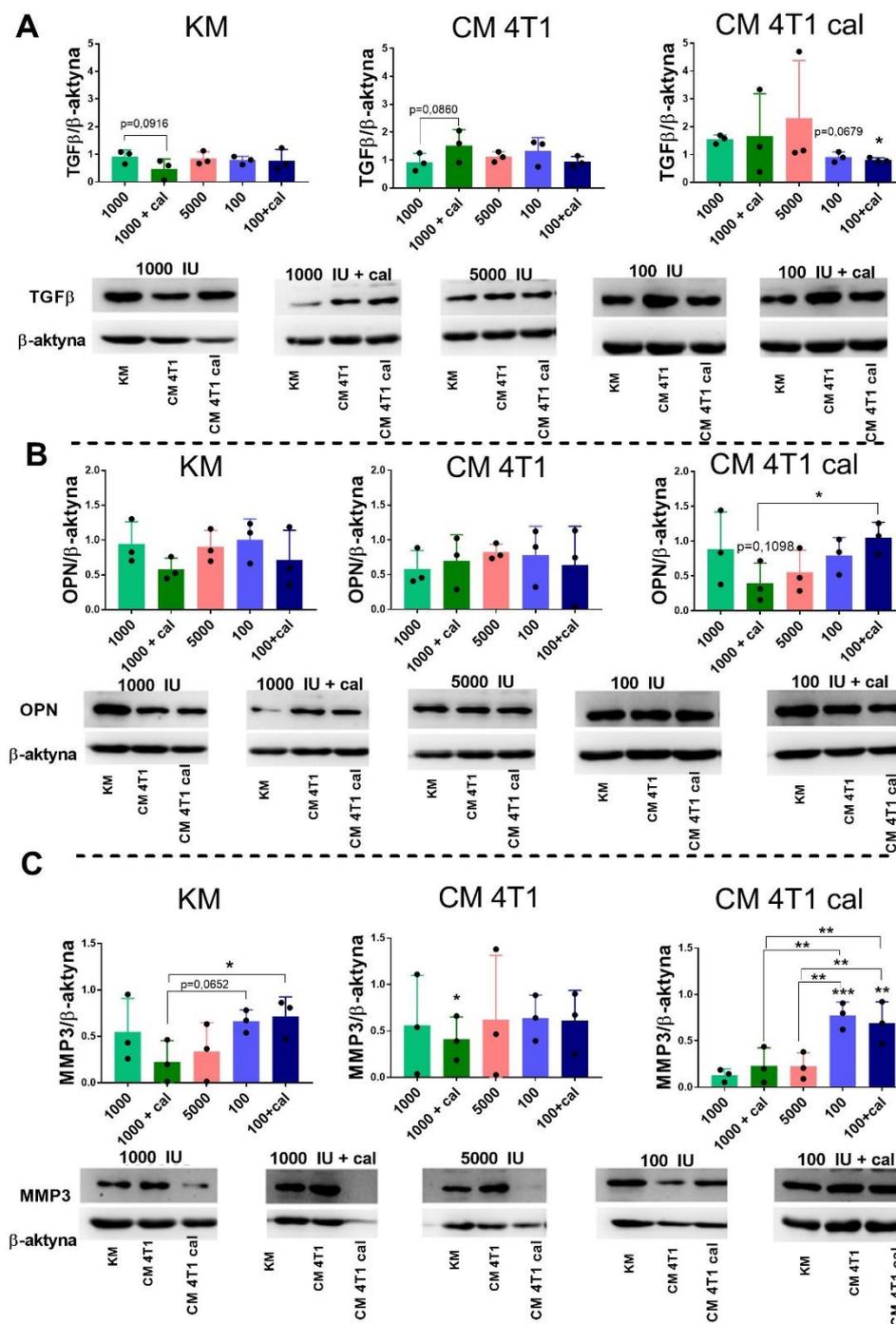
Nie wykazano istotnych statystycznie zmian w ekspresji mRNA genów *Mrc1*, *Infg*, *Fnl1*, *Il10* oraz *Irf4* pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 16 F-J).

4.1.10. Ocena poziomu wybranych białek w BMDMs (izolowanych ze szpiku myszy BALB/c nieobarczonych nowotworem, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych

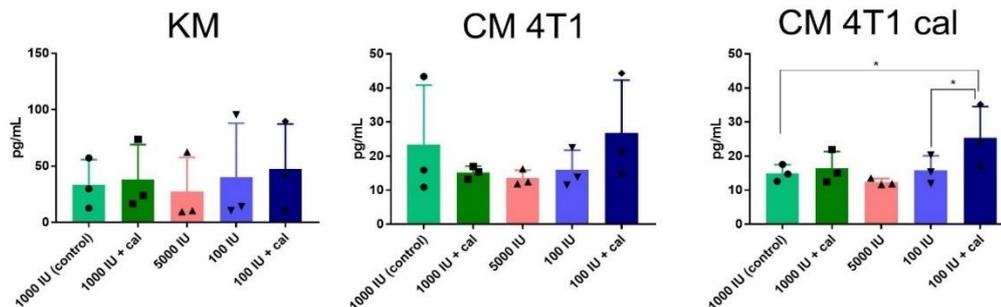
W komórkach BMDMs różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych zbadano poziom wybranych białek, wytypowanych na podstawie analizy qPCR (*Tgfb*, *Il6*) oraz białek, które wg danych z piśmiennictwa mogą podlegać regulacji podczas indukcji stanu zapalnego w nowotworach i sprzyjać procesom przerzutowania²⁰⁷⁻²⁰⁹. Przy użyciu techniki western blot oznaczono poziom TGFβ, OPN oraz MMP-3. Ocenie poddano także poziom wydzielania IL-6 przez komórki BMDMs z użyciem testu ELISA.

Różnicowanie komórek BMDMs w obecności medium kontrolnego (KM), bądź medium kondycjonowanego CM 4T1 nie wpłynęło na zmiany w poziomie białka TGFβ pomiędzy poszczególnymi grupami. Natomiast, różnicowanie tych komórek w obecności medium CM 4T1 cał prowadziło do obniżenia poziomu tego białka w komórkach BMDMs pochodzących ze szpiku myszy z grup niedoborowych (100 IU ($p=0,0679$) oraz 100 IU + cał ($p=0,0285$)) w porównaniu do grupy 1000 IU (Ryc. 17 A). W przypadku białka OPN tylko różnicowanie BMDMs w obecności medium CM 4T1 cał wpłynęło na zmiany w jego poziomie. Zaobserwowano podwyższenie poziomu OPN w grupie 100 IU + cał w porównaniu do grupy 1000 IU + cał ($p=0,0417$), podczas gdy w grupie 1000 IU + cał obserwowano tendencję do spadku poziomu OPN względem grupy kontrolnej 1000 IU (różnica ta nie była jednak istotna statystycznie ($p=0,1098$)) (Ryc. 17 B). Taką samą zależność odnotowano w przypadku metaloproteinazy 3 (MMP-3) w komórkach BMDMs różnicowanych w obecności KM. Obniżenie poziomu MMP-3 w grupie 1000 IU + cał względem kontroli 1000 IU nie było istotne statystycznie ($p=0,1587$). Obserwowano jednak

wzrost poziomu tej cząsteczki w grupie 100 IU + cal względem grupy 1000 IU + cal ($p=0,0432$). Poziom MMP-3 wzrastał w sposób istotny statystycznie w BMDMs różnicowanych w obecności medium CM 4T1 cal, pochodzących z myszy z grup 100 IU ($p=0,0007$) oraz 100 IU + cal ($p=0,0018$) w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU. Wzrost ten był istotny statystycznie także względem grup 1000 IU + cal oraz 5000 IU ($p<0,01$) (Ryc. 17 C).



Rycina 17. Analiza western blot wykonana z lizatów BMDMs pochodzących od myszy zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. BMDMs różnicowane w obecności medium kondycjonowanego (CM) znad komórek 4T1 (CM 4T1) oraz znad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal). Ocena poziomu białek: TGFβ (A); OPN (B), MMP-3 (C). Do wykresów załączono reprezentatywne zdjęcia blotów. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe w odniesieniu do β-aktyny. Analiza statystyczna: TGFβ Test Dunna dla wielokrotnych porównań, OPN: Test Holm-Sidak dla wielokrotnych porównań. Istotności bezpośrednio nad słupkami odnoszą się do porównań do grupy kontrolnej 1000 IU, w innym przypadku - jak wskazano na wykresie. *p<0,05; **p<0,01. Oznaczenia : ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ● 5000 IU; ● 100 IU oraz ● 100 IU + cal.



Rycina 18. Poziom sekrecji IL-6 do medium przez komórki BMDMs (pochodzące od myszy zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowane w obecności medium kondycjonowanego znad komórek 4T1 (CM 4T1) oraz znad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal) lub w obecności medium kontrolnego (KM). Analiza statystyczna: Test Sidaka dla wielokrotnych porównań (1000 IU do 100 IU + cal oraz 100 IU do 100 IU + cal). *p<0,05. Oznaczenia : ● 1000 IU (kontrola); ● 1000 IU + cal; ▲ 5000 IU; ▼ 100 IU oraz ● 100 IU + cal.

Ocenie poddano także poziom sekrecji IL-6 do medium przez komórki BMDMs. Analiza wykazała istotne statystycznie podwyższenie poziomu tej interleukiny w medium pochodzącym znad BMDMs różnicowanych pod wpływem CM 4T1 cal w grupie 100 IU + cal w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU (p=0,0330) oraz 100 IU (p=0,0479). Obecność CM 4T1 podczas procesu różnicowania nie wpływała w sposób istotny statystycznie na poziom sekrecji IL-6 przez komórki BMDMs, podobnie jak obecność medium kontrolnego (KM) (Ryc. 18).

4.1.11. Charakterystyka *in vitro* linii komórkowych raka gruczołu sutkowego

Ekspresja czynników odpowiedzialnych za metabolizm i genomowy mechanizm działania witaminy D₃

Scharakteryzowano *in vitro* linie komórkowe 4T1, 67NR oraz E0771 pod kątem ekspresji na poziomie zarówno mRNA, jak i białka cząsteczek związanych z metabolizmem witaminy D (*Cyp24a1*, *Cyp27b1*) oraz jej genomowym działaniem (*Vdr*) pod wpływem działania kalcytriolu stosowanego w stężeniu 100 nM. We wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że komórki linii 4T1¹⁰ oraz E0771²⁰⁵ nie są wrażliwe na przeciwo proliferacyjną aktywność kalcytriolu, natomiast proliferacja komórek 67NR jest silnie hamowana przez ten związek¹⁰.

Ekspresja mRNA genu *Cyp27b1* nie ulegała istotnym zmianom pod wpływem działania kalcytriolu w komórkach linii 4T1 i E0771 (średnie wartości RQ względem komórek kontrolnych wynosiły odpowiednio 1,43 i 1,39). Natomiast w komórkach linii

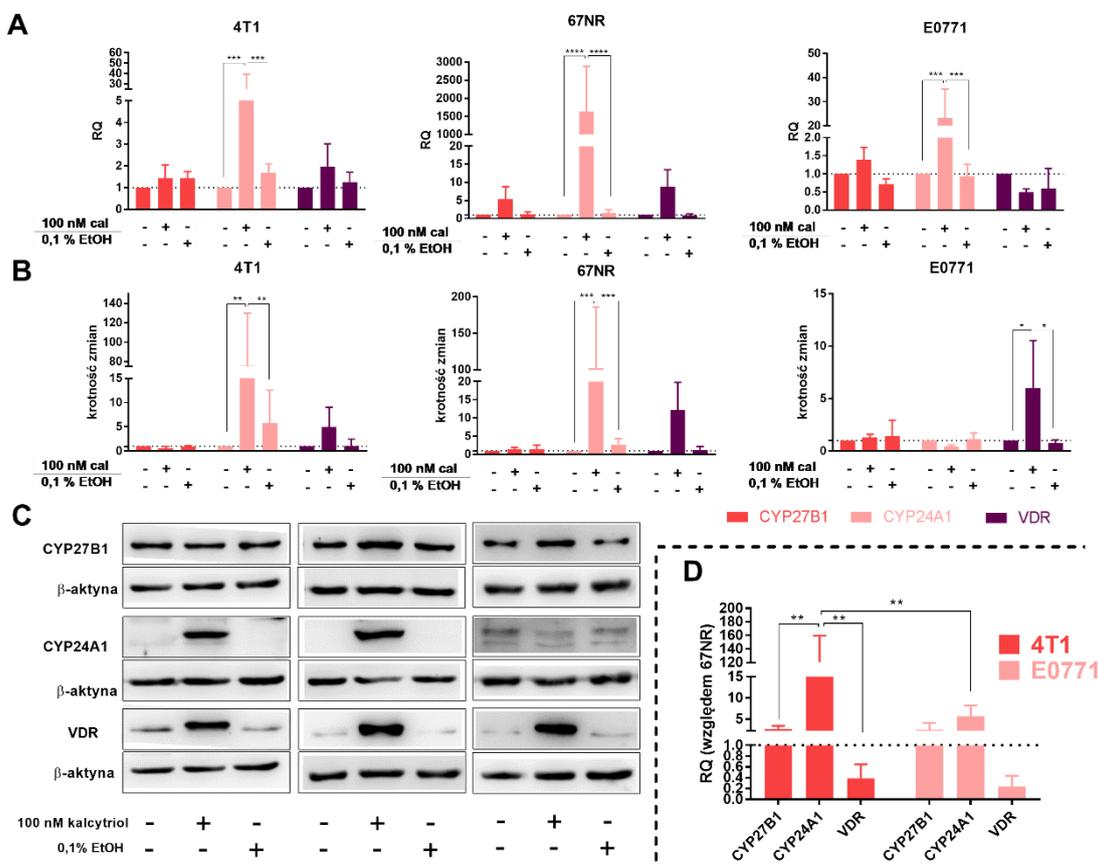
67NR traktowanych kalcytriolem dochodziło do 5-krotnej indukcji tego genu względem komórek kontrolnych. Wartości te nie były jednak istotne statystycznie (Ryc. 19 A).

Analiza qPCR wykazała indukcję ekspresji mRNA genu *Cyp24a1* pod wpływem kalcytriolu w każdej z linii komórkowych. W przypadku 4T1 oraz E0771 była to indukcja odpowiednio 24 i 23-krotna ($p < 0,0001$), podczas gdy w komórkach 67NR obserwowano aż 1635-krotny wzrost ekspresji tego genu ($p < 0,0001$) w porównaniu do komórek nietraktowanych kalcytriolem (Ryc.19 A).

W przypadku mRNA genu *Vdr* obserwowano jego podwyższoną ekspresję pod wpływem działania kalcytriolu w komórkach linii 4T1 (średni parametr RQ wynosił 1,95) i 67NR (średni parametr RQ wynosił 8,82). W komórkach linii E0771 obserwowano efekt obniżenia poziomu *Vdr* o połowę w grupie traktowanej kalcytriolem względem komórek kontrolnych. Zmiany te nie były istotne statystycznie (Ryc.19 A).

W związku ze zbliżoną charakterystyką linii przerzutujących 4T1 i E0771 pod kątem ekspresji cząsteczek związanych z metabolizmem witaminy D₃ pod wpływem działania kalcytriolu, postanowiono sprawdzić w jakim stopniu ich poziom wyjściowo (porównywano komórki nietraktowane kalcytriolem) różni się względem linii 67NR – nieprzerzutującej spontanicznie i wrażliwej na przeciwproliferacyjną aktywność tego związku. W porównaniu do linii nieprzerzutującej 4T1 i E0771 posiadały około 2,5-krotnie wyższą ekspresję mRNA genu *Cyp27b1*. Ponadto, wykazano 115-krotnie wyższy poziom mRNA genu *Cyp24a1* w komórkach linii 4T1 względem 67NR, podczas gdy linia komórkowa E0771 charakteryzowała się tylko 6-krotnie wyższą ekspresją względem linii 67NR (różnica między 4T1 a E0771 była istotna statystycznie; $p < 0,001$). W przypadku mRNA genu *Vdr* komórki linii 4T1 i E0771 wykazały odpowiednio 60% (RQ ~0,4) i 80% (RQ ~0,2) niższą ekspresję względem linii 67NR (Ryc. 19 D).

Analiza zmian poziomu białka CYP27B1 pod wpływem działania kalcytriolu wskazuje na brak istotnych statystycznie zmian w każdej z badanych linii. Kalcytriol wpływa natomiast na podwyższenie poziomu białka CYP24A1 w komórkach linii 4T1 i 67NR (odpowiednio 76 (p<0,01) i 102 (p<0,001) razy w porównaniu do nietraktowanych kontroli). W przypadku E0771 nie obserwuje się zmian w poziomie CYP24A1. Poziom białka VDR ulega podwyższeniu w każdej z badanych linii komórkowych pod wpływem traktowania kalcytriolem, zmiany te są jednak istotne statystycznie tylko w przypadku linii komórkowej E0771 (p<0,05) (Ryc. 19 B-C).

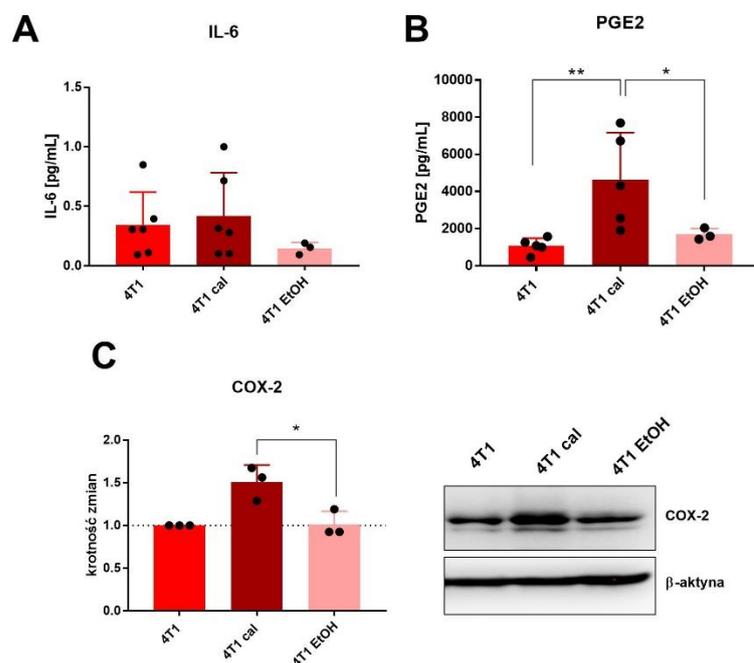


Rycina 19. Charakterystyka komórek linii mysich raków gruczołu sutkowego 4T1, 67NR i E0771 wykorzystanych w badaniach z użyciem zwierząt, traktowanych *in vitro* przez 72 godziny kalcytriolem w stężeniu 100 nM (100 nM cal). **A.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym genów *Cyp24a1*; *Cyp27b1*; *Vdr*. Nietraktowane komórki z każdego modelu służyły jako kalibrator, a obliczenia wykonano stosując średnią z trzech kontroli endogennych (*Hprt*, *B2m* i *Gapdh*); n=4. Analiza statystyczna: A. test wielokrotnych porównań Tukeya *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. **D.** Analiza PCR w czasie rzeczywistym wybranych genów w nietraktowanych liniach komórkowych 4T1 i E0771 w porównaniu z nietraktowanymi komórkami 67NR. **B.** Analiza densytometryczna badanych cząsteczek. Jako kontrolę do normalizacji wyników zastosowano β-aktynę. Wyniki prezentowane są jako krotność zmian w odniesieniu do komórek kontrolnych; n=3. Analiza statystyczna D,B: test wielokrotnych porównań Sidaka; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. **C.** Reprezentatywne zdjęcia blotów dla linii komórkowych 4T1, 67NR, E0771 (odpowiednio od lewej). Wartości na wykresach przedstawiają średnią ± odchylenie standardowe.

Wpływ kalcytriolu in vitro na zmiany w poziomie czynników zapalnych w komórkach 4T1

Ponieważ zaobserwowano indukcję czynników prozapalnych w makrofagach pochodzących ze szpiku myszy obciążonych komórkami 4T1 lub pod wpływem działania CM 4T1 cal, postanowiono poszerzyć charakterystykę komórek 4T1 traktowanych kalcytriolem o analizę poziomu IL-6 oraz COX-2 oraz bezpośredni produkt reakcji katalizowanej przez ten enzym – PGE2, jako czynników silnie indukujących odpowiedź zapalną w raku gruczołu sutkowego^{210,211}.

Analiza sekrecji IL-6 do medium nie wykazała istotnych statystycznie różnic w jej poziomie pomiędzy komórkami traktowanymi a nietraktowanymi kalcytriolem czy roztworem rozpuszczalnika – 0,1% etanolem (EtOH) (Ryc. 20 A). Natomiast, obserwowano 4-krotne podwyższenie sekrecji PGE2 do medium w porównaniu do komórek kontrolnych ($p=0,0060$) oraz traktowanych 0,1% EtOH ($p<0,05$) (Ryc. 20 B). Analiza western blot wykazała istotną statystycznie indukcję ($p=0,0229$) białka COX-2 w komórkach 4T1 stymulowanych kalcytriolem (Ryc. 20 C).



Rycina 20. Wpływ kalcytriolu na poziom czynników zapalnych w komórkach linii 4T1 A-B. Stężenie wydzielanych IL-6 oraz PGE2 do CM znad komórek 4T1 traktowanych 100 nM kalcytriolem przez 72 godziny, a następnie dodatkowo traktowanych medium bez FBS przez 24 godziny. **C.** Analiza western blot poziomu białka COX-2 w lizatach komórkowych 4T1 traktowanych 100 nM kalcytriolem przez 72 godziny. Analiza statystyczna: **A - C.**: Test wielokrotnych porównań Holm-Sidaka - 4T1 do 4T1 cal i 4T1 cal do 4T1 EtOH; * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych z analiz przeprowadzonych z użyciem komórek i tkanek pochodzących od myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego

Badania dotyczące wpływu zróżnicowanego dostarczania witaminy D₃ w karmie i traktowania myszy kalcytriolem na udział makrofagów w progresji mysiego raka gruczołu sutkowego, wykazały iż:

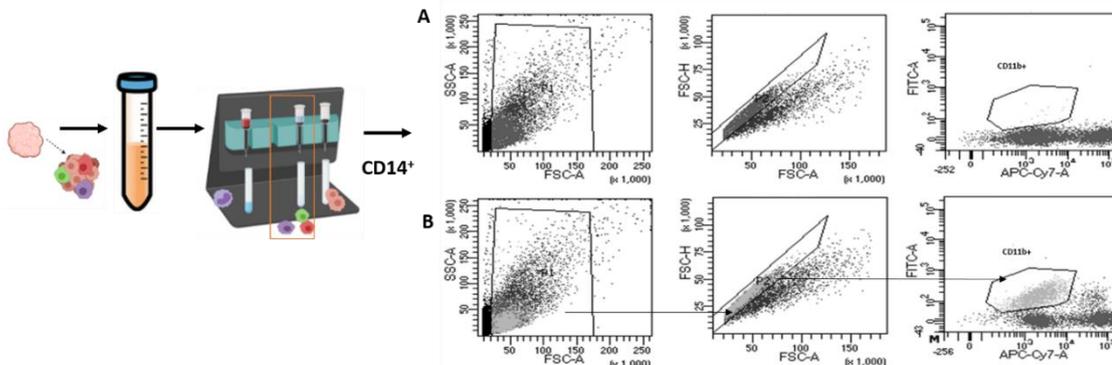
1. Traktowanie kalcytriolem (1000 IU + cal, 100 IU + cal) oraz suplementacja witaminy D₃ (5000 IU) w diecie nasilały proces przerzutowania do płuc i szpiku kostnego u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1, nie wpływając na objętość guzów pierwotnych. W przypadku guzów 67NR obserwowano przejściowy efekt zahamowania wzrostu guza w dniu 23 w grupie 1000 IU + cal w porównaniu do kontroli 1000 IU. W przerzutującym modelu E0771 nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu podawanej diety lub traktowania kalcytriolem na zmiany w liczbie przerzutów do płuc oraz w objętości guzów pierwotnych.
2. TAMs izolowane z guzów 4T1 od myszy z grup, w których obserwowano nasilony proces przerzutowania (1000 IU + cal oraz 5000 IU) charakteryzowały się podwyższonym poziomem CD44 przy jednoczesnym obniżeniu poziomu MHCII na swojej powierzchni, co świadczy o pogłębieniu fenotypu M2 makrofagów w tych grupach (CD44^{high}MHCII^{low}). Dodatkowo, wzrost poziomu CD44 był skorelowany ze wzrostem poziomu osteopontyny (OPN) w tkance guza 4T1 w grupach 1000 IU + cal; 5000 IU oraz 100 IU + cal.
3. W przypadku fenotypu TAMs 67NR oraz E0771 zaobserwowano podwyższenie poziomu białka CD163 (marker makrofagów klasy M2) w grupie myszy 100 IU + cal względem grupy 100 IU. Dodatkowo TAMs E0771 w grupie 1000 IU + cal względem grupy 1000 IU charakteryzują się obniżeniem poziomu MHCII na swojej powierzchni. Obserwowane zmiany w fenotypie TAMs nie korelowały ze zmianami w liczbie przerzutów czy kinetyką wzrostu guzów.
4. Analiza ekspresji genów w TAMs izolowanych z guzów 4T1 wykazała podwyższenie poziomu mRNA, m.in. *Cyp24a1* czy *Ccr2* w grupach 1000 IU + cal, 5000 IU oraz 100 IU + cal, przy jednoczesnym obniżeniu *Il10*, *Tnf* w porównaniu do TAMs 67NR. Wzrost ekspresji *Il23a* obserwuje się zarówno w przypadku TAMs 4T1, jak i TAMs 67NR.
5. Nie obserwowano istotnych zmian w fenotypie komórek BMDMs izolowanych od myszy obciążonych rakiem 4T1, jednak analiza ekspresji genów na poziomie mRNA wskazała na wzrost ekspresji *Epcam*, co było związane z obecnością przerzutów w kościach myszy obciążonych tym typem nowotworu. Wynik ten korelował ze wzrostem ekspresji genu kodującego IL-23 (*Il23a*) w komórkach BMDMs w grupach 100 IU + cal oraz IL-6 (*Il6*) w grupie 1000 IU + cal. Sekrecja IL-23 przez komórki BMDMs była zależna od suplementacji witaminy D₃

- w diecie i traktowania kalcytriolem, jednak była niewielka w porównaniu z wysoką sekrecją IL-6 do medium.
6. W komórkach BMDMs (pochodzących od myszy zdrowych) różnicowanych w obecności medium kondycjonowanego znad komórek 4T1 (niezależnie od ich stymulacji kalcytriolem) obserwowano obniżenie poziomu markerów makrofagowych, szczególnie F4/80 oraz MHCII. Ponadto w grupie BMDMs 100 IU + cal różnicowanych w CM 4T1 cal wykazano obniżenie poziomu CD11b oraz F4/80 względem grupy 1000 IU. Dodatkowo, medium znad komórek 4T1 stymulowanych kalcytriolem (CM 4T1 cal) zwiększało poziom genów kodujących czynniki zapalne tj. IL-23; IL-6; TNF α (*Il23a*, *Il6*, *Tnfa*) przy jednoczesnym obniżeniu genu kodującego TGF β (*Tgfb*) w grupie komórek BMDMs 100 IU + cal. Wzrost ekspresji mRNA genu *Il6* był zbieżny ze wzrostem sekrecji IL-6 do medium przez te komórki. Ponadto, wzrost poziomu IL-6 obserwowano także w tkance guza 4T1 w grupie 100 IU + cal względem grupy 100 IU. Natomiast obniżenie poziomu mRNA genu *Tgfb* było zbieżne z obniżeniem poziomu białka TGF β w komórkach BMDMs (różnicowanych w obecności CM 4T1 cal) izolowanych ze szpiku myszy z grupy 100 IU + cal względem grupy kontrolnej 1000 IU.
 7. Charakterystyka *in vitro* komórek mysich linii raków gruczołu sutkowego wykazała podobieństwo linii przerzutujących i niewrażliwych *in vitro* na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu (4T1 oraz E0771) pod kątem wyższej ekspresji mRNA genu *Cyp24a1*, przy jednocześnie niskim poziomie *Vdr* w porównaniu do linii nieprzerzutującej, wrażliwej na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu – 67NR. Komórki linii 4T1 oraz E0771 w podobny sposób odpowiadały na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka związane z metabolizmem witaminy D₃ pod wpływem kalcytriolu (*Cyp24a1* oraz *Cyp27b1*). Natomiast w przypadku CYP24A1 na poziomie białka tylko w przypadku komórek linii 4T1 obserwowano wzrost jego poziomu pod wpływem działania kalcytriolu.
 8. Wykazano, iż stymulacja kalcytriolem powodowała wzrost poziomu białka COX-2 w komórkach linii 4T1, co miało bezpośrednie przełożenie na zwiększoną sekrecję PGE2 do medium przez te komórki.

Niekorzystna (w kontekście progresji choroby) aktywacja komórek 4T1 pod wpływem działania kalcytriolu może być wynikiem indukcji COX-2 oraz PGE2. Aktywowana w ten sposób odpowiedź zapalna komórek 4T1 może wpływać na polaryzację makrofagów w kierunku wzmagającym procesy przerzutowania u myszy obarczonych tym typem nowotworu. Ponadto makrofagi wywodzące się z grupy myszy karmionych karmą z niedoborem witaminy D₃ i dodatkowo traktowanych kalcytriolem (100 IU + cal) wykazały wyższą wrażliwość na wydzielane przez komórki 4T1 czynniki indukujące odpowiedź zapalną.

4.2. Badania z użyciem komórek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego

4.2.1. Charakterystyka fenotypowa TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego



Rycina 21. Schemat separacji i bramkowania makrofagów izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Po mechanicznej dezintegracji guza, zawiesinę komórek poddawano magnetycznej separacji z użyciem przeciwciał anti-CD14. Wyizolowane w ten sposób komórki CD14⁺ analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej celem oceny obecności markerów powierzchniowych charakterystycznych dla klas makrofagów M1/M2. Z ogólnej populacji komórek bramkowano komórki pojedyncze, następnie żywe (negatywne na barwnik APC-Cy7) i jednocześnie dodatnie na marker CD11b-FITC. A. Komórki nieznakowane przeciwciałami, B. Komórki znakowane przeciwciałami.

Wyniki uzyskane z charakterystyki fenotypowej TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego podzielono ze względu na kilka parametrów klinicznych:

- status menopauzalny – przed i po menopauzie, przyjmując następujące kryteria dla pacjentek przed okresem menopauzalnym poziom estradiolu (E2) wyższy niż 20 pg/mL oraz hormonu folikulotropowego (FSH) niższy niż 40 mIU/mL²¹²; dodatkowo dokonano podziału wewnątrz tych grup pod względem poziomu 25(OH)D₃ w osoczu zgodnie z poniższym opisem,
- poziom metabolitu witaminy D₃ (25(OH)D₃) w osoczu – przyjmując za poziom niski, stężenie 25(OH)D₃ niższe niż 30 ng/mL oraz za poziom prawidłowy, stężenie 25(OH)D₃ wyższe niż 30 ng/mL²¹³,
- obecność lub brak przerzutów w dole pachowym wyrażony w liczbie przerzutów na podstawie wyników analizy histopatologicznej otrzymanych z DCOPIH.

Analiza parametrów klinicznych przedstawiona w Tabeli 11 potwierdza istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami (status przed i pomenopauzalny oraz poziom metabolitu 25(OH)D₃) na poziomie istotności $p < 0,0001$. W przypadku podziału

ze względu na osoczowy poziom 25(OH)D₃ w obrębie grupy przed- oraz pomenopauzalnej także wykazano istotne statystycznie zmiany w jego poziomie ($p=0,0058$; $p<0,0001$). W grupie pacjentek po menopauzie obserwuje się także korelację pomiędzy niskim stężeniem 25(OH)D₃, a wysokim wskaźnikiem BMI. Dodatkowo pomiędzy grupą pacjentek przed i po menopauzie, oprócz różnic w poziomie hormonów (FSH oraz estradiolu) obserwuje się istotne statystycznie zmiany we wskaźniku BMI. Pacjentki po menopauzie wykazują wyższą wartość wskaźnika BMI (BMI = 29,15) świadczącą o nadwadze lub otyłości pacjentek w tej grupie względem grupy pacjentek przed menopauzą, gdzie średnie BMI (BMI = 24,30) nie przekracza wartości prawidłowych²¹⁴ ($p=0,0031$) (Tabela 11). W grupie pacjentek z niskim stężeniem metabolitu 25(OH)D₃ obserwuje się bliską istotności statystycznej wyższą wartość wskaźnika BMI w porównaniu do grupy z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu ($p=0,0532$) (Tabela 11). Ponadto w grupie podzielonej ze względu na obecność lub brak przerzutów w dole pachowym nie obserwuje się istotnych statystycznie zmian pomiędzy rozpatrywanymi parametrami klinicznymi.

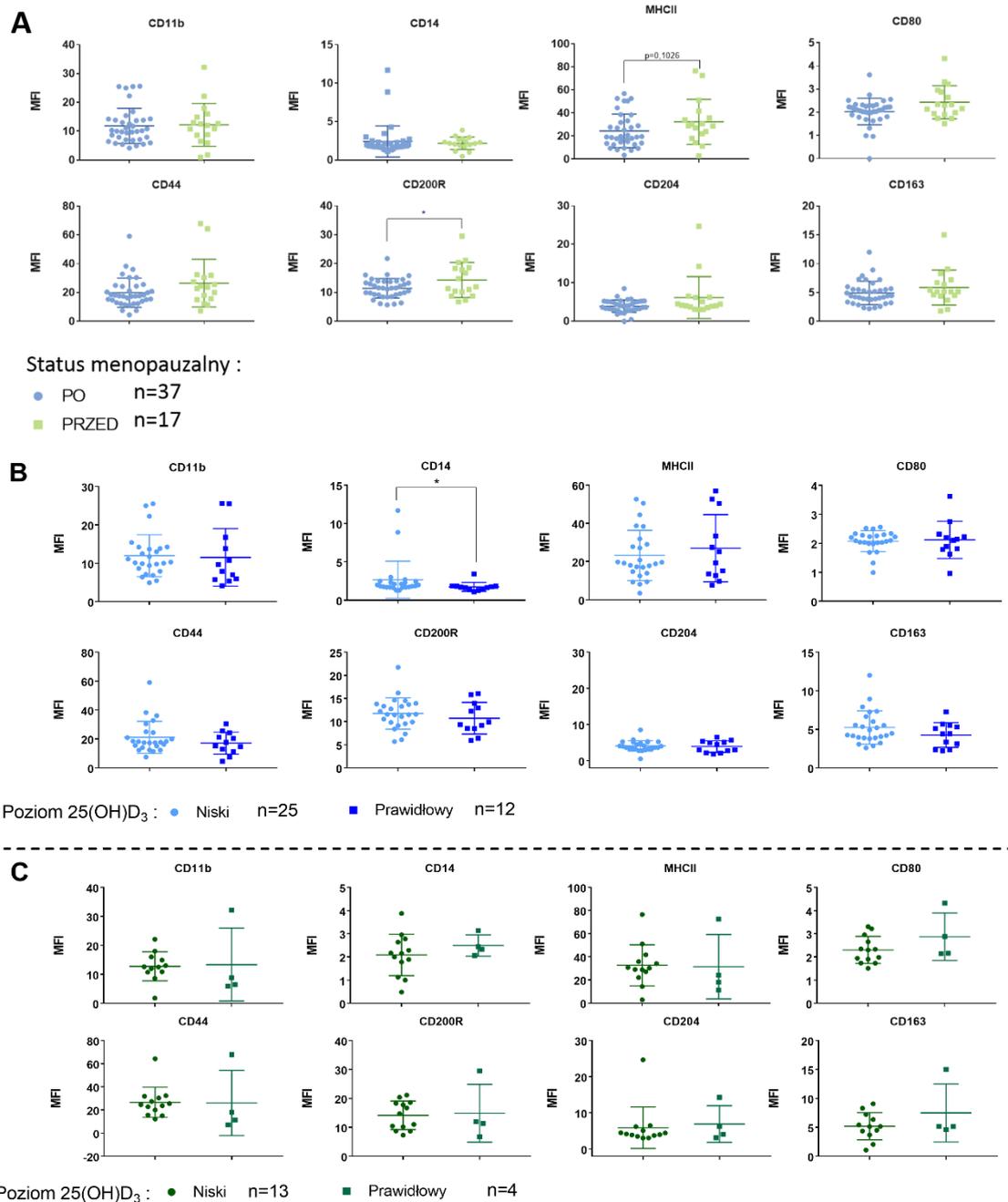
Tabela 11. Charakterystyka parametrów klinicznych pacjentek w poszczególnych grupach badanych. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: test *t*, **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001.

		status menopauzalny					
Grupa		po menopauzie		przed menopauzą		<i>p</i>	
n=		37		17			
Wiek		69,16 \pm 8,68		49,23 \pm 9,40		<0,0001	
FSH [mIU/ml]		68,64 \pm 28,57		16,34 \pm 13,38		<0,0001	
Estradiol [pg/ml]		14,49 \pm 9,43		152,06 \pm 171,17		<0,0001	
25(OH)D ₃ [ng/mL]		25,61 \pm 14,05		26,21 \pm 10,84		0,8768	
Wielkość guza [mm]		21,32 \pm 11,19		24,47 \pm 11,06		0,3394	
Ki67 [%]		21,89 \pm 14,50		21,88 \pm 20,05		0,9983	
BMI		29,15 \pm 5,73		24,3 \pm 4,33		0,0031	
		poziom 25(OH)D ₃					
		prawidłowy		<i>p</i>	prawidłowy		<i>p</i>
n=		12	25		4	13	
25(OH)D ₃ [ng/mL]		41,13 \pm 7,58	18,16 \pm 7,59	<0,0001	43,15 \pm 7,29	21,00 \pm 4,29	0,0058
Wielkość guza [mm]		21,92 \pm 11,36	21,04 \pm 11,33	0,8264	25,75 \pm 16,62	24,08 \pm 9,66	0,8585
Ki67 [%]		20,75 \pm 12,31	22,48 \pm 15,75	0,7405	33,00 \pm 36,04	18,17 \pm 11,57	0,4738
BMI		26,39 \pm 4,70	30,47 \pm 5,78	0,0406	22,00 \pm 4,37	25,00 \pm 4,22	0,2816
		poziom 25(OH)D ₃					
Grupa		prawidłowy		niski		<i>p</i>	
n=		16		38			
Wiek		61,38 \pm 13,05		63,53 \pm 12,89		0,5795	
FSH [mIU/ml]		60,54 \pm 41,01		48,11 \pm 31,65		0,2336	
Estradiol [pg/ml]		48,94 \pm 100,60		61,53 \pm 120,68		0,7154	
25(OH)D ₃ [ng/mL]		41,63 \pm 10,42		19,13 \pm 6,72		<0,0001	
Wielkość guza [mm]		22,87 \pm 12,36		22,07 \pm 10,76		0,8113	
Ki67 [%]		23,81 \pm 20,02		21,00 \pm 14,43		0,5640	
BMI		25,30 \pm 4,89		28,60 \pm 5,86		0,0532	
		przerzuty w dole pachowym					
Grupa		obecne		brak		<i>p</i>	
n=		14		36			
Wiek		63,07 \pm 13,75		62,44 \pm 12,91		0,8797	
FSH [mIU/ml]		43,34 \pm 26,03		56,23 \pm 37,56		0,2456	
Estradiol [pg/ml]		101,43 \pm 179,92		39,47 \pm 74,86		0,0891	
25(OH)D ₃ [ng/mL]		25,49 \pm 9,54		26,04 \pm 14,73		0,8978	
Wielkość guza [mm]		23,21 \pm 12,69		22,80 \pm 10,97		0,9100	
Ki67 [%]		21,57 \pm 14,52		21,29 \pm 17,48		0,9578	
BMI		28,68 \pm 5,09		27,2 \pm 6,06		0,4229	

FSH- hormon folikulotropowy; 25(OH)D₃- kalcyfediol; BMI (ang. *body mass index*)- wskaźnik masy ciała

Wśród pacjentek o zróżnicowanym statusie menopauzalnym wykazano tendencję do zwiększenia poziomu cząsteczki MHCII oraz CD80 na powierzchni TAMs izolowanych z guzów pacjentek będących przed menopauzą w porównaniu do pacjentek po menopauzie, różnice te nie były jednak istotne statystycznie (odpowiednio *p*=0,1026; *p*=0,1241). Poziom CD200R był istotnie statystycznie wyższy w grupie TAMs izolowanych z guzów pacjentek przed menopauzą w porównaniu do grupy pomenopauzalnej (*p*=0,0281). W przypadku pozostałych markerów powierzchniowych (CD11b, CD14, CD44, CD204, CD163) nie odnotowano znamienych statystycznie różnic w ich poziomie pomiędzy porównywanymi parametrami klinicznymi (Ryc. 22 A).

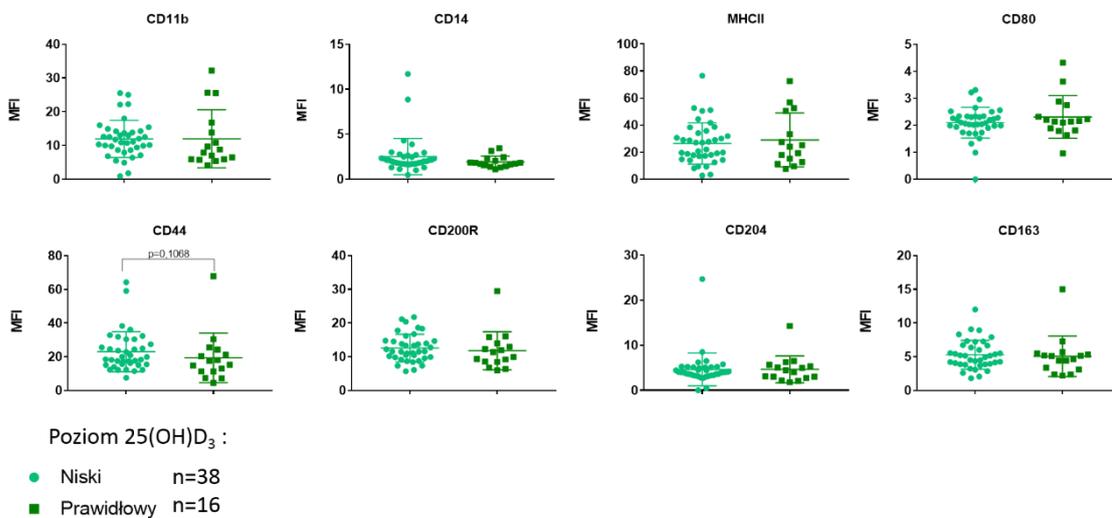
Wśród pacjentek po menopauzie z niskim poziomem 25(OH)D₃ w osoczu zaobserwowano wyższy poziom CD14 w porównaniu z grupą pacjentek z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ (p=0,0245) (Ryc. 22 B). Dla pozostałych białek nie wykazano istotnych statystycznie zmian w zależności od osoczowego poziomu 25(OH)D₃ (Ryc. 22 B). Podobnie w przypadku pacjentek przed menopauzą nie zaobserwowano znamiennej różnicy w poziomie poszczególnych białek powierzchniowych w zależności od osoczowego poziomu 25(OH)D₃ (Ryc. 22 C).



Rycina 22. Ocena poziomu białek powierzchniowych TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. A. Podział ze względu na status menopauzalny. B. Podział ze względu

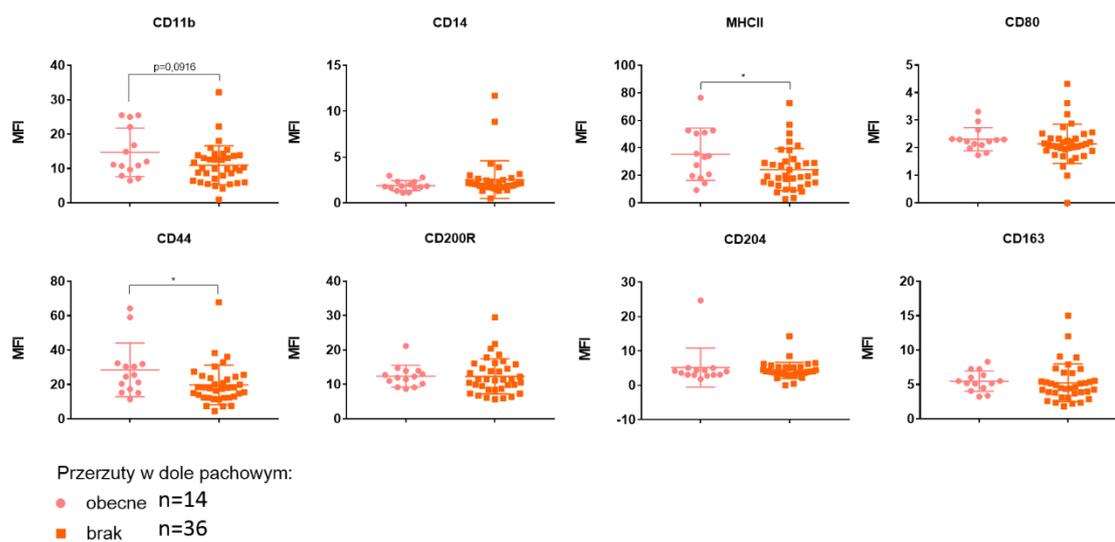
na poziom 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek w grupie pomenopauzalnej. C. Podział ze względu na poziom 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek w grupie przedmenopauzalnej. Dane przedstawiono jako indywidualne wartości oraz wartość średnią MFI ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: niesparowany test t, *p<0,05.

Podział pacjentek ze względu na poziom metabolitu witaminy D (25(OH)D₃) w osoczu nie wykazał istotnych statystycznie różnic w żadnym z badanych markerów powierzchniowych pomiędzy badanymi grupami. Zaobserwowano jednak bliski istotności statystycznej niższy poziom cząsteczki CD44 na powierzchni TAMs izolowanych z guzów pacjentek o prawidłowym poziomie 25(OH)D₃ w porównaniu do pacjentek o jego niskim stężeniu w osoczu (p=0,1068) (Ryc. 23).



Rycina 23. Ocena poziomu białek powierzchniowych TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Podział ze względu na poziom metabolitu witaminy D₃ (25(OH)D₃) w osoczu. Dane przedstawiono jako indywidualne wartości oraz wartość średnią MFI ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: Mann Whitney test, *p<0,05.

TAMs izolowane z guzów pacjentek, u których stwierdzono obecność przerzutów w dole pachowym charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższym poziomem białek powierzchniowych CD44 oraz MHCII (odpowiednio p=0,0283; p=0,0419) względem grupy pacjentek bez stwierdzonych przerzutów. Ponadto obserwowano tendencję do zwiększenia poziomu CD11b na powierzchni TAMs izolowanych z guzów pacjentek, u których stwierdzono obecność przerzutów w dole pachowym względem grupy pacjentek bez stwierdzonej obecności przerzutów (p=0,0916) (Ryc.24).



Rycina 24. Ocena poziomu białek powierzchniowych TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Podział ze względu na obecność przerzutów w dole pachowym. Dane przedstawiono jako indywidualne wartości oraz wartość średnią MFI \pm odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: Mann Whitney test, * $p < 0,05$.

4.2.2. Ocena wpływu kalcytriolu na proces różnicowania *ex vivo* MDMs (izolowanych z krwi obwodowej pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo oraz rozsiałym rakiem gruczołu sutkowego) do klas makrofagów M0, M1, M2a, M2c

Wykonano charakterystykę fenotypową MDMs różnicowanych – bez lub w obecności kalcytriolu stosowanego w stężeniach 1 nM, 10 nM oraz 100 nM – do klas makrofagów M0 (grupa komórek wyjściowych, różnicowanych stale w obecności czynnika M-CSF), M1 (stymulowanych czynnikami LPS oraz TNF α), M2a (stymulowanych IL-4) oraz M2c (stymulowanych IL-10). Uzyskane wyniki dla pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego podzielono na dwie główne grupy ze względu na status menopauzalny pacjentek (przed i po menopauzie). Dodatkowo wewnątrz ww. grup dokonano podziału ze względu na poziom metabolitu witaminy D₃ w osoczu (niski oraz prawidłowy). Pacjentki ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego z przerzutami odległymi (rozsiały typ nowotworu) stanowiły dodatkową, odrębną grupę badaną. Ze względu na niewielką liczbę pacjentek, u których wykryto przerzuty odległe (n=11) nie dokonywano podziału wobec innych parametrów klinicznych w tej grupie i analizowano ją jako całość.

Analiza parametrów klinicznych przedstawiona w Tabeli 12 potwierdza istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami (status przed i pomenopauzalny oraz poziom metabolitu 25(OH)D₃) na poziomie istotności $p < 0,0001$. Ponadto w grupie klinicznej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego zaobserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy pacjentkami przed i po menopauzie w wartości wskaźnika BMI. Pacjentki w okresie po menopauzie charakteryzują się wyższym wskaźnikiem BMI (średnia wartość 28,53, która świadczy o większym odsetku chorych otyłych lub z nadwagą w tej grupie²¹⁴) względem pacjentek przed menopauzą ($p=0,0019$) (średnia wartość BMI 24,54). Dodatkowo, podział wewnątrz tych grup wykazał, iż w grupie pacjentek przed menopauzą o niskim stężeniu metabolitu 25(OH)D₃ obserwowano wyższą wartość wskaźnika BMI względem grupy o prawidłowym stężeniu 25(OH)D₃ ($p=0,0168$). W grupie pacjentek w okresie po menopauzie podział ze względu na poziom metabolitu 25(OH)D₃ wykazał podobne tendencje ($p=0,0520$). W grupie pacjentek w stadium uogólnionym (rozsiałym) choroby średni poziom metabolitu 25(OH)D₃ (23,21 ng/mL) wskazuje na niski poziom witaminy D w tej grupie. Dodatkowo poziom hormonów FSH oraz E2, jak i wiek

pacjentek wskazuje, iż grupę chorych z przerzutami stanowią w większości pacjentki w okresie po menopauzie.

Tabele z analizą statystyczną dotyczącą efektywności indukcji markerów charakterystycznych dla poszczególnych klas makrofagów oraz reprezentatywne zdjęcia hodowli komórkowych znajdują się w suplemencie (Tabele S-2-4, Ryciny S-4-6).

Tabela 12. Charakterystyka parametrów klinicznych pacjentek w poszczególnych grupach badanych. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: test *t*, **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001.

Pacjentki z miejscowo zlokalizowanym rakiem						
status menopauzalny						
Grupa	po menopauzie			przed menopauzą		<i>p</i>
n=	63			27		
Wiek	67,95 \pm 8,76			48,41 \pm 9,13		<0,0001
FSH [mIU/ml]	69,37 \pm 27,33			12,04 \pm 12,29		<0,0001
Estradiol [pg/ml]	12,41 \pm 9,14			121,44 \pm 99,29		<0,0001
25(OH)D ₃ [ng/mL]	23,77 \pm 12,53			27,44 \pm 9,88		0,1801
Wielkość guza [mm]	18,57 \pm 11,72			25,15 \pm 18,67		0,0460
Ki67 [%]	23,02 \pm 16,29			25,63 \pm 20,86		0,5246
BMI	28,53 \pm 5,32			24,54 \pm 5,61		0,0019
poziom 25(OH)D ₃						
	prawidłowy			niski		<i>p</i>
n=	16	47		9	18	
25(OH)D ₃ [ng/mL]	40,00 \pm 10,17	17,81 \pm 6,86	<0,0001	39,11 \pm 7,25	21,61 \pm 4,06	<0,0001
Wielkość guza [mm]	17,38 \pm 9,22	19,02 \pm 12,65	0,6356	30,89 \pm 27,77	22,28 \pm 12,01	0,2660
Ki67 [%]	20,25 \pm 12,15	24,20 \pm 17,70	0,4117	27,83 \pm 29,43	24,89 \pm 18,20	0,7505
BMI	26,40 \pm 4,70	29,40 \pm 5,39	0,0520	20,98 \pm 3,65	26,32 \pm 5,66	0,0168
Pacjentki z rakiem w stadium uogólnionym (rozszianym)						
	n= 11					
Wiek	64,18 \pm 10,86					
FSH [mIU/ml]	49,39 \pm 33,54					
Estradiol [pg/ml]	25,50 \pm 39,79					
25(OH)D ₃ [ng/mL]	23,21 \pm 10,26					
Wielkość guza [mm]	55,20 \pm 49,34					
Ki67 [%]	31,11 \pm 15,37					
BMI	25,45 \pm 2,71					
FSH- hormon folikulotropowy; 25(OH)D ₃ - kalcyfediol; BMI (ang. <i>body mass index</i>)- wskaźnik masy ciała						

MDMs izolowane z krwi pacjentek będących po menopauzie (Ryc.25, Ryc.26)

MDMs zróżnicowane do klasy makrofagów M1 oraz M2a wykazywały odpowiednio obniżenie (ok. 43%, (*p*<0,0001 – Tabela S-2 A)) oraz podwyższenie (ok. 31%, *p*<0,0001 –Tabela S-2 A) poziomu białka CD11b względem komórek wyjściowych M0. Inkubacja z kalcytriolem, podobnie jak wysoki lub niski poziom 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek nie wpływały dodatkowo na zmiany w poziomie CD11b. MDMs stymulowane do klasy makrofagów M2c w grupie pacjentek o prawidłowym

stężeniu 25(OH)D₃ w osoczu, wykazywały istotny statystycznie wzrost poziomu CD11b po inkubacji komórek z kalcytriolem stosowanym w stężeniu 1nM w porównaniu do grupy nietraktowanej ($p < 0,05$) (Ryc.25 A).

Poziom cząsteczki CD14 ulegał podwyższeniu po stymulacji MDMs do makrofagów M2c względem stymulacji do M0 (wzrost o ok. 70%, $p = 0,0005$ – Tabela S- 2 A). W przypadku MDMs izolowanych z krwi pacjentek po menopauzie zaobserwowano wpływ kalcytriolu w stężeniu 10 nM oraz 100 nM na podwyższenie odpowiednio o 26% i 34% poziomu CD14 w komórkach stymulowanych do klasy makrofagów M1 ($p < 0,05$) w porównaniu do komórek nietraktowanych kalcytriolem. Ponadto, wykazano iż wzrost poziomu CD14 w komórkach M1 różnicowanych w obecności kalcytriolu w stężeniu 100 nM występował tylko u pacjentek z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu (wzrost o ok. 77%, $p < 0,01$). Tę samą zależność zaobserwowano w przypadku pacjentek z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ i komórek stymulowanych w obecności 100 nM kalcytriolu do klasy makrofagów M2c (50% wzrost względem komórek nietraktowanych, $p < 0,05$) (Ryc.25 B).

Marker makrofagów klasy M1- MHCII ulegał podwyższeniu nie tylko w grupie komórek M1 (o około 120%, $p < 0,0001$ – Tabela S-2 A), ale także w grupie makrofagów klasy M2a (o ok.100 %, $p < 0,0001$ – Tabela S-2) względem grupy komórek wyjściowych M0. Po traktowaniu kalcytriolem, w przypadku komórek M1 oraz M2a, jego poziom obniżał się w sposób zależny od stosowanego stężenia (o ok. 30% w najwyższym stosowanym stężeniu). Dla wartości stężeń 10 nM oraz 100 nM obserwowano różnice istotne statystycznie ($p < 0,0001$). Efekt ten był niezależny od poziomu 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek (Ryc. 25 C).

Kolejnym badanym markerem makrofagów klasy M1 była cząsteczka CD80. Jej poziom wzrastał pod wpływem stymulacji w kierunku M1 o ok. 100% względem komórek wyjściowych M0 ($p < 0,0001$ – Tabela S-2 A). Poziom CD80 ulegał obniżeniu pod wpływem inkubacji z kalcytriolem w trakcie procesu różnicowania. Zmiany te były zależne od stosowanego stężenia kalcytriolu i dotyczyły MDMs różnicowanych do klas M0, M1 oraz M2c. Kalcytriol w stężeniu 100 nM w przypadku komórek M0 i M2 obniżał poziom CD80 o ok. 25-30%, podczas gdy w przypadku M1 obniżenie sięgało ok. 15%. W makrofagach klasy M1 wykazano także w grupie pacjentek ze stężeniem

prawidłowym 25(OH)D₃ w osoczu, zwiększenie wrażliwości komórek MDMs na stymulowane kalcytriolem obniżenie poziomu CD80 obserwowane w stosowanym stężeniu 10 nM ($p < 0,05$), podczas gdy w grupie z niskim 25(OH)D₃ tylko stężenie 100 nM tego związku powodowało istotne statystycznie zmniejszenie poziomu tej cząsteczki ($p < 0,05$) (Ryc. 25 D).

Poziom CD44 na powierzchni MDMs nie ulegał zmianom podczas stymulacji do różnych klas makrofagów, ponadto nie odnotowano wpływu kalcytriolu w stosowanych stężeniach na poziom tej cząsteczki w tych komórkach. Był to efekt niezależny także od poziomu 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek po menopauzie (Ryc.26 A).

Marker powierzchniowy CD200R charakterystyczny dla klasy makrofagów M2a, ulegał podwyższeniu pod wpływem różnicowania do tej grupy komórek o ok. 90% ($p = 0,0001$ – Tabela S-2 A). Obserwowano wpływ kalcytriolu w stężeniu 10 nM na obniżenie jego poziomu o ok. 21% ($p < 0,05$) na komórkach klasy M2a. Do obniżenia poziomu cząsteczki CD200R pod wpływem kalcytriolu w stężeniu 10 nM dochodziło także w przypadku grup makrofagów M1 oraz M2c ($p < 0,05$), chociaż stymulacja tego białka w tych komórkach była niewielka względem komórek wyjściowych (M0). Dodatkowo wykazano że w przypadku makrofagów M2a obniżenie poziomu CD200R było zależne od deficytu 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek i obserwowano je dla stężenia kalcytriolu 10 nM oraz 100 nM, podczas gdy w grupie z prawidłowym poziomem tego metabolitu nie obserwowano wpływu kalcytriolu na wartość MFI dla tego markera względem komórek nietraktowanych (Ryc.26 B).

Na poziom cząsteczki CD204 (charakterystycznej dla komórek klasy M2 – ogółem) nie wpływała żadna ze stymulacji. Natomiast w przypadku komórek MDMs izolowanych z krwi pacjentek po menopauzie z niskim poziomem 25(OH)D₃ w osoczu obserwowano istotny statystycznie wzrost jej poziomu (o ok. 17%) w grupie komórek M1 stymulowanych w obecności kalcytriolu w stężeniu 100 nM ($p < 0,05$) względem komórek nietraktowanych (Ryc. 26 C).

Stymulacja MDMs do klasy M2c powodowała wzrost poziomu CD163 (o ok. 160%) względem komórek wyjściowych M0 ($p < 0,0001$ – Tabela S-2 A). Ponadto w grupie pacjentek z niskim poziomem 25(OH)D₃ obserwowano wzrost CD163 o 185% ($p < 0,0001$ – Tabela S-2 B), podczas gdy w grupie z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃

o 117% ($p < 0,0001$ – Tabela S-2 C). Dodatkowa inkubacja z kalcytriolem obniżała poziom tej cząsteczki we wszystkich stosowanych stężeniach maksymalnie o 38% względem komórek nietraktowanych kalcytriolem. Dodatkowy podział ze względu na poziom metabolitu 25(OH)D₃ wykazał, iż w grupie o jego niskim stężeniu zmiany te utrzymywały się w sposób znamieny statystycznie. Natomiast w grupie z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu obserwowano w najwyższym stosowanym stężeniu kalcytriolu ponowne podwyższenie poziomu tej cząsteczki na powierzchni komórek MDMs, względem obserwowanego obniżenia w stężeniach 1 nM (zmiana nieistotna statystycznie) oraz 10 nM ($p < 0,05$) w porównaniu do komórek nietraktowanych. Zmiany pomiędzy poszczególnymi stężeniami kalcytriolu (10 nM względem 100 nM) nie były jednak istotne statystycznie (Ryc. 26 D).

MDMs izolowane z krwi pacjentek będących przed menopauzą (Ryc. 27, Ryc.28)

Poziom CD11b na powierzchni MDMs izolowanych z krwi pacjentek przed menopauzą wzrastał w komórkach M2a względem komórek wyjściowych M0 (ok. 26%, $p = 0,0012$ – Tabela S-3 A), podczas gdy w komórkach M1 poziom tego białka ulegał obniżeniu (ok. 40%, $p < 0,0001$ – Tabela S-3 A). Pod wpływem działania kalcytriolu, w zależności od stosowanego stężenia, podczas procesu różnicowania komórek do klas makrofagów M2a oraz M2c poziom tej cząsteczki wzrósł odpowiednio o ok. 21% i 36% ($p < 0,05$). Obserwowano, iż zależności te były uwarunkowane w przypadku klasy M2c od prawidłowego poziomu 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek i inkubacji komórek z kalcytriolem w stężeniu 10 nM ($p < 0,05$). Natomiast, w przypadku MDMs M2a w grupie pacjentek z niskim stężeniem 25(OH)D₃ obserwowano istotny statystycznie wzrost CD11b w wyniku działania kalcytriolu w stężeniu 100 nM ($p < 0,05$) (Ryc. 27 A).

Poziom CD14 wzrósł o ok. 45% ($p = 0,0005$ – Tabela S-3 A) na powierzchni komórek stymulowanych do klasy M2c makrofagów względem komórek wyjściowych M0. Natomiast, kalcytriol nie wpłynął na zmiany w poziomie CD14 na komórkach M2c. W przypadku komórek stymulowanych w obecności 10 nM kalcytriolu do klasy makrofagów M1 obserwowano wzrost poziomu CD14 o ok. 36% względem komórek nietraktowanych kalcytriolem ($p < 0,001$). Różnica ta była istotna statystycznie niezależnie od poziomu 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek ($p < 0,05$) (Ryc. 27 B).

Poziom markera makrofagów klasy M1 – MHCII uległ podwyższeniu na makrofagach M1 oraz M2a względem komórek wyjściowych M0 o około 100% ($p < 0,0001$ w przypadku obu grup – Tabela S-3 A). Dodatkowo obserwowano, iż w grupie pacjentek z niskim poziomem $25(\text{OH})\text{D}_3$ poziom MHCII wzrastał o 107% ($p < 0,0001$), podczas gdy w grupie z prawidłowym poziomem $25(\text{OH})\text{D}_3$ w osoczu wzrastał o 163% ($p < 0,0001$) względem komórek wyjściowych. Kalcytriol w stężeniach 10 nM oraz 100 nM powodował jego obniżenie (M1 $p < 0,0001$; M2a $p < 0,05$ odpowiednio o ok. 50%, 33% w najwyższym stosowanym stężeniu w porównaniu do komórek nietraktowanych kalcytriolem). Obserwowano także, iż dzieląc wyniki ze względu na poziom metabolitu $25(\text{OH})\text{D}_3$, kalcytriol w stężeniu 1 nM obniżał poziom cząsteczki MHCII względem komórek nietraktowanych kalcytriolem w grupie pacjentek z prawidłowym stężeniem $25(\text{OH})\text{D}_3$ na powierzchni MDMs różnicowanych do klasy M1. W przypadku MDMs M2a w grupie pacjentek z niskim poziomem $25(\text{OH})\text{D}_3$ obserwowano, że komórki te były wrażliwe na obniżenie MHCII pod wpływem działania kalcytriolu już w stężeniu 10 nM ($p < 0,05$), natomiast w grupie z prawidłowym poziomem $25(\text{OH})\text{D}_3$ dopiero stężenie kalcytriolu 100 nM powodowało jej istotne statystycznie obniżenie ($p < 0,01$) (Ryc. 27 C).

Poziom cząsteczki CD80 wzrósł na powierzchni komórek MDMs różnicowanych do klasy M1 o około 100% względem komórek wyjściowych M0 ($p < 0,0001$ – Tabela S-3 A). W grupie z niskim poziomem $25(\text{OH})\text{D}_3$ w osoczu obserwowano wzrost poziomu CD80 o 78% ($p = 0,0007$ – Tabela S-3 B), podczas gdy w grupie z prawidłowym poziomem $25(\text{OH})\text{D}_3$ o 103% ($p = 0,0006$ Tabela S-3 C) względem komórek wyjściowych. W MDMs M1 obserwowano istotny statystycznie spadek poziomu CD80 pomiędzy komórkami traktowanymi 100 nM a 10 nM kalcytriolu ($p < 0,05$). Zmiany te były zależne od prawidłowego poziomu $25(\text{OH})\text{D}_3$ w osoczu (Ryc 27 D).

Poziom białka CD44 podobnie jak w przypadku grupy pacjentek po menopauzie nie uległ zmianie pod wpływem stymulacji do różnych klas makrofagów. Nie odnotowano także wpływu kalcytriolu na poziom tej cząsteczki, ani zależności od poziomu $25(\text{OH})\text{D}_3$ w osoczu (Ryc 28 A).

Poziom cząsteczki CD200R uległ podwyższeniu na komórkach M2a o około 100% względem komórek wyjściowych M0 ($p = 0,0004$ – Tabela S-3 A). Nie

obserwowano jednak wpływu kalcytriolu na jego poziom w komórkach M2a. Natomiast w grupie pacjentek z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ obserwuje się obniżenie jego poziomu w komórkach MDMs M1 traktowanych kalcytriolem w stężeniu 100 nM ($p=0,0530$) względem komórek nietraktowanych. Ponadto na komórkach M2a zaobserwowano obniżenie poziomu CD200R niezależnie od stosowanego stężenia kalcytriolu (Ryc. 28 B).

Poziom markera makrofagów klasy M2 – CD204 nie ulegał zmianom pod wpływem stymulacji do klas makrofagów M1, M2a, M2c. Nie obserwowano także, zarówno wpływu kalcytriolu, jak i poziomu metabolitu 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek na zmiany w jego poziomie w tym układzie doświadczalnym (Ryc. 28 C).

Pod wpływem stymulacji komórek MDMs do klasy makrofagów M2c dochodziło do podwyższenia poziomu cząsteczki CD163 o około 70% ($p<0,0001$ – Tabela S-3 A) w porównaniu z komórkami wyjściowymi M0. Kalcytriol stosowany w stężeniu 10 nM podczas procesu różnicowania obniżył o 26% poziom CD163 ($p<0,001$) względem komórek nietraktowanych. Natomiast kalcytriol w stężeniu 100 nM spowodował ponowny wzrost poziomu CD163 – zmiany te nie były jednak istotne statystycznie pomiędzy komórkami traktowanymi kalcytriolem w stężeniu 10 nM w porównaniu do 100 nM kalcytriolu. Podział ze względu na poziom metabolitu 25(OH)D₃ wykazał, iż indukcja cząsteczki CD163 pod wpływem różnicowania do klasy makrofagów M2c była zależna od niskiego poziomu metabolitu witaminy D, a komórki te były wrażliwe na obniżenie jej poziomu o ok. 21% pod wpływem działania kalcytriolu w stężeniach 1 nM i 10 nM (odpowiednio $p<0,05$ oraz $p<0,001$). W grupie o prawidłowym stężeniu 25(OH)D₃ w osoczu nie obserwowano indukcji tej cząsteczki na powierzchni komórek MDMs pod wpływem stymulacji do klasy makrofagów M2c (Ryc. 28 D).

MDMs izolowane z krwi pacjentek z rozszianym typem nowotworu (Ryc. 29)

Poziom cząsteczki CD11b obniżył się pod wpływem różnicowania do MDMs klasy M1 (ok. 40%, $p<0,0001$ – Tabela S-4) względem komórek wyjściowych M0. Natomiast, stymulacja do klasy makrofagów M2a spowodowała podwyższenie poziomu tej cząsteczki o 26% względem komórek M0 ($p=0,0002$ – Tabela S-4). Kalcytriol, zarówno w przypadku komórek M2a (w stężeniu 1nM oraz 100 nM, odpowiednio $p<0,05$, $p<0,01$) jak i M2c (w stężeniu 10 nM oraz 100 nM odpowiednio $p<0,01$, $p<0,05$),

zwiększył poziom CD11b o maksymalnie ok. 27%-24% w porównaniu do grup nietraktowanych kalcytriolem (Ryc. 29 A).

Poziom CD14 wzrósł na powierzchni komórek MDMs stymulowanych do polaryzacji w kierunku M2c o ok. 97% względem komórek wyjściowych M0 ($p < 0,0001$ – Tabela S-4). Kalcytriol nie wpłynął na poziom tej cząsteczki w przypadku MDMs M2c. Natomiast obserwowano wzrost poziomu CD14 na komórkach M1 pod wpływem działania kalcytriolu, w sposób istotny statystycznie w stężeniu 100 nM poziom ten wzrósł o 24% względem komórek różnicowanych bez obecności kalcytriolu ($p < 0,05$) (Ryc. 29 B).

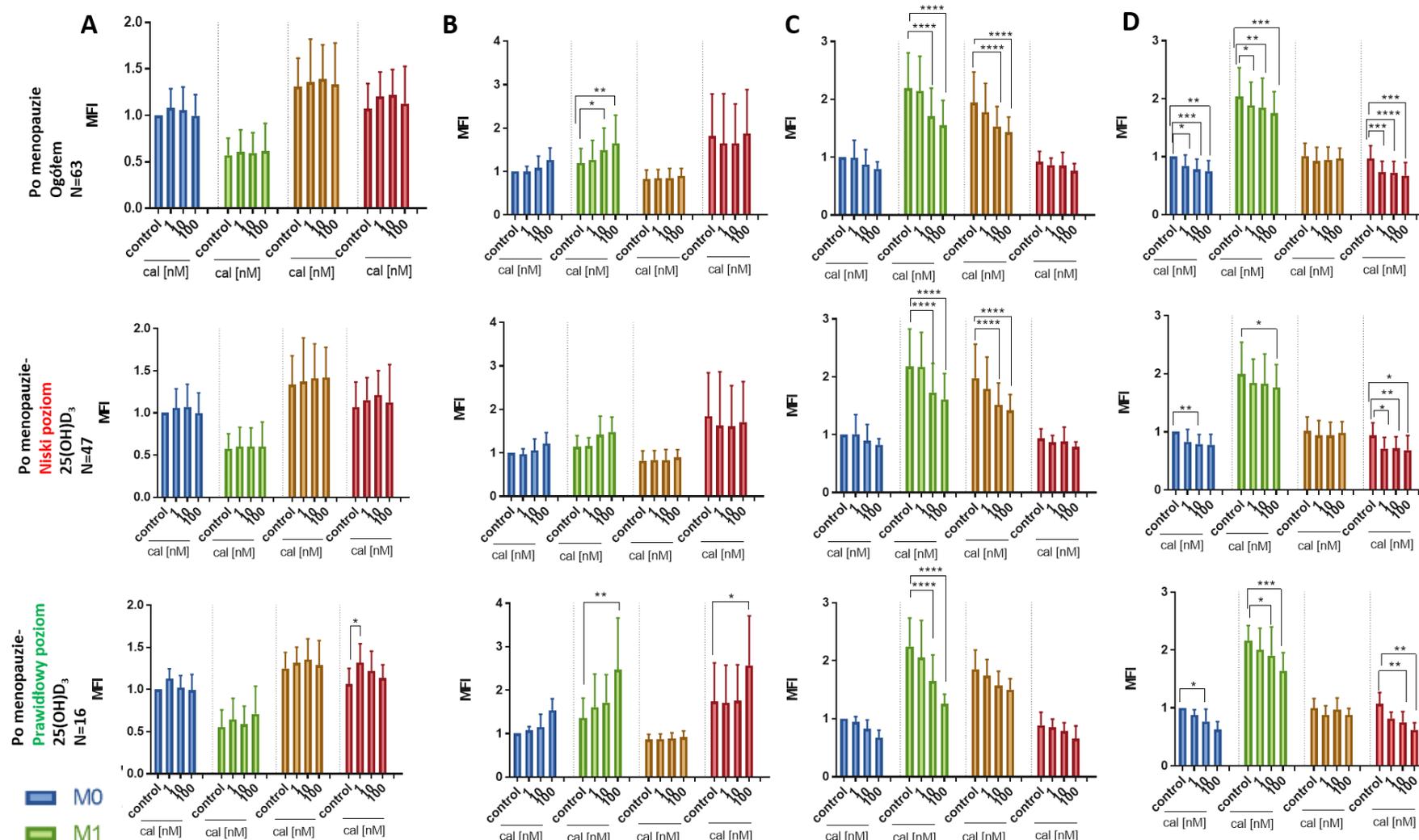
Stymulacja komórek MDMs do klasy makrofagów M1 oraz M2a spowodowała wzrost poziomu MHCII odpowiednio o 67% oraz 75% ($p = 0,0013$, $p = 0,0003$ – Tabela S-4) względem komórek wyjściowych M0. W przypadku klasy M1 nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu kalcytriolu na obniżenie poziomu tej cząsteczki, podczas gdy w przypadku komórek M2a zastosowanie 1 nM oraz 10 nM kalcytriolu prowadziło do 15% spadku poziomu MHCII względem komórek nietraktowanych kalcytriolem ($p < 0,05$) (Ryc. 29 C).

Poziom markera makrofagów M1 – CD80 wzrósł pod wpływem stymulacji do tej klasy MDMs o 91% względem grupy komórek wyjściowych M0 ($p < 0,0001$ – Tabela S-4). Nie obserwowano wpływu kalcytriolu na zmiany w jego poziomie na powierzchni komórek M1. Wykazano jednak obniżenie CD80 w komórkach M2c pod wpływem działania kalcytriolu w stężeniu 10 nM oraz 100 nM (odpowiednio 21% i 26%; $p < 0,05$) względem komórek nietraktowanych kalcytriolem (Ryc. 29 D).

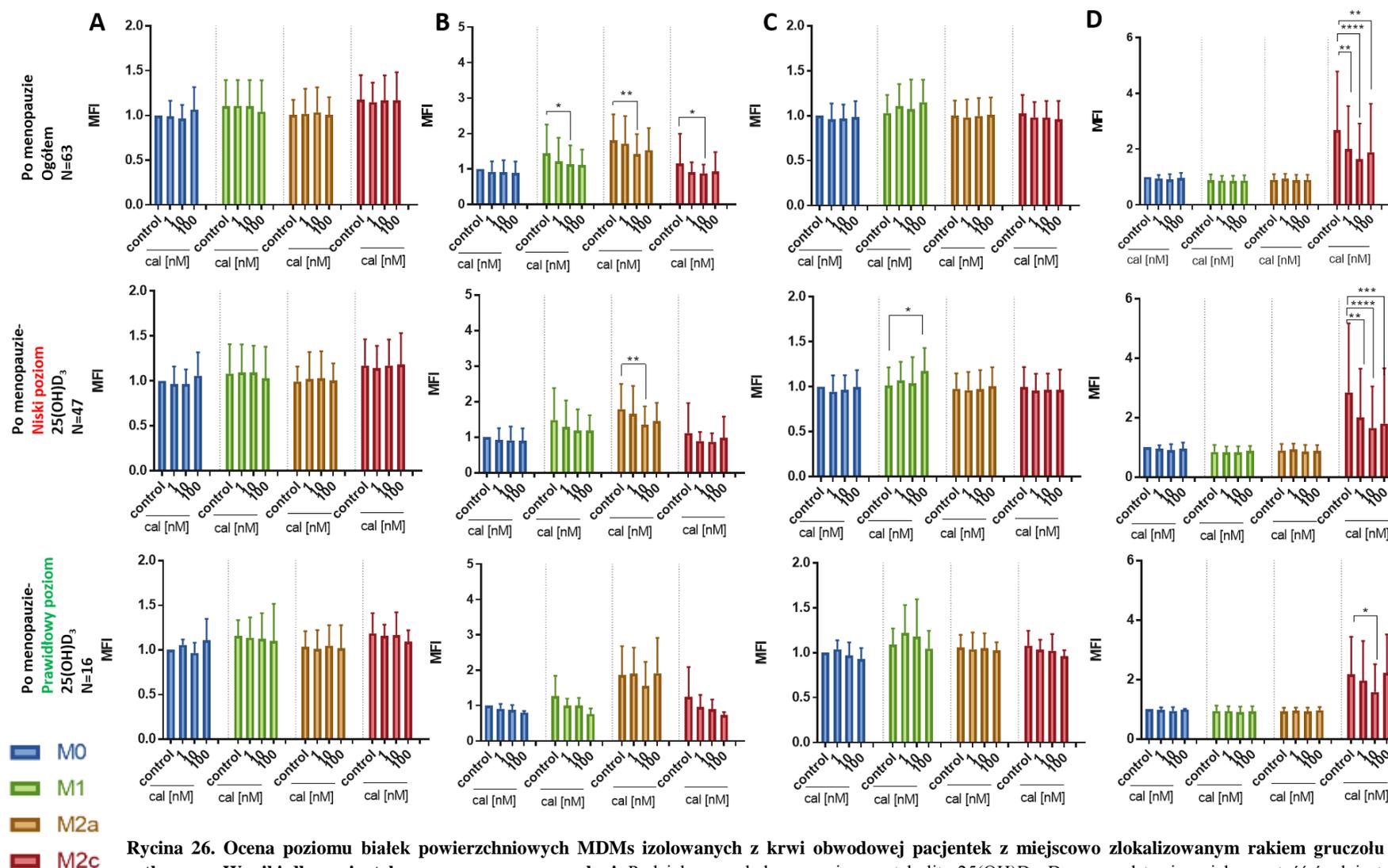
W przypadku CD44 oraz CD204 nie obserwowano wpływu stymulacji do klas makrofagów M1, M2a czy M2c na poziom tych cząsteczek. Traktowanie kalcytriolem w trakcie procesu różnicowania także nie wpłynęło na ich poziom. (Ryc. 29 E, F)

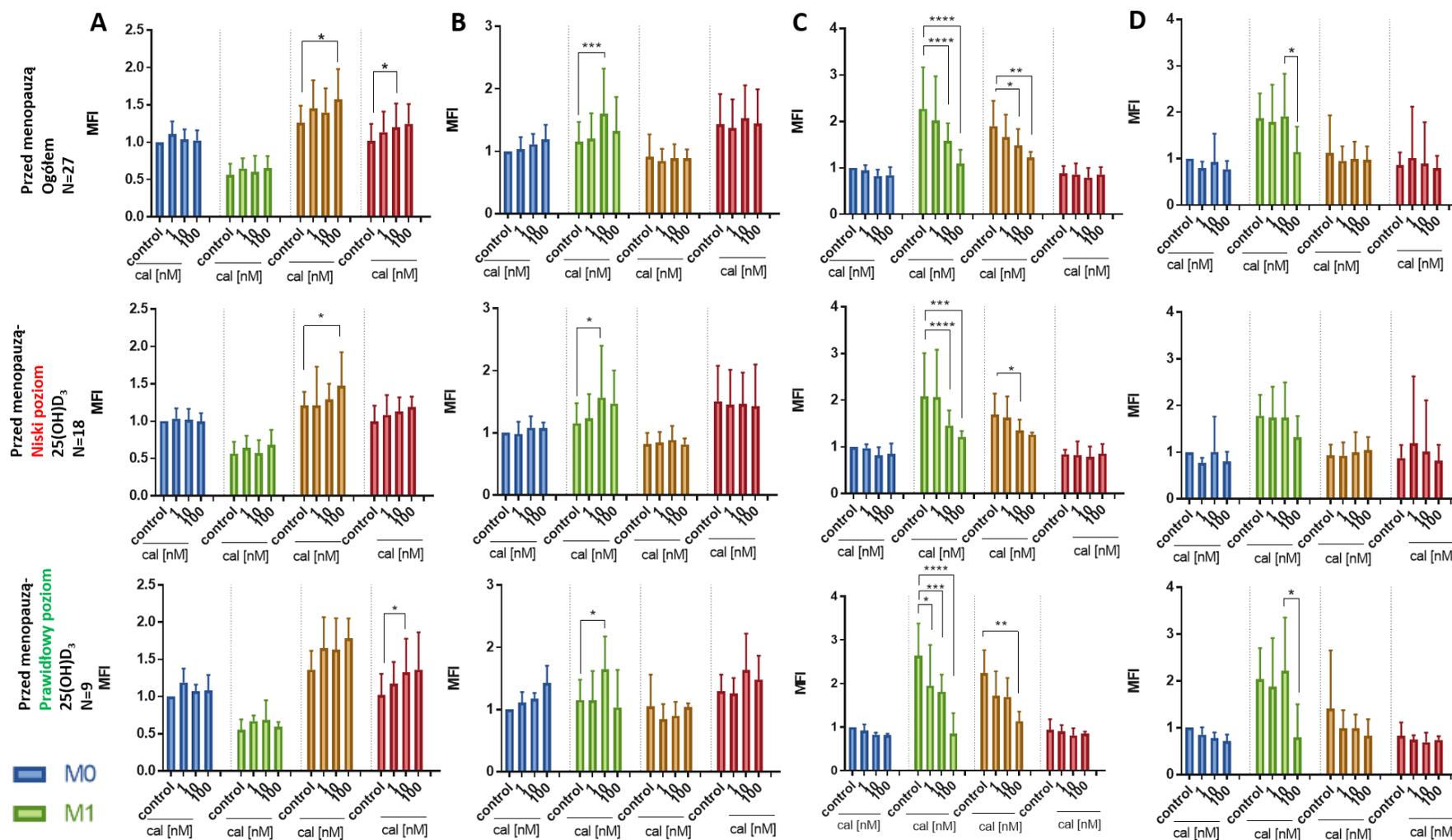
Stymulacja do klasy makrofagów M2c spowodowała podwyższenie poziomu cząsteczki CD163 na powierzchni MDMs izolowanych z krwi pacjentek z rozsiałym typem nowotworu względem komórek wyjściowych M0 o ok. 164% ($p < 0,0001$ – Tabela S-4). Inkubacja komórek M2c w trakcie procesu różnicowania w obecności kalcytriolu, w każdym stosowanym stężeniu, powodowała obniżenie poziomu CD163. Obniżenie

ok. 55% względem kontroli nietraktowanej kalcytriolem obserwowano w przypadku najwyższego stosowanego stężenia ($p < 0,0001$) (Ryc. 29 G).

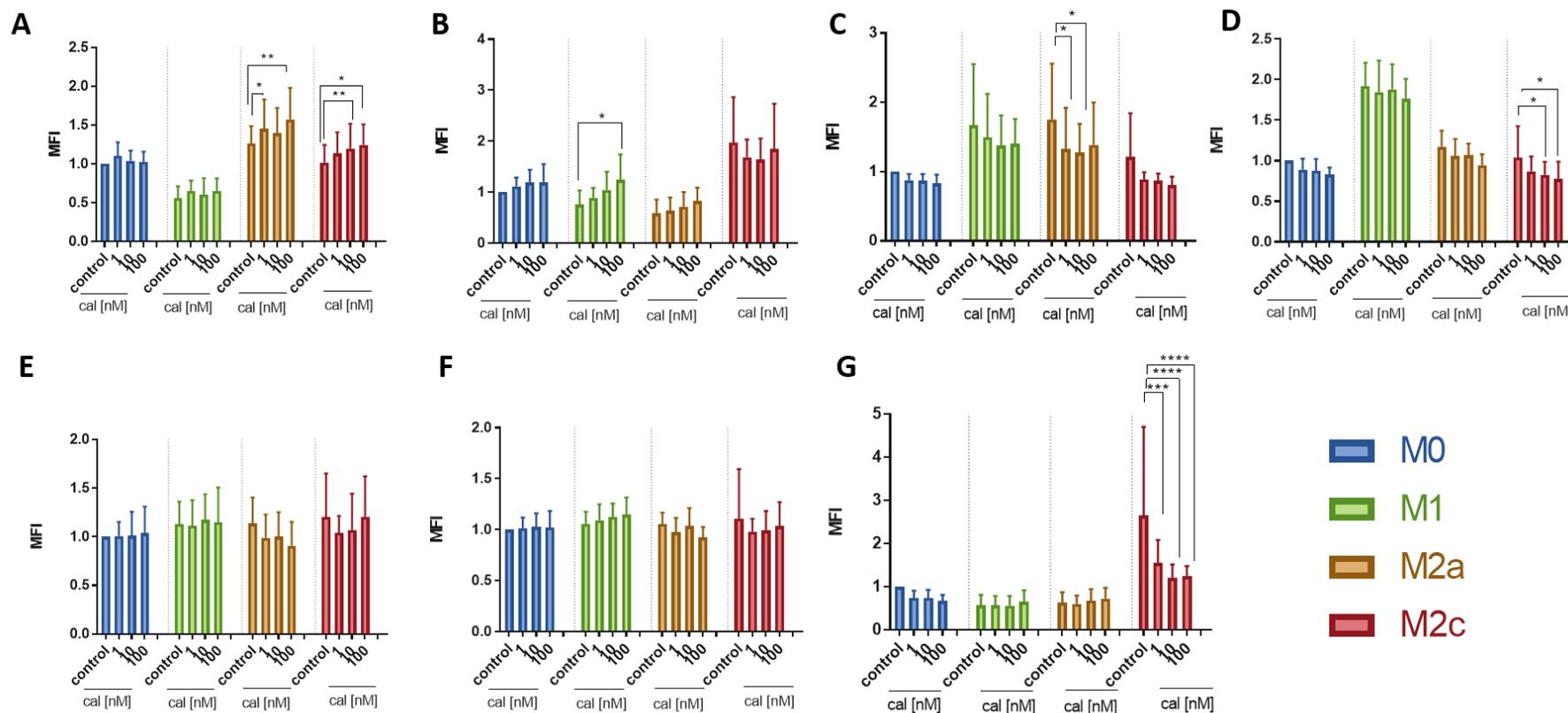


Rycina 25. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Wyniki dla pacjentek z grupy pomenopauzalnej. Podział ze względu na poziom metabolitu 25(OH)D₃. Dane przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe wartości MFI znormalizowanej względem komórek wyjściowych M0- nietraktowanych kalcytriolem. Wyniki dla poszczególnych markerów powierzchniowych: kolumna A. CD11b, B. CD14, C. MHCII, D. CD80. "control" - grupa komórek różnicowana bez obecności kalcytriolu. Analiza statystyczna: Test Tukey dla porównań wielokrotnych, *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ****p<0,0001.**





Rycina 27. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Wyniki dla pacjentek z grupy przedmenopauzalnej. Podział ze względu na poziom metabolitu 25(OH)D₃. Dane przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe wartości MFI znormalizowanej względem komórek wyjściowych M0 - nietraktowanych kalcytriolem. Wyniki dla poszczególnych markerów powierzchniowych: kolumna A. CD11b, B. CD14, C. MHCII, D. CD80. “control” - grupa komórek różnicowana bez obecności kalcytriolu. Analiza statystyczna: Test Tukey dla porównań wielokrotnych, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.



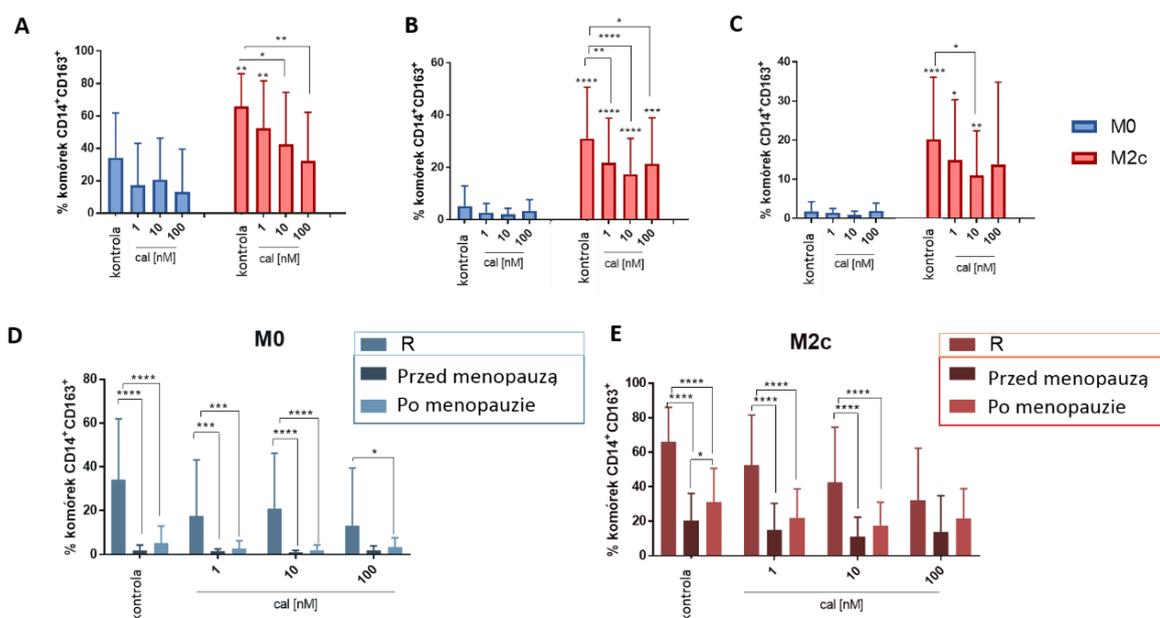
Rycina 29. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem w stadium rozsiażym (n=11). Dane przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe wartości MFI znormalizowanej względem komórek wyjściowych M0 - nietraktowanych kalcytriolem. Wyniki dla poszczególnych markerów powierzchniowych: kolumna A. CD11b, B. CD14, C. MHCII, D. CD80, E. CD44, F. CD204, G. CD163. "control" - grupa komórek różnicowana bez obecności kalcytriolu. Analiza statystyczna: Test Fishera (LSD), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

W związku z tym, że zaobserwowano obecność populacji komórek wykazujących jednocześnie obecność białek powierzchniowych CD163 oraz CD14, zarówno w przypadku makrofagów M0, jak i M2c, przedstawiono uzyskane wartości w formie odsetka komórek CD14⁺CD163⁺. Wyniki dotyczą analizy względem statusu menopauzalnego pacjentek (przed oraz po menopauzie) z miejscowo zlokalizowanym nowotworem oraz wśród pacjentek w rozsianym stadium nowotworu (R).

MDMs różnicowane do klasy makrofagów wyjściowych- M0, niezależnie od podziału względem parametrów klinicznych nie reagowały na zmiany w odsetku komórek CD14⁺CD163⁺ pod wpływem działania kalcytriolu (Ryc.30 A., B., C.). Jednakże traktowanie kalcytriolem komórek MDMs w trakcie różnicowania do klasy makrofagów M2c powodowało obniżenie populacji komórek CD14⁺CD163⁺ w każdej grupie klinicznej pacjentek. W przypadku grupy pacjentek z rozsianym typem raka obserwowano spadek odsetka tej populacji komórek dla kalcytriolu stosowanego w stężeniu 10 nM ($p < 0,05$) oraz 100 nM ($p < 0,001$) (Ryc. 28 A). W przypadku pacjentek z grupy pomenopauzalnej obniżenie odsetka komórek CD14⁺CD163⁺ było znamienne statystycznie dla wszystkich stosowanych stężeń kalcytriolu (1 nM $p < 0,001$; 10 nM $p < 0,0001$; 100 nM $p < 0,05$) (Ryc. 28 B). W grupie pacjentek przed menopauzą istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek CD14⁺CD163⁺ obserwowano tylko po zastosowaniu kalcytriolu w stężeniu 10 nM ($p < 0,05$) (Ryc. 30 C).

Porównanie grup klinicznych pacjentek bezpośrednio względem siebie wykazało, iż w populacji MDMs z grupy M0 nietraktowanych kalcytriolem, izolowanych z krwi pacjentek R obserwowano wyższy odsetek komórek CD14⁺CD163⁺ względem obu grup (po i przedmenopauzalnej) MDMs pochodzących z krwi pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego ($p < 0,0001$). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentek pozostawały istotne statystycznie w przypadku traktowania komórek w trakcie różnicowania kalcytriolem w stężeniach 1 nM ($p < 0,001$) oraz 10 nM ($p < 0,0001$). W przypadku kalcytriolu stosowanego w stężeniu 100 nM różnice istotne statystycznie zachowały się pomiędzy grupą MDMs pochodzących z krwi pacjentek grupy R a MDMs pochodzących z krwi pacjentek o statusie pomenopauzalnym z miejscowo zlokalizowanym nowotworem ($p < 0,05$). W przypadku porównania grupy R do grupy przedmenopauzalnej w stężeniu kalcytriolu 100 nM obserwuje się tylko tendencję w zmianie poziomu odsetka komórek CD14⁺CD163⁺ ($p = 0,0904$) (Ryc. 30 D).

Zróznicowane do klasy M2c komórki MDMs z grupy nietraktowanej kalcytriolem, pochodzące z krwi pacjentek R charakteryzowały się wyższym odsetkiem komórek CD14⁺CD163⁺ w porównaniu do MDMs z grupy przed- i pomenopauzalnej ($p < 0,0001$) pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem. Dodatkową obserwacją był podwyższony odsetek komórek CD14⁺CD163⁺ w grupie MDMs pochodzących z krwi pacjentek po menopauzie względem grupy przedmenopauzalnej ($p < 0,005$). W populacji komórek M2c traktowanych w trakcie różnicowania kalcytriolem w stężeniach 1 nM oraz 10 nM obniżył się odsetek komórek CD14⁺CD163⁺, jednak różnice pomiędzy poszczególnymi grupami klinicznymi pacjentek pozostawały istotne statystycznie ($p < 0,0001$). Kalcytriol w stężeniu 100 nM niwelował różnice pomiędzy porównywanymi grupami, obserwowane zmiany nie były znamienne statystycznie (Ryc. 30 E).



Rycina 30. Odsetek populacji komórek CD14⁺CD163⁺ w grupach M0 oraz M2c MDMs pochodzących z krwi pacjentek: A. w rozsianym stadium nowotworu – (R), B. ze zlokalizowanym miejscowo rakiem – pacjentki po menopauzie, C. ze zlokalizowanym miejscowo rakiem – pacjentki przed menopauzą. D. Odsetek populacji komórek CD14⁺CD163⁺ w MDMs przedstawiony jako porównanie ww. grup klinicznych względem siebie w klasach makrofagów – M0 (D) oraz M2c (E). Kontrola – komórki różnicowane bez obecności kalcytriolu. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna: test Fishera (LSD), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Istotności zaznaczone bezpośrednio nad słupkami dotyczą porównania poszczególnych traktowań MDMs pomiędzy grupami M2c a M0.**

Podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych z analiz przeprowadzonych z użyciem komórek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego

1. TAMs izolowane z guzów pacjentek przed menopauzą z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego charakteryzowały się podwyższonym poziomem CD200R na swojej powierzchni w porównaniu do TAMs z grupy pomenopauzalnej.
2. Poziom metabolitu witaminy D w osoczu pacjentek wpłynął na zmiany w poziomie CD44 na powierzchni TAMs. Komórki te, izolowane z guzów pacjentek o niskim poziomie 25(OH)D₃ wykazały tendencję do wyższej ekspresji tego białka w porównaniu do pacjentek z grupy o prawidłowym stężeniu 25(OH)D₃. Dodatkowo zmiany w poziomie CD44 związane były z obecnością przerzutów w dole pachowym. Obserwowano zwiększony poziom CD44 na powierzchni TAMs izolowanych z guzów pacjentek ze stwierdzoną obecnością przerzutów w dole pachowym.
3. TAMs izolowane z guzów pacjentek przed menopauzą wykazały tendencję do zwiększonego poziomu markera charakterystycznego dla klasy makrofagów przeciwnowotworowych M1 – MHCII w porównaniu do grupy pomenopauzalnej. Ponadto, obserwowano jego zwiększony poziom w komórkach izolowanych z guzów pacjentek z grupy ze stwierdzoną obecnością przerzutów w dole pachowym.
4. Wzrost poziomu CD11b pod wpływem działania kalcytriolu obserwowano na powierzchni komórek MDMs M2a oraz M2c izolowanych z krwi pacjentek przed menopauzą z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego oraz pacjentek z grupy ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego w stadium rozsiałym.
5. Wzrost poziomu CD14 pod wpływem działania kalcytriolu obserwowano na powierzchni komórek MDMs klasy M1 niezależnie od grupy klinicznej pacjentek. Jednakże w przypadku grupy pacjentek po menopauzie z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego zauważono, że indukowany kalcytriolem wzrost CD14 był charakterystyczny dla grupy pacjentek o prawidłowym stężeniu metabolitu 25(OH)D₃ w osoczu- klasy MDMs M1 oraz M2c.
6. Obniżenie poziomu MHCII pod wpływem działania kalcytriolu obserwowano na powierzchni komórek MDMs klas M1 oraz M2a pochodzących z krwi chorych na miejscowo zlokalizowanego raka gruczołu sutkowego. Dodatkowo w grupie

pacjentek przed menopauzą z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu, obserwowano wyższą zdolność MDMs do ekspresji MHCII w porównaniu do grupy komórek wyjściowych niż w grupie z niskim poziomem 25(OH)D₃.

7. Komórki MDMs, w zależności od poziomu metabolitu witaminy D₃ w osoczu pacjentek, różniły się między sobą wrażliwością na obniżenie poziomu MHCII pod wpływem działania kalcytriolu. W grupie z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu obserwowano uwrażliwienie komórek klasy M1 na spadek MHCII, podczas gdy w klasie komórek M2a, komórki te były mniej wrażliwe na wpływ kalcytriolu na zmiany poziomu tego białka. W grupie z niskim stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu obserwowano odwrotne tendencje w przypadku klasy makrofagów M2a.
8. Obniżenie poziomu markera CD80 (charakterystycznego dla klasy makrofagów M1) pod wpływem działania kalcytriolu obserwowano na powierzchni komórek MDMs M2c pochodzących z krwi pacjentek po menopauzie z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego oraz w stadium rozszanym, podczas gdy u chorych przed menopauzą nie obserwowano wpływu kalcytriolu na poziom tego markera. Dodatkowo, w grupie pacjentek przed menopauzą z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu, obserwowano wyższą zdolność MDMs do ekspresji CD80 w porównaniu do grupy komórek wyjściowych niż w grupie chorych z niskim poziomem 25(OH)D₃.
9. Poziom cząsteczek CD44 oraz CD204 na powierzchni komórek MDMs nie zależał od symulacji do poszczególnych klas makrofagów, ani od wpływu kalcytriolu na proces różnicowania – dotyczyło to każdej grupy klinicznej pacjentek.
10. Obniżenie poziomu markera CD200R (charakterystycznego dla klasy makrofagów M2a) pod wpływem działania kalcytriolu zaobserwowano tylko w przypadku MDMs izolowanych z krwi pacjentek po menopauzie z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego oraz wykazano zależność tych zmian od niskiego stężenia 25(OH)D₃ w osoczu.
11. Obniżenie poziomu markera CD163 (charakterystycznego dla klasy makrofagów M2c) pod wpływem działania kalcytriolu zaobserwowano w przypadku wszystkich rozpatrywanych grup klinicznych pacjentek. Ponadto, wykazano iż w grupie z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ u pacjentek przed menopauzą z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego nie obserwowano wzrostu poziomu markera CD163 pod wpływem stymulacji do klasy makrofagów M2c, natomiast wśród pacjentek po menopauzie obserwowano niższą zdolność MDMs do ekspresji tego białka. Dodatkowo wykazano, iż różnicowanie komórek

MDMs pochodzących z krwi pacjentek z rozsiałym typem nowotworu do klasy makrofagów M2c było efektywniejsze w porównaniu do pozostałych grup klinicznych pacjentek. Komórki MDMs izolowane z krwi pacjentek o rozsiałym typie nowotworu, wyjściowo w klasie M0, także charakteryzowały się najwyższym odsetkiem populacji komórek CD14⁺CD163⁺. Wśród pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego to w grupie pomenopauzalnej w porównaniu do przedmenopauzalnej wykazano w klasie M2c wyższy odsetek komórek CD14⁺CD163⁺.

To w jaki sposób kalcytriol wpłynął na proces polaryzacji komórek MDMs do klas makrofagów M1, M2a, M2c było zależne od stadium rozwoju nowotworu, statusu menopauzalnego pacjentek oraz poziomu metabolitu witaminy D₃ w osoczu. Rozpatrywane w kontekście MDMs parametry kliniczne wpłynęły na plastyczność monocytów.

5. DYSKUSJA

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono szereg badań *in vivo* oraz *ex vivo* mających na celu ocenę ukierunkowania (pro- lub przeciwnowotworowego) makrofagów towarzyszących mysim oraz ludzkim rakom gruczołu sutkowego, w kontekście wpływu witaminy D na mikrośrodowisko guza.

W badaniach z wykorzystaniem mysich modeli raka gruczołu sutkowego ocenie poddano TAMs izolowane z tkanek guzów pochodzących od myszy obciążonych komórkami linii przerzutujących 4T1 oraz E0771, a także nieprzerzutującymi spontanicznie komórkami 67NR. W związku z tym, że proprzerzutowe działanie kalcytriolu w modelu 4T1 miało odzwierciedlenie w pronowotworowym fenotypie TAMs, poszerzone badania przeprowadzono z użyciem komórek BMDMs pochodzących ze szpiku myszy obciążonych rakiem 4T1 oraz 67NR (jako linia izogeniczna stanowiąca punkt odniesienia). Dodatkowy model badawczy (przez wzgląd na obecność przerzutów w kościach myszy obciążonych guzami 4T1) stanowiły komórki BMDMs pochodzące ze szpiku myszy nieobciążonych nowotworem, a traktowane podczas procesu różnicowania medium kondycjonowanym znad hodowli komórek 4T1 (uprzednio stymulowanych, bądź nie, kalcytriolem). Materiał do badań pochodził od myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ (norma – 1000 IU; nadmiar – 5000 IU oraz niedobór – 100 IU), dodatkowo traktowanych kalcytriolem w grupach 1000 IU oraz 100 IU od 7 dnia po wszczepieniu komórek nowotworowych (tożsamy schemat zastosowano w przypadku myszy nieobciążonych nowotworem). W ramach niniejszej pracy przeprowadzono także szereg badań związanych z charakterystyką TAMs pochodzących z guzów pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego. Dodatkowo ocenie poddano komórki MDMs różnicowane z monocytów krwi obwodowej pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego oraz od pacjentek w uogólnionym stadium choroby. Zbadano zdolność MDMs do polaryzacji w kierunku makrofagów M0, M1, M2a oraz M2c pod wpływem działania kalcytriolu.

Liczne badania kliniczne oraz eksperymentalne dowodzą roli TAMs w procesie progresji raka gruczołu sutkowego, a ich obecność w tkance guza związana jest z gorszymi rokowaniami²¹⁵. W badaniach prowadzonych przez nasz zespół

obserwowano proprzerzutową aktywność kalcytriolu u myszy młodych (6- 8 tygodniowych) obarczonych komórkami 4T1 (model odzwierciedlający IV stopień zaawansowania oraz typ TNBC raka gruczołu sutkowego u ludzi^{216,217}). Wiązało się to z podwyższonym poziomem chemokiny CCL2 (o właściwościach rekrutujących makrofagi), a także Arg- 1 (będącej markerem makrofagów klasy M2) w tkance guza. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy obserwowano także wzrost liczby przerzutów do płuc u myszy obarczonych komórkami 4T1 z grup traktowanych kalcytriolem oraz grupy suplementowanej witaminą D₃. Ponadto wiązało się to ze wzrostem poziomu CD44 oraz obniżeniem poziomu MHCII na powierzchni TAMs pochodzących z guzów myszy z wyżej wymienionych grup. Według licznych danych z piśmiennictwa obniżona ekspresja MHCII związana jest z polaryzacją makrofagów do klasy M2²¹⁸⁻²²⁰. Wiele prac dowodzi także wpływu aktywacji białka CD44 (głównie przez kwas hialuronowy) na polaryzację makrofagów w kierunku klasy M2 i na obniżenie sekrecji cytokin prozapalnych²²¹⁻²²³. CD44 jest receptorem, którego nadekspresję obserwuje się w wielu typach nowotworów²²⁴, a jego ekspresja w makrofagach związana jest głównie z procesem fagocytozy i adhezji²²⁵. Jak wspomniano wyżej, aktywacja CD44 w TAMs wiąże się z ich przeciwzapalnym ukierunkowaniem. Jednakże inne prace dowodzą, że aktywacja CD44 odgrywać może rolę w indukcji procesu zapalnego poprzez zwiększenie wydzielania reaktywnych form tlenu, a także cytokin oraz chemokin prozapalnych w tych komórkach (IL-12, IL-1, CCL2)²²⁶. Świadczy to o dwojakiej roli jaką może pełnić ten receptor. W ramach realizacji niniejszej pracy w analizie fenotypu TAMs w grupie pacjentek z zaawansowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego (obecne przerzuty w dole pachowym) obserwowano istotnie wyższy poziom CD44 oraz MHCII na powierzchni tych komórek w porównaniu do grupy pacjentek bez stwierdzonych przerzutów. Zatem zarówno w przypadku materiału mysiego, jak i ludzkiego wyższy poziom CD44 na powierzchni TAMs skorelowany był z procesem przerzutowania, czy to na późnym czy wczesnym etapie (odpowiednio w uogólnionym czy zaawansowanym miejscowo stadium raka). McFarlane i wsp. wykazali, że ekspresja CD44 korelowała z wyższym stopniem zaawansowania choroby, ponadto u pacjentek z przerzutami do lokalnych węzłów chłonnych i większymi wymiarami guza obserwowano obniżenie czasu przeżycia wolnego od choroby²²⁷. Xiao i wsp. dowiedli, że makrofagi CD44⁺ wykazują fenotyp M2, co wyrażało się w podwyższonej ekspresji *IL10* oraz *TGFBI*, *VEGFA*, *HAVCR2* w glejaku²²². Dodatkowo wyższy poziom CD44 oraz MHCII na powierzchni

TAMs izolowanych z guzów pacjentek z zaawansowanym miejscowo rakiem, może świadczyć o ich odpowiedzi na lokalny stan zapalny. Ekspresja MHCII jest stymulowana głównie przez cytokiny zapalne, jak np. $\text{INF-}\gamma^{228}$ i jest cząsteczką charakterystyczną dla makrofagów klasy M1²²⁰. Z drugiej strony w badaniach Strack i wsp. zaobserwowano, że w tkankach gruczołu sutkowego niezmiennych nowotworowo obserwowano głównie populację makrofagów CD206⁺ (marker makrofagów klasy M2²²⁹), natomiast CD206⁻ w tkankach guza. Ponadto obecność makrofagów MHCII^{high}CD206⁻ korelowała z gorszymi rokowaniami pacjentek²³⁰. Może to świadczyć o tym, że wysoki poziom MHCII w przypadku makrofagów znajdujących się w TME może być także związany z ich funkcją pronowotworową, a ocena markerów powierzchniowych M1/M2 w ocenie ich polaryzacji nie może być jedynym z kryteriów. Aby móc w pełni ocenić ukierunkowanie TAMs pro- lub przeciwnowotworowe w przypadku materiału pochodzącego od chorych na raka gruczołu sutkowego, oprócz obserwacji fenotypu, należałoby wykonać poszerzone badania związane np. z analizą sekrecji cytokin przez te komórki czy analizę ekspresji genów charakterystycznych dla poszczególnych klas makrofagów i odnieść te dane do czynników rokowniczych pacjentek. Niestety ilość materiału izolowana z tkanek pooperacyjnych nie była wystarczająca do wykonania tego typu analiz w ramach niniejszej rozprawy.

Istnieje niewielka liczba doniesień na temat wpływu witaminy D₃ na poziom CD44 w makrofagach, badania związane z rolą CD44 w kontekście choroby nowotworowej odnoszą się głównie do jego funkcji w samych komórkach nowotworowych. W badaniach z użyciem analogu witaminy D (Gemini BXL0124) wykazano, że w komórkach o podtypie bazalnym MCF10DICS jego użycie prowadziło do obniżenia poziomu CD44 na powierzchni tych komórek, co w badaniach *in vivo* przełożyło się na zahamowanie wzrostu guzów. Ponadto wykazano, że jest to efekt związany z zahamowaniem ścieżki sygnałowej STAT3²³¹. W przypadku pacjentek ze zdiagnozowaną endometriozą obserwowano obniżenie poziomu rozpuszczalnej formy białka sCD44 w osoczu pod wpływem suplementacji witaminą D (przez okres 12 miesięcy w dawce 50000 IU tygodniowo)²³². W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy obserwowano tendencję do niższego poziomu CD44 na powierzchni TAMs izolowanych z guzów pacjentek z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu w porównaniu do grupy z poziomem niskim, co może świadczyć o pozytywnej roli jaką pełni witamina D w tej grupie pacjentek. Natomiast wyniki analizy materiału

pochodzącego od myszy wskazują, że suplementacja witaminy D₃ w diecie oraz traktowanie myszy kalcytriolem wpłynęły na wzrost poziomu CD44 na powierzchni TAMs 4T1, podczas gdy w przypadku TAMs 67NR oraz E0771 nie obserwowano różnic w jego poziomie. Wydaje się zatem, że zmiany poziomu tego białka pod wpływem działania witaminy D₃/kalcytriolu zależą głównie od podtypu nowotworu. Dodatkowo w ramach niniejszej pracy oceniono poziom CD44 na powierzchni MDMs izolowanych z krwi pacjentek. Wykazano, że zarówno pod wpływem stymulacji do różnych klas makrofagów, jak i traktowania kalcytriolem nie obserwuje się zmian w poziomie tej cząsteczki w MDMs z żadnej z grup klinicznych pacjentek. Podobnie w ocenie fenotypu BMDMs pochodzących zarówno od myszy obciążonych komórkami 4T1 jak i od myszy zdrowych nie wykazano zmian w poziomie tego białka. Wydaje się zatem, na podstawie wyników otrzymanych z analizy materiału pochodzącego od myszy oraz ludzi, że indukcja CD44 na powierzchni TAMs pod wpływem działania kalcytriolu jest głównie zależna od ich obecności w środowisku bogatym w składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (tj. fibronektyna²³³, kwas hialuronowy²³⁴, osteopontyna²³⁵) i szeregu czynników wydzielanych w miejscu objętym nowotworem, natomiast w eksperymentach *ex vivo* nie obserwuje się zmian w jej poziomie. Podobne wyniki otrzymali także inni naukowcy w badaniach *ex vivo* z użyciem makrofagów, zarówno ludzkich jak i mysich, nie wykazano aby kalcytriol wpływał na poziom tego białka^{200,236}. Z drugiej strony, w mysich komórkach szpikowych różnicowanych w obecności kalcytriolu wykazano wzrost poziomu CD44 oraz ich aktywację w kierunku osteoklastów, natomiast blokada receptora CD44 przeciwciałami hamowała ich powstawanie²³⁷. Jednakże kalcytriol stosowany był bezpośrednio w procesie różnicowania tych komórek, nie zaś jak w przypadku badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy stosowany po procesie różnicowania, czy wobec komórek wywodzących się z organizmu o różnym statusie witaminy D₃.

Jednym z białek będących ligandem CD44 jest osteopontyna (OPN). Jej rolę w procesie promowania procesu przerzutowania wykazano w nowotworach m.in. wątroby, płuc a także w raku gruczołu sutkowego²³⁸. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy obserwowano wyższy poziom OPN w tkance guza 4T1 w grupach myszy o podwyższonej liczbie przerzutów do płuc. W piśmiennictwie opisywany jest także związek pomiędzy wysokim poziomem OPN w tkankach objętych stanem zapalnym^{239,240} oraz zwiększoną rekrutacją makrofagów do mikrośrodowiska

guza^{241,242}. W badaniach własnych wykazano zbieżność wzrostu poziomu OPN w tkance guza z obserwowanym wzrostem poziomu CD44 na powierzchni TAMs, co może sugerować, że były one komórkami efektorowymi w TME o podwyższonym poziomie tej cytokiny. Czynnikiem, które wpływają na indukcję ekspresji OPN są m.in. cytokiny prozapalne IL-1 β , TNF α czy INF- γ ²³⁸. Ponadto osteopontyna wydzielana jest przez komórki nabłonkowe, fibroblasty, a także szereg komórek układu odpornościowego takich jak komórki NK, makrofagi czy monocyty²⁴³. Wykazano, że OPN prowadzi do wzrostu wydzielania przez monocyty IL-12 oraz IL-6, a obniża poziom sekrecji IL-10²⁴⁴, co jest zbieżne z obserwowanym w ramach niniejszej pracy profilem ekspresji genów na poziomie mRNA w TAMs 4T1 z grupy suplementowanej witaminą D₃ i grup traktowanych kalcytriolem, gdzie (choć nie obserwowano zmian w ekspresji *Il12a*) wykazano wzrost ekspresji genu *Il23a*, kodującego prozapalną cytokinę IL-23 oraz obniżenie ekspresji *Il10*, kodującego przeciwzapalną IL-10, co skłania do oceny TAMs 4T1 jako spolaryzowanych w kierunku M2 wykazujących funkcje pronowotworowe i prozapalne.

W promotorze genu *SPP1* (kodującego osteopontynę), znajdują się miejsca VDRE, a kalcytriol jest jednym z czynników indukujących ekspresję OPN^{245,246}. W komórkach THP-1 oraz mysich makrofagach P388D1 wykazano bezpośredni wpływ kalcytriolu na indukcję ekspresji mRNA osteopontyny poprzez aktywację VDR²⁴⁷. Ponadto, Baoqian i wsp. wykazali, że wzrost poziomu CD44 na powierzchni makrofagów zależny jest od poziomu wewnątrzkomórkowej formy OPN w tych komórkach²⁴⁸. W badaniach własnych obserwowano, zarówno w przypadku TAMs 4T1, jak i BMDMs 4T1 niewielki (RQ 1,2-1,8) wzrost ekspresji *Spp1* w grupie myszy suplementowanych witaminą D₃ oraz w grupach traktowanych kalcytriolem w porównaniu do grupy 1000 IU. Natomiast w przypadku BMDMs 4T1 z grupy myszy 100 IU nie zaobserwowano zmian w jej poziomie względem kontroli, co może sugerować udział kalcytriolu oraz suplementacji witaminy D₃ we wzmacnianiu ekspresji OPN w makrofagach obecnych w TME. Ponadto w badaniach własnych z użyciem BMDMs pochodzących od myszy zdrowych z grupy z deficytem witaminy D₃ w diecie i dodatkowo traktowanej kalcytriolem wykazano wyższy poziom białka OPN pod wpływem różnicowania w obecności CM 4T1 cał w porównaniu do BMDMs z grupy myszy traktowanych kalcytriolem o normalnym poziomie witaminy D₃ w diecie. Może to wskazywać na udział kalcytriolu w promowaniu oddziaływań między komórkami nowotworowymi a makrofagami prowadzących do

zwiększania poziomu OPN w TME w tej grupie. Podobne wyniki otrzymał Anisiewicz i wsp. w badaniach z użyciem komórek BMDMs pochodzących od zdrowych myszy BALB/c różnicowanych do klasy makrofagów M2. W grupie BMDMs polaryzowanych w kierunku M2 w obecności kalcytriolu oraz medium kondycjonowanego znad komórek 4T1 obserwowano wzrost OPN zarówno na poziomie mRNA, jak i sekrecji do medium przez makrofagi w porównaniu do BMDMs M2 różnicowanych w medium kondycjonowanym bez dodatku kalcytriolu. Efekt ten na poziomie białka był specyficzny dla CM 4T1, ponieważ kalcytriol stosowany jednocześnie z medium CM 67NR lub CM Eph4-Ev nie wpływał na wzrost sekrecji OPN przez BMDMs klasy M2²⁰⁰. Powyższe badania wskazują na bezpośredni wpływ kalcytriolu na stymulację OPN w komórkach BMDMs oraz na CM 4T1 jako czynnik dodatkowo wzmagający ten efekt. Natomiast w badaniach własnych wykazano, że także czynniki wydzielane przez stymulowane kalcytriolem komórki 4T1 mogą powodować wzrost poziomu OPN zależny od deficytu witaminy D₃ w diecie myszy oraz ich dodatkowego traktowania kalcytriolem. Rao i wsp. dowiedli, że medium kondycjonowane znad komórek ludzkiego raka jelita grubego (CD44⁺) stymuluje wydzielanie OPN przez makrofagi. Ponadto wykazali, że jest to efekt obserwowany zarówno w bezpośredniej kokulturze tych komórek, jak i poprzez wydzielane przez komórki nowotworowe czynniki do medium²⁴⁹. W ramach realizacji niniejszej pracy obserwowano także zależność pomiędzy pronowotworowym fenotypem TAMs, wzrostem poziomu OPN a zwiększoną liczbą przerzutów do kości. Nasilone przerzutowanie do kości może tłumaczyć fakt, że osteopontyna jest czynnikiem, który ukierunkowuje tropizm komórek nowotworowych do kości a także indukuje ich resorpcję ułatwiającą powstawanie przerzutów w tej tkance^{250,251}. Zhiyong i wsp. wykazali, że OPN jest kluczowym białkiem promującym właściwości przerzutujące komórek linii 4T1 w porównaniu do jej linii izogenicznej 4T07 - nieprzerzutującej²⁵². Wyniki te znajdują potwierdzenie w pracy naszego zespołu (Łabędź i wsp.²⁰⁶), gdzie najwyższy poziom OPN obserwowano w osoczu oraz tkankach guzów pochodzących od myszy obciążonych komórkami 4T1 w porównaniu do myszy obciążonych guzami 67NR oraz E0771. Ponadto w analizie fenotypu TAMs 67NR oraz E0771 nie wykazano zmian w poziomie CD44, obserwowano natomiast wyższy poziom białka CD163 (marker makrofagów klasy M2) w grupie myszy 100 IU + cal względem grupy 100 IU. Dodatkowo TAMs E0771 w grupie 1000 IU + cal względem grupy 1000 IU charakteryzowały się obniżeniem poziomu cząsteczki MHCII na swojej powierzchni, co również jest związane z pogłębionym fenotypem M2. Obserwowane zmiany w fenotypie

mogące świadczyć o pronowotworowym ukierunkowaniu TAMs 67NR oraz E0771, nie były jednak zbieżne ze zmianami w liczbie przerzutów czy kinetyką wzrostu guzów. Sugeruje to, że efekt wzmaganie właściwości przerzutowych komórek 4T1 *in vivo* w grupach 1000 IU + cal, 100 IU + cal oraz 5000 IU, który korelował z pronowotworową polaryzacją makrofagów w tych grupach był zależny od swoistej reakcji komórek linii 4T1 na stymulację kalcytriolem oraz witaminą D₃. Ponadto, w badaniach własnych nie potwierdzono obecności przerzutów do kości w grupie myszy karmionych karmą z deficytem witaminy D₃, natomiast w grupach traktowanych kalcytriolem i grupie suplementowanej witaminą D₃ występowały w przypadku $\frac{3}{4}$ badanych próbek, co dodatkowo sugeruje jej znaczący wpływ na wzmaganie właściwości przerzutujących komórek 4T1 *in vivo*.

CCR2 jest receptorem dla chemokiny CCL2, która wydzielana jest przez komórki nowotworowe i odpowiada za rekrutację monocytów zapalnych w miejsce guza, co potwierdzono *in vivo* w modelu raka gruczołu sutkowego (z użyciem myszy transgenicznym PyMT) oraz związana jest ze zwiększeniem w guzie populacji makrofagów związanych z przerzutami (MAMs, ang. *metastasis associated macrophages*), które wywodzą się z prozapalnych monocytów^{113,253}. Wykazano także, że CCL2 jest chemokiną zapalną, która zwiększa liczbę krążących we krwi monocytów w cukrzycy typu 1, która jest chorobą o podłożu przewlekłego stanu zapalnego²⁵⁴. CCL2 jest jednym z głównych czynników indukujących mielopoezę poprzez zwiększoną mobilizację komórek progenitorowych ze szpiku²⁵⁵. W badaniach prowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy obserwowano podwyższoną liczbę monocytów we krwi myszy obciążonych komórkami 4T1 w porównaniu do E0771, 67NR oraz myszy nieobciążonych komórkami nowotworowymi (z najwyższym poziomem w grupie 100 IU + cal). Jednocześnie, obserwowano wzrost ekspresji genu *Ccr2* w TAMs pochodzących z grup 1000 IU + cal oraz 5000 IU. Jednakże w analizie stężenia CCL2 w guzie oraz osoczu myszy obciążonych komórkami 4T1 nie wykazano istotnego statystycznie wpływu diety o zróżnicowanej zawartości witaminy D₃ oraz traktowania kalcytriolem na zmiany w jej poziomie. Ponadto w porównaniu do myszy obciążonych komórkami 67NR i zdrowych myszy BALB/c, a także myszy C57BL/6 zdrowych i obciążonych komórkami E0771 jej poziom w osoczu był niższy i to w grupie 100 IU + cal, w której zaobserwowano największą liczbę krążących monocytów u myszy obciążonych komórkami 4T1²⁰⁶. Obserwacje te są zbieżne z niższą ekspresją *Ccr2*

w TAMs 4T1 z grupy 100 IU + cal w porównaniu do TAMs 4T1 z grup myszy 1000 IU + cal oraz 5000 IU. Może to sugerować, że czynnikiem stymulującym nadmierną mobilizację komórek progenitorowych ze szpiku u myszy obarczonych guzami 4T1 mogą być inne czynniki w tym interleukiny prozapalne²⁵⁶. Co więcej, jak już wspomniano, w TAMs z grupy myszy suplementowanych witaminą D₃ i traktowanych kalcytriolem obserwowano wzrost ekspresji genu *Il23a* oraz obniżenie ekspresji *Il10*. Dodatkowo komórki w grupie 100 IU + cal charakteryzowały się wyższą ekspresją *Cd163* oraz *Arg1*, markerami charakterystycznymi dla klasy makrofagów M2²⁴. W przesiewowej analizie qPCR wykazano także, że ekspresja *Il23a* była obserwowana tylko w BMDMs 4T1 w porównaniu do BMDMs 67NR, gdzie nie obserwowano ekspresji na poziomie mRNA *Il23a* w żadnej z grup badanych. W BMDMs 4T1 obserwowano w grupach 5000 IU oraz 100 IU + cal obniżenie ekspresji *Il10*, podczas gdy w BMDMs 67NR obserwowano ich wyższy poziom względem komórek z grupy 1000 IU. Powyższe wyniki wskazują na zbieżność w profilu TAMs 4T1 oraz BMDMs 4T1 w wyżej wymienionych grupach pod kątem niższej ekspresji *Il10* względem kontroli 1000 IU w porównaniu do makrofagów pochodzących od myszy obarczonych komórkami 67NR. Udział IL-10 w promowaniu odpowiedzi zapalnej jest złożony i istnieje szereg prac wykazujących jej przeciwstawne funkcje: przeciwzapalne oraz immunostymulujące, ale także pro- lub przeciwnowotworowe²⁵⁷. Natomiast w kontekście określenia polaryzacji makrofagów, wysoka ekspresja *Il10* wiąże się z ich immunosupresyjnym charakterem – M2, podczas gdy jej obniżenie charakteryzuje polaryzację tych komórek w kierunku immunostymulującym – M1²⁵⁸. Zatem obserwowane różnice w charakterze makrofagów 4T1 – immunostymulującym oraz 67NR – immunosupresyjnym sugerują, że mikrośrodowisko wytworzone pod wpływem różnego statusu witaminy D₃ w organizmie myszy oraz odpowiedź komórek układu odpornościowego modulowane są w sposób zależny od typu komórek nowotworowych, które się w nim rozwijają, a także od ich odpowiedzi na kalcytriol w momencie kiedy nowotwór zaczyna się już rozwijać. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy w analizie PCR pojedynczych próbek wykazano także, że BMDMs pochodzące ze szpiku myszy obarczonych komórkami 4T1 wykazują wyższą ekspresję *Il23a* oraz *Mrc1*, a także *Arg1* w grupie 100 IU + cal, podczas gdy w grupie 1000 + cal obserwuje się wyższą ekspresję *Il6* w porównaniu do kontroli 1000 IU. Dodatkowo obserwuje się wzrost ekspresji czynnika *Irf4* w grupach 5000 IU oraz tendencję do jego wzrostu w grupie 1000 IU + cal oraz 100 IU + cal. Związek pomiędzy polaryzacją makrofagów

do klasy M2, a ekspresją genów *Irf4* (IRF4), *Mrc1* (CD206) oraz *Arg1* (Arg1) jest szeroko opisywany w piśmiennictwie i korelowany z ich właściwościami pronowotworowymi – immunosupresyjnymi^{229,259}. Natomiast w badaniach własnych wykazano, że w BMDMs 4T1 w grupie 100 IU + cal ekspresja cząsteczek *Arg1* oraz *Mrc1* koreluje ze wzrostem ekspresji cytokiny prozapalnej *Il23a*. Należy jednak zauważyć, że polaryzacja M1/M2 nie odzwierciedla rzeczywistego skomplikowania heterogennej grupy komórek jaką są makrofagi, które w tym przypadku nie dają się jednoznacznie sklasyfikować. Natomiast istnieją próby bardziej szczegółowej charakterystyki makrofagów i podziału na podtypy M2a, M2b, M2c oraz M2d. Wykazano, że makrofagi o podtypie M2d mogą być indukowane przez IL-6²⁴. Dodatkowo Ferrante i Leibovich w swoim opracowaniu sugerują, że makrofagi M2d wywodzą się bezpośrednio z populacji makrofagów M1 (o wysokim poziomie IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, iNOS oraz niskim poziomie IL-10), które na zasadzie „przełączenia” na skutek działania adenozyiny oraz czynnika IRF4 przekształcają się w makrofagi o funkcji proangiogennej (o wysokim poziomie VEGF, IL-10 oraz niskim poziomie TNF α , IL-12, iNOS)²⁶⁰. Wang i wsp. wykazali w badaniach z użyciem komórek linii 4T1 oraz mysich makrofagów RAW264.7, że kokultura tych komórek wpłynęła na polaryzację makrofagów w kierunku M2d. Obserwowano wzrost populacji makrofagów CD206⁺ oraz wykazano obniżenie ekspresji MHCII oraz CD80/86. Dodatkowo wykazali w komórkach RAW264.7 wzrost ekspresji *Arg1*²⁶¹, co jest zbieżne z obserwowaną w ramach niniejszej pracy charakterystyką na poziomie mRNA komórek BMDMs 4T1 pochodzących z grupy 100 IU + cal o podwyższonej ekspresji *Arg1* oraz *Mrc1*. W przypadku makrofagów BMDMs 4T1 z grupy 100 IU + cal można przypuszczać, że wykazują one zbliżone cechy zarówno komórek klasy M1, jak i M2d. W badaniach Wang i wsp. dowiedziono także, że IL-6 wydzielana przez makrofagi M2d wpływa autokrynnie na ich polaryzację²⁶¹. W badaniach własnych, chociaż nie obserwowano zbieżności wyników otrzymanych z analizy qPCR z wynikami uzyskanymi z analizy sekrecji cytokin IL-23 oraz IL-6 do medium przez komórki BMDMs 4T1, można stwierdzić, że komórki BMDMs wydzielają bardzo niewiele IL-23 (co obserwowano także w przypadku TAMs) w porównaniu do wysokiej sekrecji IL-6 do medium. Dodatkowo obserwowano, że sekrecja IL-23 jest zależna od suplementacji witaminy D₃ i traktowania kalcytriolem, gdzie jej najwyższy poziom obserwowano w przypadku TAMs 4T1 pochodzących z grup myszy karmionych karmą z deficytem witaminy D₃, podczas gdy w BMDMs 4T1 w grupie myszy z normą witaminy D₃ w diecie i traktowanych

kalcytriolem. Natomiast wysoka sekrecja IL-6 była niezależna od diety i traktowania myszy. IL-6 jest cytokiną o działaniu plejotropowym²⁶², której wysoka ekspresja związana jest z progresją nowotworów poprzez wzmaganie proliferacji komórek nowotworowych²⁶³, czy poprzez zwiększanie oporności na chemioterapeutyki²⁶⁴. Ponadto, wysoki poziom IL-6 związany jest z gorszym rokowaniem w raku gruczołu sutkowego²⁶⁵. Może to świadczyć o jej dodatkowym wpływie na indukcję procesu przerzutowania w tym modelu eksperymentalnym.

W szpiku myszy obarczonych komórkami 4T1 wykazano obecność przerzutów, jednakże wysoka ekspresja *Epcam* w BMDMs z grup 1000 IU + cal, 5000 IU oraz 100 IU + cal nie została potwierdzona na poziomie białka. Może to świadczyć o niewielkiej liczbie komórek nowotworowych obecnych w hodowli po 7 dniach różnicowania, ponieważ wyrosłe z pojedynczych komórek kolonie tworzyły się dopiero w drugim tygodniu hodowli z 6-tioguaniną. Jednakże, postanowiono sprawdzić obserwowane zależności z użyciem komórek szpiku myszy zdrowych karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ w diecie oraz traktowanych kalcytriolem, różnicowanych w obecności medium kondycjonowanego z nad komórek 4T1 traktowanych, bądź nie, kalcytriolem. Obserwowano, że BMDMs pochodzące od myszy zdrowych z grupy 100 IU + cal stymulowane medium kondycjonowanym CM 4T1 cal wykazywały wzrost ekspresji mRNA *Il6* oraz *Il23a*, *Tnfa* przy jednoczesnym obniżeniu poziomu *Tgfb*, co potwierdzono na poziomie białka w przypadku IL-6 oraz TGFβ w tej grupie. IL-6 oraz IL-23 są jednymi z głównych czynników indukujących odpowiedź Th17 w TME i sprzyjają w ten sposób powstawaniu chronicznego stanu zapalnego w mikrośrodowisku nowotworu²⁶⁶. Obserwowany efekt *ex vivo* może zatem w pośredni sposób tłumaczyć wyniki otrzymane w ramach realizacji wcześniejszych badań naszego zespołu, które wykazały, że traktowanie kalcytriolem oraz jego analogami myszy młodych, obarczonych komórkami 4T1, promowało odpowiedź Th17, co korelowało ze wzrostem przerzutów w płucach u tych myszy¹¹. Ponadto, Hou i wsp. wykazali, że makrofagi stymulowane IL-23 wykazują odmienny profil ekspresji genów od makrofagów klas M1/M2. Wykazano, że charakteryzują się one wysoką sekrecją IL-17A, IL-22 oraz INF-γ i indukują stan zapalny skóry w mysim modelu łuszczycy poprzez aktywację ścieżki STAT3²⁶⁷. IL-23 w raku piersi związana jest także ze wzmaganiem procesu angiogenezy, a także infiltracji makrofagów klasy M2 do zrębu guza²⁶⁸. IL-6 natomiast promuje wzrost guza poprzez aktywację ścieżki JAK/STAT3 (ścieżki która

jest opisywana jako główny regulator polaryzacji makrofagów w kierunku M2²²), indukcję ekspresji białek antyapoptotycznych (Bcl-2, surwiwiny) czy związanych z angiogenezą (VEGF) oraz promowaniem przerzutowania (MMP-2, MMP-9)²⁶⁹. W badaniach własnych w grupie BMDMs pochodzących od myszy zdrowych z grupy 100 IU + cal i traktowanych CM 4T1 cal wykazano wzrost poziomu OPN, a także MMP-3, co może dodatkowo potwierdzać ich pronowotworowe ukierunkowanie oraz wskazuje, że komórki pochodzące od myszy z deficytem witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem były bardziej wrażliwe na czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe.

Ponieważ wyniki badań *ex vivo* oraz *in vivo* wskazują na aktywowaną kalcytriolem patologiczną (w kontekście promowania przerzutów i rozwoju choroby) aktywację komórek 4T1 i wpływ na stymulację ekspresji genów związanych z czynnikami prozapalnymi w TAMs oraz BMDMs postanowiono sprawdzić w badaniach *in vitro* wpływ kalcytriolu na komórki 4T1 pod kątem zmian w poziomie czynników, które wydzielane do medium mogłyby stymulować odpowiedź zapalną BMDMs, a w kontekście mikrośrodowiska guza mogłyby prowadzić do indukcji przerzutów. Wytypowano IL-6 a także COX-2/PGE2 jako znane induktory chronicznego stanu zapalnego w raku gruczołu sutkowego. Około 15-20% wszystkich przypadków nowotworów ma podłoże związane z infekcją, patologicznym stanem zapalnym czy chorobami autoimmunologicznymi²⁷⁰. Jednym z ważniejszych czynników indukujących chroniczny stan zapalny jest PGE2^{271,272}. Ponadto wykazano, że PGE2 oraz COX-2 mogą być potencjalnymi biomarkerami metabolicznymi wskazującymi na ryzyko wystąpienia raka gruczołu sutkowego oraz wskazującymi na złe rokowania pacjentów²⁷³⁻²⁷⁵. Ostatnie badania wykazały także, że nadekspresja COX-2 jest związana z cechami macierzystych komórek nowotworowych, zwiększonym poziomem proliferacji w raku gruczołu sutkowego^{276,277}, wpływa także na indukcję IL-6^{278,279}, która może dodatkowo wzmacniać powyższe procesy. Khuder i wsp. wykazali, że profilaktyczne przyjmowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (inhibitorów COX-2) zmniejsza ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego o 18%²⁸⁰, jednak to ochronne działanie wydaje się być ograniczone do guzów wykazujących ekspresję ER i PR²⁸¹. Dodatkowo witamina D₃ ma duży wpływ na metabolizm prostaglandyn w nowotworach związany z hamowaniem ich syntezy. Qinsong i wsp. wykazali, że kalcytriol obniża ekspresję COX-2 oraz poziom syntezowanych przez ten enzym prostaglandyn poprzez supresję

fosforylacji Akt, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania ścieżki NF- κ B, jednej z głównych odpowiadających za stymulowanie odpowiedzi zapalnej¹⁷¹. Thill i wsp. wykazali także, że stosowanie kalcytriolu w skojarzeniu z inhibitorem COX-2 (celekoksyb) wpływa na zwiększenie zahamowania proliferacji komórek w porównaniu do kalcytriolu stosowanego pojedynczo wobec komórek linii MDA-MB-231, która jest linią słabo wrażliwą na działanie aktywnej formy witaminy D₃²⁸². Podobne rezultaty otrzymała inna grupa badaczy stosując kombinację inhibitora COX-2 oraz kalcytriolu w raku prostaty. Wykazano, że kalcytriol zwiększa poziom 15-hydroksyprostaglandyny (15-PGDH) będącej antagonistą enzymu COX-2, ponadto obniża poziom receptorów dla prostaglandyn²⁸³. Jednakże w badaniach własnych obserwowano wzrost poziomu białka COX-2 pod wpływem traktowania komórek 4T1 kalcytriolem, co miało bezpośrednie przełożenie na podwyższoną sekrecję PGE2 do medium znad tych komórek. Wyniki te świadczą o odmiennej od najczęściej opisywanej reakcji komórek na działanie kalcytriolu związane z obniżaniem poziomu PGE2 oraz COX-2, może to jednak świadczyć o podwójnej roli jaką pełni kalcytriol w kontekście metabolizmu prostaglandyn. Mimo wielu doniesień na temat wpływu kalcytriolu na obniżenie poziomu PGE2, obserwowany w ramach niniejszej pracy efekt potwierdzają prace innych naukowców. Ravid i wsp. także obserwowali indukcję syntezy PGE2 zależną od aktywności COX-2 pod wpływem działania kalcytriolu w komórkach HaCaT (keratynocytach). Zaobserwowano, że jest to efekt zależny od aktywacji kinazy PKC oraz Src²⁸⁴. Fuxin i wsp. wykazali, że wzmaganie syntezy PGE2 zależnej od COX-2 przez witaminę D w komórkach ziarnistych jajnika zależne jest od jej synergistycznego z czynnikiem TGF β 1 (który promował ekspresję *VDR* w tych komórkach) wpływu na aktywację szlaku komórkowego SMAD3 oraz ERK1/2²⁸⁵.

Wiele komórek podczas transformacji nowotworowej posiada zmieniony metabolizm witaminy D₃ i zaburzenia szlaku sygnałowego VDR. W korelacji ze stopniem zaawansowania choroby dochodzi do obniżenia poziomu VDR i wzrostu CYP24A1, to zjawisko uznawane jest jako odpowiedzialne za obniżenie wrażliwości komórek nowotworowych na witaminę D₃¹⁴⁴. Badania własne potwierdzają te zależności. Wykazano, że linie komórkowe niewrażliwe na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu 4T1 oraz E0771 posiadają wyższy poziom mRNA *Cyp24a1* oraz niższy poziom *Vdr* w porównaniu do linii wrażliwej 67NR. Ponadto w przypadku linii komórkowej 4T1 potwierdzono stymulowany kalcytriolem wzrost poziomu tej

hydroksylazy na poziomie białka, podczas gdy obserwowano jej niewielki poziom i brak stymulacji pod wpływem kalcytriolu w przypadku komórek E0771 (w ekspresji na poziomie mRNA zarówno komórki linii 4T1, jak i E0771 wykazywały jej podwyższenie w stosunku do kontroli nietraktowanej). CYP24A1 jest enzymem odpowiedzialnym za katabolizm kalcytriolu²⁸⁶. W badaniach Townsend i wsp. wykazano, że produkcja nieaktywnego metabolitu kalcytriolu – 1,24,25-OH₃D₃ była wyższa w tkance guza w porównaniu do prawidłowej tkanki gruczołu sutkowego²⁸⁷. Dodatkowo obserwowano, że wyciszenie ekspresji CYP24A1 w komórkach MDA-MB-231 hamowało proliferację komórek nowotworowych. Podobne rezultaty otrzymali Osanai i wsp., którzy w warunkach *in vivo* wykazali, że zahamowanie ekspresji CYP24A1 wpływa na zahamowanie wzrostu guza w modelu raka gruczołu sutkowego²⁸⁸. Wyniki te wskazują na onkogenną rolę CYP24A1 w komórkach raka gruczołu sutkowego. W badaniach własnych wykazano także, iż mimo braku wrażliwości na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu, wzmacniał on ekspresję VDR zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w komórkach linii 4T1 oraz E0771. Kalcytriol pełni funkcję autoregulującą poziom VDR w komórkach powodując wzrost jego poziomu poprzez aktywację elementów odpowiedzi VDRE²⁸⁹, co może sugerować że obie linie „reagują” na stymulację kalcytriolem w sposób zależny od funkcjonalnego białka VDR, jednakże efekt promowania właściwości przerzutujących obserwowano tylko w przypadku linii 4T1. Biorąc pod uwagę obserwowany efekt indukowanej kalcytriolem sekrecji PGE2 oraz brak wrażliwości na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu, która może wynikać ze wzmożonej ekspresji CYP24A1 przy obniżonym poziomie VDR, można przypuszczać, że COX-2/PGE2 jest główną przyczyną stymulowanej kalcytriolem patologicznej aktywacji stanu zapalnego w mikrośrodowisku guza 4T1 wpływającego na promowanie procesu przerzutowania. Wykazano, że osteopontyna wpływa na wzrost poziomu PGE2²⁹⁰, co sugeruje, że obserwowany w ramach niniejszej pracy podwyższony poziom OPN w guzach może dodatkowo wzmacniać stymulowany kalcytriolem wzrost sekrecji PGE2 przez komórki 4T1. Shalini i wsp. wykazali w badaniach *in vivo* z użyciem linii komórkowej PC-3, że zarówno inhibitor COX-2, jak i blokowanie receptora dla PGE2- EP2, hamowało wzrost guzów indukowany osteopontyną²⁹¹, co sugeruje istotny związek pomiędzy tymi czynnikami w promowaniu progresji nowotworów. Ponadto, PGE2 indukuje sekrecję IL-23 oraz IL-17 w komórkach dendrytycznych, podobnie jak aktywacja TLR-4,-2²⁹². Wykazano także, że PGE2 wpływa na polaryzację makrofagów w kierunku M2 poprzez aktywację ścieżki cAMP w makrofagach pochodzących ze

szpiku myszy C57BL/6J²⁹³. W modelu 4T1 wykazano, że stosowanie inhibitora COX-2 hamowało przerzutowanie do płuc poprzez hamowanie obecności makrofagów klasy M2 w guzie²⁹⁴.

Wyniki otrzymane z analiz *ex vivo* dotyczących różnicowania komórek szpikowych w obecności medium kondycjonowanego CM 4T1 cal (w którym obserwowano zwiększony poziom PGE2 w porównaniu do medium znad komórek 4T1 niestymulowanych) sugerują, że wrażliwość makrofagów na czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe jest zależna od statusu witaminy D₃ w organizmie myszy. Kalcytriol podawany w dniu 7, kiedy guzy zaczęły się rozwijać, intensywniej oddziaływał na komórki w TME w grupie 100 IU w porównaniu do grupy kontrolnej 1000 IU, co obserwuje się m.in. w najwyższej średniej liczbie przerzutów do płuc w grupie myszy 100 IU + cal obarczonych komórkami 4T1, czy najwyższej liczbie krążących monocytów we krwi obwodowej. Mechanizm związany z indukcją przerzutów oraz wzrostem poziomu OPN w TME w grupie myszy karmionych karmą z deficytem witaminy D₃ oraz traktowanych kalcytriolem (100 IU + cal) wydaje się być związany dodatkowo z ich zwiększoną wrażliwością na indukcję cytokin prozapalnych, w tym IL-6. Co więcej, obserwowano wzrost poziomu IL-6 w tkance guza 4T1 w grupie 100 IU + cal w porównaniu do 100 IU. Magidey-Klein i wsp. wykazali, że IL-6 pełni funkcję w promowaniu procesu przerzutowania w modelu 4T1 poprzez mobilizację macierzystych komórek ze szpiku oraz formowanie progenitorów linii mieloidalnej, co korelowało z obserwowanym wzrostem makrofagów CD206⁺ w guzie²⁹⁵, co może tłumaczyć obserwowane w ramach niniejszej pracy zależności. Ponadto w badaniach grupy Abdel-Mohsen i wsp. wykazano, że IL-6 może obniżać właściwości przeciwnowotworowe kalcytriolu w TNBC (badania z użyciem linii komórkowej HCC1806 *in vitro*). Wykazano, że traktowanie komórek linii HCC1806 z nadekspresją VDR kalcytriolem w skojarzeniu z IL-6 obniża poziom E-kadheryny (której poziom wzrastał podczas stosowania kalcytriolu pojedynczo) oraz wpływa na wzrost populacji komórek CD44⁺ (w tym przypadku CD44 stosowany jako cząsteczka charakterystyczna dla nowotworowych komórek macierzystych)²⁹⁶. Xia i wsp. wykazali także, że IL-6 oraz M-CSF wpływają autokrynnie na wzrost poziomu OPN w monocytach w twardzinie układowej²⁹⁷. Dodatkowo wykazano, że w mysim modelu cukrzycy (indukowanej streptozocyną) wynikający z niej deficyt 25(OH)D₃ w osoczu związany był ze wzrostem ekspresji mRNA zarówno *Spp1* jak i *Il6*, a traktowanie myszy dzienną dawką 800 IU/kg

witaminy D₃ przez 6 tygodni korygowało ich poziom²⁹⁸. Jest to efekt odwrotny od obserwowanego w badaniach własnych, gdzie zaobserwowano wzrost zarówno OPN, jak i IL-6 w BMDMs z grupy 100 IU + cal. Należy jednak zauważyć, że w powyższym przykładzie prowadzono badania z użyciem innego modelu doświadczalnego oraz korygowano poziom witaminy D₃ dietą, a nie bezpośrednio aktywną formą witaminy D₃ – kalcytriolem, jak w przypadku doświadczeń prezentowanych w ramach niniejszej pracy. W przypadku badań prowadzonych przez nasz zespół wykazano, że dieta 5000 IU zwiększyła poziom 25(OH)D₃ w osoczu, podczas gdy traktowanie myszy kalcytriolem obniżyło jego poziom, zwłaszcza w grupie 100 IU, w której był on najniższy spośród wszystkich grup²⁰⁵, co może tłumaczyć obserwowane w przypadku makrofagów z grupy 100 IU + cal pogłębienie wzrostu poziomu OPN i IL-6 oraz większą wrażliwość na indukcję odpowiedzi zapalnej.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki oraz dane z piśmiennictwa można zauważyć, że pronowotworowe ukierunkowanie TAMs (M2) wiąże się z indukcją ekspresji cytokin prozapalnych, co jest sprzeczne z ogólnie przyjętą klasyfikacją tych komórek jako wydzielających cytokiny przeciwzapalne w TME²⁴. Jednak mając na względzie fakt, że stymulującym je czynnikiem w TME w układzie eksperymentalnym *in vivo* z użyciem komórek 4T1 pod wpływem traktowania kalcytriolem oraz suplementacją witaminy D₃ jest prawdopodobnie PGE₂, można przypuszczać, że w tym przypadku obserwuje się immunosupresję wywołaną chronicznym stanem zapalnym²⁷². Mechanizmem, który wywołuje stan immunosupresji jest właśnie promowanie wydzielania czynników o właściwościach prozapalnych, stąd TAMs jako komórki efektorowe mogą stanowić ich główne źródło. W konsekwencji prowadzi to do wytworzenia mikrośrodowiska sprzyjającego procesowi przerzutowania²⁹⁹. Oprócz obserwowanej w poprzednich badaniach prowadzonych przez nasz zespół korelacji pomiędzy prozapalną odpowiedzią komórek Th17, a wzmaganiem przerzutów w modelu *in vivo* z użyciem komórek 4T1¹¹, dodatkowym czynnikiem, który łączy prozapalne właściwości TME ze stanem immunosupresji w nowotworach są supresorowe komórki pochodzące z linii komórek mieloidalnych – MDSC (ang. *myeloid-derived suppressor cells*). MDSC indukowane są głównie przez cząsteczki prozapalne wydzielane przez komórki nowotworowe, bądź inne komórki znajdujące się w zrębie guza³⁰⁰. Wykazano, że wzrost IL-10 w komórkach MDSC związany jest z produkowaną przez makrofagi IL-6. Ponadto w badaniach z użyciem komórek linii 4T1 *in vivo* obserwowano, że PGE₂ wzmagala wzrost guzów

poprzez rekrutację komórek MDSCs ze szpiku kostnego³⁰¹. Natomiast zahamowanie ekspresji receptora EP2 (receptor dla prostaglandyny E2) lub użycie jego antagonisty blokowało różnicowanie komórek MDSC. W innych badaniach wykazano podobne efekty poprzez wyciszenie ekspresji COX-2 w komórkach 4T1, co powodowało zahamowanie akumulacji komórek MDSC w śledzionie³⁰². Można przypuszczać, że niekorzystna aktywacja komórek 4T1 *in vivo* może być wynikiem indukcji COX-2 i PGE2. W związku z tym, w przyszłych badaniach bardzo ważnym byłoby rozważyć udział aktywacji ścieżki COX-2/PGE2/IL-6, jako głównego mediatora stymulowanego kalcytriolem patologicznego zapalenia w mikrośrodowisku guza 4T1 oraz indukcji OPN. Jest to ważne w kontekście szeroko stosowanej suplementacji witaminy D wśród chorych na raka gruczołu sutkowego, u których często występuje niedobór witaminy D.

W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy z użyciem materiału pochodzącego od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego obserwowano, iż średnia wartość 25(OH)D₃ nie przekracza wartości 30 ng/mL, a grupę z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu stanowi ok. 30% pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego, podczas gdy w grupie pacjentek w stadium uogólnionym (rozsiałym) 20%. Obserwowano także, że niski poziom 25(OH)D₃ koreluje z wyższym wskaźnikiem BMI, zarówno w grupie pacjentek po menopauzie, jak i przed menopauzą. Jednakże w przypadku pacjentek w okresie przed menopauzą zależność ta była silniejsza. Odwrotna korelacja pomiędzy wskaźnikiem BMI, a poziomem osoczkowego 25(OH)D₃ jest zbieżna z obserwacjami innych zespołów badawczych i szeroko opisywana w piśmiennictwie³⁰³⁻³⁰⁵. Dodatkowo, Janssen i wsp. zaobserwowali, że w grupie kobiet po menopauzie estradiol był czynnikiem negatywnie korelującym z osoczkowym poziomem 25(OH)D₃³⁰⁶. Ponadto w badaniach Knight i wsp. wykano, że wyższy poziom 25(OH)D korelował z niższym poziomem progesteronu oraz estradiolu u kobiet przed menopauzą³⁰⁷. Wiadomo natomiast, że tkanka tłuszczowa jest źródłem estrogenów u kobiet, w której dochodzi do ich produkcji i metabolizmu^{308,309}. Można przypuszczać zatem, że obserwowana silniejsza odwrotna korelacja pomiędzy 25(OH)D₃ a BMI wśród pacjentek przed menopauzą wynika z wyższego osoczkowego stężenia estradiolu przez wzgląd na status hormonalny, a dodatkowym czynnikiem pogłębiającym ten efekt może być zwiększona produkcja estrogenów przez tkankę tłuszczową. Obserwacje te wymagają jednak dalszych badań celem ich weryfikacji,

ponieważ wzrost BMI może korelować również z wiekiem pacjentki wewnątrz grup przed- i pomenopauzalnej.

Reakcje układu odpornościowego ulegają zmianom pod wpływem wielu czynników. Podczas procesu starzenia organizmu następuje osłabienie układu odpornościowego, co skutkuje m.in. zwiększeniem zapadalności na choroby o podłożu infekcyjnym, słabszą odpowiedzią na szczepienia, występowaniem chorób autoimmunologicznych oraz zwiększeniem ryzyka zachorowania na nowotwory³¹⁰. W ramach niniejszej pracy wykazano, że TAMs izolowane z guzów pacjentek przed menopauzą wykazywały wyższy poziom CD200R oraz MHCII w porównaniu do grupy pacjentek po menopauzie. W przypadku monocytów/makrofagów wraz z wiekiem obserwuje się obniżenie zdolności do fagocytozy, a także produkcji ROS czy sekrecji cytokin pod wpływem stymulacji receptorów TLR³¹¹. Wykazano także, że wraz z wiekiem u ludzi obniża się poziom populacji komórek CD68⁺ w szpiku³¹². Stosowanie makrofagów pochodzących od myszy młodych na rany skórne u myszy starych przyspieszało proces gojenia³¹³. Swift i wsp. obserwowali także, że makrofagi myszy starych posiadały obniżoną zdolność do fagocytozy zmienionych podczas urazu komórek³¹⁴. W warunkach fizjologicznych białko CD200R będące receptorem dla cząsteczki CD200 zaangażowane jest w utrzymanie homeostazy tkankowej i bierze udział procesie gojenia się ran (hamuje nadmierną odpowiedź zapalną w zmienionych chorobowo tkankach)³¹⁵. Natomiast w kontekście TAMs, CD200R opisywany jest jako cząsteczka charakterystyczna dla makrofagów spolaryzowanych alternatywnie, głównie – M2a³¹⁶. Weng i wsp. wykazali w badaniach nad endometriozą, że poziom cząsteczki CD200 regulowany jest przez poziom estrogenów i ulega pod jego wpływem podwyższeniu³¹⁷. W związku z tym, obserwowany wyższy poziom CD200R na powierzchni TAMs może wynikać z wyższego poziomu estrogenów u pacjentek przed menopauzą oraz większej zdolności makrofagów w tej grupie do reagowania na lokalny stan zapalny. Ponadto, w przypadku polaryzacji MDMs do klasy M2a wykazano, że pacjentki przed menopauzą charakteryzowały się wyższym poziomem MFI dla CD200R w porównaniu do komórek wyjściowych niż MDMs pacjentek po menopauzie, co może dodatkowo potwierdzać obserwowane zależności wobec TAMs.

Monocyty stanowią 4-11% wszystkich leukocytów krążących we krwi³¹⁸. Wzrost liczby krążących monocytów w nowotworach opisywany jest jako negatywny czynnik prognostyczny³¹⁹. Są one także jednym z głównych źródeł TAMs³²⁰. Wiele nowych

dowodów wskazuje na wpływ nowotworów na proces hematopoezy. Głównym czynnikiem wzrostowym powodującym różnicowanie monocytów do makrofagów jest M-CSF. Wpływa on zarówno na proliferację progenitorów mieloidalnych, jak i ukierunkowuje je w stronę dojrzewania makrofagów nie zaś granulocytów³²¹. Czynniki M-CSF w badaniach *in vitro/ex vivo* używany jest w celu różnicowania monocytów krwi obwodowej do makrofagów^{322,323}. Wykazano, że indukuje on ekspresję markera CD163 oraz CD14^{324,325}. W niektórych badaniach używa się także czynnika G-MCSF jako stymulatora do klasy makrofagów M1, a M-CSF jako czynnika stymulującego do klasy makrofagów M2³²⁶. W przypadku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy M-CSF użyto podczas procesu różnicowania makrofagów do klasy komórek wyjściowych, nazywanych w tym przypadku M0, podobnie jak w badaniach Bellora i wsp³²⁴. Natomiast do polaryzacji komórek w kierunku klasy M2c użyto IL-10, która także jest induktorem cząsteczek CD163 oraz CD14^{27,327}. Do polaryzacji w kierunku M2a użyto IL-4, która jest induktorem CD200R oraz MHCII²⁴, natomiast w przypadku polaryzacji M1 stosowano INF- γ oraz LPS, które podwyższają poziom cząsteczek CD80 oraz MHCII na powierzchni makrofagów^{229,328}.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zaobserwowano, że kalcytriol zwiększył poziom CD11b oraz CD14 w klasie makrofagów M1 oraz M2a co dowodzi jego udziału w procesie różnicowania makrofagów. Wyniki te są zbieżne z danymi z piśmiennictwa, gdzie także wykazano, że kalcytriol podczas procesu różnicowania powodował wzrost ekspresji *CD11b* oraz *CD14* (badania *in vitro* z użyciem linii komórkowej THP-1)¹⁸⁷. Ponadto zaobserwowano wzrost poziomu CD11b oraz obniżenie poziomu CD80 na powierzchni BMDMs pochodzenia mysiego różnicowanych *ex vivo* do makrofagów klasy M1 i traktowanych kalcytriolem²⁰⁰. W ramach niniejszej pracy wykazano także, że kalcytriol obniża poziom cząsteczki CD80 oraz MHCII, rezultatem czego może być obniżenie zdolności makrofagów do kostymulacji limfocytów T oraz prezentacji antygenów, co w konsekwencji może prowadzić do zahamowania odpowiedzi zapalnej³²⁹. Almerighi i wsp. dowiedli, że kalcytriol w stężeniu 10 nM stosowany przez 72 godziny wobec ludzkich monocytów obniżał poziom CD40, CD80, CD86 oraz wydzielanie INF- γ przy jednoczesnym wzroście sekrecji IL-10¹⁸⁹. W wielu badaniach z użyciem komórek dendrytycznych wykazano także, że kalcytriol oraz jego analogi obniżały poziom cząsteczek kostymulujących CD80 oraz CD86^{177,330–332}. W przypadku polaryzacji MDMs w kierunku M1, wykazano w grupie

pacjentek po menopauzie, że kalcytriol w trakcie różnicowania zwiększa poziom CD14, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu MHCII oraz CD80. Dodatkowo w grupie z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ efekt obniżenia CD80 obserwuje się już w stężeniu 10 nM. W przypadku pacjentek przed menopauzą obserwuje się podobne tendencje, natomiast MDMs z tej grupy były mniej wrażliwe na obniżenie poziomu CD80 pod wpływem działania kalcytriolu. Był to efekt obserwowany w stężeniu 100 nM kalcytriolu i zależny od prawidłowego poziomu 25(OH)D₃ w osoczu. Obserwuje się dodatkowo, że efektywność różnicowania do klasy M1 w grupie pacjentek przed menopauzą z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃ w osoczu jest wyższa, co wyraża się w wyższej wartości MFI dla MHCII oraz CD80 w komórkach nietraktowanych kalcytriolem niż w komórkach z grupy pacjentek o niskim poziomie 25(OH)D₃ w osoczu. Obserwuje się zatem, że prawidłowy poziom 25(OH)D₃ w osoczu wzmacnia obniżenie poziomu CD80 pod wpływem różnicowania *ex vivo* w obecności kalcytriolu w MDMs M1, z drugiej strony prawidłowy poziom witaminy D sprawia, że efektywność różnicowania do klasy M1 jest wyższa, co jest efektem obserwowanym wobec MDMs pacjentek przed menopauzą. Co ciekawe, w przypadku MDMs M1 z grupy pacjentek w stadium uogólnionym raka gruczołu sutkowego obserwuje się wzrost poziomu CD14, natomiast nie obserwuje się wpływu kalcytriolu na obniżenie poziomu MHCII czy CD80, co sugeruje że komórki te nie były wrażliwe na immunosupresyjne działanie kalcytriolu. Jednakże efektywność polaryzacji w kierunku M1 w tej grupie pacjentek była niższa. W porównaniu do komórek wyjściowych obserwowano wzrost poziomu MHCII o ok. 67%, CD80 o ok. 91%, podczas gdy w grupie pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego o ok. 100-120% (w przypadku obu cząsteczek zarówno w grupie pacjentek przed jak i po menopauzie), co sugeruje że monocyty z krwi pacjentek także w zależności od stopnia zaawansowania choroby w różny sposób reagowały na stymulację do klasy M1. W piśmiennictwie opisywany jest wpływ nowotworów nie tylko na ścieżkę różnicowania komórek progenitorowych szpiku, ale także ich wpływ na monocyty krążące w krwiobiegu, co może tłumaczyć powyższe obserwacje. Najczęstsze zmiany związane są z nabywaniem przez monocyty aktywności immunosupresyjnych³³³. Wśród pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego wykazano, że monocyty z krwi obwodowej w różny sposób odpowiadały na stymulację INF- γ oraz G- MCSF, co było zbieżne ze zmienionym profilem ekspresji genów w tych komórkach związanym z odpowiedzią na interferony i w związku z tym, obniżoną zdolnością tych komórek do polaryzacji w kierunku M1. Dodatkowo obserwacje te korelowały

z obecnością w mikrośrodowisku guza TAMs o wysokim poziomie CD163 na powierzchni³³⁴. Wang i wsp. wykazali, że odpowiedź na stymulację INF- γ negatywnie korelowała z ekspresją CSF1R (receptor dla M-CSF) w monocytach izolowanych od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego. Wykazano, że wśród pacjentek z nawrotami choroby, w porównaniu do kobiet wolnych od nawrotów oraz zdrowych dawczyń, poziom aktywacji ścieżki INF- γ -pSTAT1 (ścieżka aktywująca polaryzację makrofagów w kierunku M1) był znamienne niższy³³⁵, co może świadczyć o zmienionej funkcji monocytów pod wpływem rozwijającej się choroby nowotworowej i ich większej zdolności do ukierunkowania pronowotworowego.

Różnice w plastyczności monocytów obserwowano także w przypadku różnicowania MDMs do klasy makrofagów M2c. Wykazano, że MDMs z grupy pacjentek po menopauzie ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego oraz z grupy pacjentek w stadium uogólnionym wykazały wzrost poziomu markera CD163 charakterystycznego dla klasy makrofagów M2c aż o ok. 160% podczas gdy MDMs z grupy pacjentek przed menopauzą tylko o 70% w porównaniu do komórek wyjściowych. Dodatkowo bardzo ciekawą obserwacją było obniżenie poziomu białka CD163 w grupie pacjentek po menopauzie z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu w przypadku komórek nietraktowanych kalcytriolem i brak indukcji CD163 w grupie pacjentek przed menopauzą. Dodatkowo kalcytriol obniżał poziom CD163 w każdej z grup klinicznych pacjentek. W piśmiennictwie opisywany wpływ kalcytriolu na ekspresję cząsteczki CD163 związany jest głównie ze zwiększeniem jej poziomu. Zhang i wsp. dowiedli w badaniach nad nefropatią cukrzycową w modelu szczurzym, że kalcytriol wpływał na zmiany w polaryzacji makrofagów napływających do miejsc uszkodzeń w nerkach zwiększając ekspresję cząsteczki CD163 oraz Arg-1³³⁶. W badaniach na makrofagach izolowanych ze zmian zapalnych w wyniku oparzenia słonecznego także wykazano, że komórki izolowane od pacjentów, którzy otrzymali po naświetleniu UV wysokie dawki witaminy D₃ (200 000 IU), charakteryzują się wyższą ekspresją Arg-1 oraz CD163³³⁷. Wherry i wsp. otrzymali podobne rezultaty w kontekście wzmaganie ekspresji CD163 na powierzchni makrofagów. Natomiast ich model badawczy stanowiły komórki MDMs pochodzące od bydła zakażonego *Mycobacterium avium*³³⁸. Należy jednak podkreślić, że w każdej z powyższych prac stosowano bardzo duże dawki lub stężenia kalcytriolu czy witaminy D₃. Na przykład w przypadku badań Wherry i wsp. stosowano pre-traktowanie komórek MDMs kalcytriolem w stężeniu

4 ng/mL (9,6 nM) co jest znacznie wyższym stężeniem niż maksymalne stosowane w przypadku eksperymentów prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy (100 nM). Co ciekawe, w badaniach własnych, szczególnie w przypadku pacjentek po menopauzie w grupie z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu, w stosowanym stężeniu kalcytriolu 100 nM można było obserwować tendencję do wzrostu poziomu CD163 na powierzchni MDMs. Może to dowodzić, że jego zbyt wysokie stężenie wpływa na indukcję tej cząsteczki, zwłaszcza że stężenia kalcytriolu osiąmane fizjologicznie opisuje się jako 0,5 nM, natomiast 100 nM jako ponadfizjologiczne³³⁹. Jednakże biorąc pod uwagę fakt, że cząsteczka CD163 jest markerem makrofagów klasy M2 i związana jest z ich funkcją przeciwzapalną/pronowotworową można przypuszczać, że kalcytriol w stosowanych w tym układzie badawczym stężeniach głównie pełnił rolę hamującą polaryzację monocytów w tym kierunku. Dodatkowo, w grupach pacjentek z prawidłowym stężeniem 25(OH)D₃ w osoczu, brak indukowanej przez IL-10 dodatkowej stymulacji ekspresji cząsteczki CD163 w przypadku komórek MDMs M2c w grupie pacjentek przed menopauzą oraz obniżenie poziomu CD163 w grupie pacjentek po menopauzie potwierdza hamujący wpływ witaminy D w organizmie na polaryzację makrofagów w kierunku M2c. Jednakże, równocześnie z obniżeniem poziomu CD163 na powierzchni komórek MDMs M2c pochodzących z krwi pacjentek po menopauzie z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego oraz w stadium rozszanym obserwowano obniżenie poziomu cząsteczki CD80 pod wpływem różnicowania w obecności kalcytriolu, podczas gdy wobec MDMs pacjentek przed menopauzą nie obserwowano tego efektu. Obniżenie cząsteczek kostymulujących na powierzchni makrofagów w kontekście progresji nowotworu może mieć wpływ na ucieczkę spod nadzoru układu odpornościowego i prowadzić do progresji choroby³²⁹. Jednakże, aby ocenić istotność obserwowanych zmian należałoby przeprowadzić dodatkowe badania.

W ramach niniejszej pracy obserwowano także wzrost poziomu populacji komórek CD14⁺CD163⁺ w klasach makrofagów M0 oraz M2c. Wykazano, że najwyższy odsetek tej populacji komórek charakterystyczny był dla pacjentek z grupy w uogólnionym stadium choroby w porównaniu z grupą ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego (przed i po menopauzie). Dodatkowo, zaobserwowano w przypadku klasy makrofagów M2c, że MDMs z grupy pomenopauzalnej w porównaniu do przedmenopauzalnej charakteryzowały się wyższym odsetkiem populacji MDMs CD14⁺CD163⁺. Obserwowany efekt różnej plastyczności monocytów wyrażonej

w efektywności ekspresji cząsteczek powierzchniowych charakterystycznych dla poszczególnych klas makrofagów pod wpływem zarówno M-CSF, jak i IL-10 może być wynikiem wpływu zaawansowania choroby, jak i statusu menopauzalnego. Jednakże fakt, że grupę pacjentek w stadium rozsiałym stanowiły głównie pacjentki po menopauzie, a odsetek komórek CD14⁺CD163⁺ obserwowany w grupie pacjentek po menopauzie ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego nie był aż tak wysoki, może świadczyć o tym, że monocyty z krwi pacjentek z grupy w stadium uogólnionym choroby były bardziej wrażliwe na czynniki stymulujące do klasy makrofagów M2c właśnie z powodu agresywnego typu nowotworu.

Podsumowując, zmiany stymulowane kalcytriolem obserwowane w fenotypie MDMs pochodzących od pacjentek zarówno ze zlokalizowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego, jak i w stadium uogólnionym (rozsiałym) choroby, świadczą o podwójnej roli kalcytriolu w polaryzacji makrofagów. Wpłynął on zarówno na obniżanie poziomu cząsteczek charakterystycznych dla klasy makrofagów M1, jak i M2. Ponadto wykazano plastyczność monocytów zależną od statusu menopauzalnego pacjentek. Wykazano, że najkorzystniejszy wpływ prawidłowego poziomu 25(OH)D₃ w osoczu obserwuje się wobec komórek pochodzących od pacjentek w okresie przed menopauzą, gdzie obserwowano wyższą zdolność MDMs do polaryzacji w kierunku M1 oraz brak indukcji cząsteczek charakterystycznych dla klasy makrofagów M2c. Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane z analiz materiału pochodzenia mysiego a także analizę TAMs z tkanki pooperacyjnej pacjentek, można wysnuć wniosek, iż ostateczne ukierunkowanie makrofagów wydaje się zależeć głównie od indywidualnych cech komórek nowotworowych oraz ich odpowiedzi na kalcytriol. Jednakże obserwacyjny charakter przeprowadzonych badań sprawia, iż konieczne jest wykonanie szeregu dalszych analiz celem weryfikacji diskutowanych zależności. Stanowią one jednak dobry punkt wyjścia do zgłębiania wiedzy na temat wpływu witaminy D₃ na makrofagi obecne w mikrośrodowisku raka gruczołu sutkowego.

6. WNIOSKI

- ❖ Zarówno podawanie karmy suplementowanej witaminą D₃ (5000 IU), jak i traktowanie myszy kalcytriolem niezależnie od podawanej karmy (1000 IU + cal; 100 IU + cal) wzmacnia potencjał przerzutowy komórek 4T1 obserwowany we wzroście liczby przerzutów do płuc oraz kości w badaniach *in vivo*, czego nie zaobserwowano w przypadku linii komórkowych 67NR oraz E0771 – dotyczy tylko tkanki płuc.
- ❖ TAMs 4T1 pochodzące z grup o zwiększonej liczbie przerzutów charakteryzują się pogłębionym fenotypem M2, przy jednoczesnym prozapalnym profilu ekspresji genów (wzrost cytokiny zapalnej *Il23a* przy jednocześnie obniżonym poziomie *Il10* w porównaniu do TAMs 67NR – nieprzerzutującej, izogeniczną linią komórkową stanowiącą punkt odniesienia).
- ❖ OPN odgrywa kluczową rolę w procesie przerzutowania komórek 4T1, co wyraża się we wzroście poziomu tego białka w tkance guza w grupach o podwyższonej liczbie przerzutów do płuc oraz kości oraz fenotypie TAMs MHCII^{low}CD44^{high} (zwłaszcza w grupach 1000 IU + cal oraz 5000 IU).
- ❖ Makrofagi pochodzące ze szpiku myszy karmionych karmą z deficytem witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem wykazują wyższą wrażliwość na czynniki indukujące stan zapalny wydzielane przez stymulowane kalcytriolem komórki 4T1, co wykazano pośrednio w badaniach *ex vivo* z użyciem komórek BMDMs myszy BALB/c nieobciążonych nowotworem, a traktowanych CM 4T1 cal. Komórki te charakteryzowały się podwyższoną ekspresją *Il23a*, *Il6*, *Tnfa* przy jednoczesnym obniżeniu *Tgfb*, co w przypadku IL-6 oraz TGFβ potwierdzono także na poziomie białka.
- ❖ Wysoka ekspresja *Cyp24a1* oraz niska ekspresja *Vdr* są czynnikami warunkującymi brak wrażliwości komórek nowotworowych na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu.
- ❖ Kalcytriol wzmacnia sekrecję PGE2 przez komórki 4T1 zależną od COX-2 w warunkach *in vitro*, co w sposób pośredni może tłumaczyć obserwowaną prozapalną aktywację TAMs.
- ❖ Kalcytriol w sposób bezpośredni nie jest czynnikiem wpływającym na poziom cząsteczki CD44 na powierzchni makrofagów, co wykazano w badaniach *ex vivo*

z użyciem mysich komórek BMDMs oraz ludzkich komórek MDMs, gdzie nie obserwowano różnic w poziomie tego białka w żadnej z grup badanych.

- ❖ Białko CD44 na powierzchni TAMs związane jest z promowaniem procesu przerzutowania, co obserwowano we wzroście jego poziomu w przypadku TAMs izolowanych zarówno z guzów myszy, jak i z tkanek pooperacyjnych pacjentek, gdzie wykazano obecność przerzutów do płuc i kości (w przypadku materiału pochodzącego od myszy) oraz sąsiadujących węzłów chłonnych (w przypadku materiału pochodzącego od pacjentek).
- ❖ Kalcytriol moduluje makrofagi podczas procesu różnicowania, obniżając poziom cząsteczek charakterystycznych dla klasy makrofagów M1, jak i M2 na powierzchni komórek MDMs. Efekt ten był zależny od statusu menopauzalnego oraz poziomu 25(OH)D₃ w osoczu, co wykazały badania *ex vivo* z użyciem monocytów z krwi obwodowej pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego.
- ❖ Prawidłowy poziom 25(OH)D₃ w osoczu pacjentek przed menopauzą korelował z większą wrażliwością MDMs na polaryzację w kierunku makrofagów M1 oraz niższą wrażliwością na stymulację w kierunku makrofagów klasy M2, co w sposób pośredni może świadczyć o wpływie witaminy D₃ na przeciwnowotworowe ukierunkowanie tych komórek.
- ❖ Monocyty izolowane z krwi pacjentek w stadium uogólnionym (rozszanym) raka gruczołu sutkowego są bardziej wrażliwe w warunkach *ex vivo* na polaryzację w kierunku makrofagów klasy M2, co wyraża się w ich wyższej zdolności do indukcji CD163 oraz CD14 pod wpływem M-CSF oraz IL-10 w porównaniu do MDMs z grupy pacjentek ze zlokalizowanym miejscowo rakiem. Ponadto są mniej wrażliwe na polaryzację w kierunku makrofagów klasy M1, co w sposób pośredni może świadczyć o ich pronowotworowym ukierunkowaniu.

PIŚMIENNICTWO

1. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*. 2001;357(9255):539-545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
2. Laplane L, Duluc D, Bikfalvi A, Larmonier N, Pradeu T. Beyond the tumour microenvironment. *Int J Cancer*. 2019;145(10):2611-2618. doi:10.1002/ijc.32343
3. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal—Redux. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(1):1-11. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0209
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
6. Atoum M, Alzoughool F. Vitamin D and Breast Cancer: Latest Evidence and Future Steps. *Breast Cancer(Auckl)*. 2017;11:117822341774981. doi:10.1177/1178223417749816
7. Waszyk-Nowaczyk M, Głowska E. THE ROLE OF VITAMIN D IN NEOPLASMS AND NEURODEGENERATION DISEASES - A REVIEW OF THE LITERATURE. *Farm Pol*. 2020;76(3):149-155. doi:10.32383/farmpol/121024
8. Vanhevel J, Verlinden L, Doms S, Wildiers H, Verstuyf A. The role of vitamin D in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*. 2022;29(2):R33-R55. doi:10.1530/ERC-21-0182
9. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *American Journal of Public Health*. 2006;96(2):33.
10. Anisiewicz A, Pawlik A, Filip-Psurska B, et al. Unfavorable effect of calcitriol and its low-calcemic analogs on metastasis of 4T1 mouse mammary gland cancer. *Int J Oncol*. Published online November 2, 2017. doi:10.3892/ijo.2017.4185
11. Pawlik A, Anisiewicz A, Filip-Psurska B, et al. Divergent Effect of Tacalcitol (PRI-2191) on Th17 Cells in 4T1 Tumor Bearing Young and Old Ovariectomized Mice. *Aging and disease*. 2020;11(2):241. doi:10.14336/AD.2019.0618
12. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-455. doi:10.1038/nature12034
13. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional Role of Monocytes and Macrophages for the Inflammatory Response in Acute Liver Injury. *Front Physiol*. 2012;3. doi:10.3389/fphys.2012.00056
14. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
15. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):58. doi:10.1186/s13045-017-0430-2
16. Fu LQ, Du WL, Cai MH, Yao JY, Zhao YY, Mou XZ. The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis. *Cellular Immunology*. 2020;353:104119. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104119

17. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):34-47. doi:10.1038/nri2206
18. Kurdi AT, Glavey SV, Bezman NA, et al. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis by Macrophages is a Novel Mechanism of Action of Elotuzumab. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2018;17(7):1454-1463. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0998
19. Aminin D, Wang Y. Macrophages as a “weapon” in anticancer cellular immunotherapy. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* 2021;37(9):749-758. doi:10.1002/kjm2.12405
20. Kopeć-Szlęzak J. Makrofagi i ich rola w układzie krwiotwórczym. Published online 2014:9.
21. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.* 2016;39(11):1588-1596. doi:10.1007/s12272-016-0820-y
22. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):750-761. doi:10.1038/nri3088
23. Kainulainen K, Takabe P, Heikkinen S, et al. M1 Macrophages Induce Protumor Inflammation in Melanoma Cells through TNFR–NF-κB Signaling. *Journal of Investigative Dermatology.* 2022;142(11):3041-3051.e10. doi:10.1016/j.jid.2022.04.024
24. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation.* 2015;2015:1-16. doi:10.1155/2015/816460
25. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(6):369-382. doi:10.1038/s41577-019-0127-6
26. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2020;11:583084. doi:10.3389/fimmu.2020.583084
27. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology.* 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
28. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch’ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol.* 2020;9:1512. doi:10.3389/fonc.2019.01512
29. Wen Y, Zhu Y, Zhang C, et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Front Pharmacol.* 2022;13:1040163. doi:10.3389/fphar.2022.1040163
30. Jiang H, Hegde S, DeNardo DG. Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(8):1037-1048. doi:10.1007/s00262-017-2003-1
31. He Z, Zhang S. Tumor-Associated Macrophages and Their Functional Transformation in the Hypoxic Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2021;12:741305. doi:10.3389/fimmu.2021.741305

32. Zhou WH, Du WD, Li YF, et al. The Overexpression of Fibronectin 1 Promotes Cancer Progression and Associated with M2 Macrophages Polarization in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *IJGM*. 2022;Volume 15:5027-5042. doi:10.2147/IJGM.S364708
33. Larsen AMH, Kuczek DE, Kalvisa A, et al. *Collagen Density Modulates the Immunosuppressive Functions of Tumor-Associated Macrophages*. *Immunology*; 2019. doi:10.1101/513986
34. Wan S, Zhao E, Kryczek I, et al. Tumor-Associated Macrophages Produce Interleukin 6 and Signal via STAT3 to Promote Expansion of Human Hepatocellular Carcinoma Stem Cells. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1393-1404. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.039
35. Allavena P, Digifico E, Belgiovine C. Macrophages and cancer stem cells: a malevolent alliance. *Mol Med*. 2021;27(1):121. doi:10.1186/s10020-021-00383-3
36. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;99:180-185. doi:10.1016/j.addr.2015.11.009
37. Cortese N, Soldani C, Franceschini B, et al. Macrophages in Colorectal Cancer Liver Metastases. *Cancers*. 2019;11(5):633. doi:10.3390/cancers11050633
38. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed Research International*. 2015;2015:1-13. doi:10.1155/2015/549412
39. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, et al. HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. Published online 2015:28.
40. Huang S. Contributions of Stromal Metalloproteinase-9 to Angiogenesis and Growth of Human Ovarian Carcinoma in Mice. *CancerSpectrum Knowledge Environment*. 2002;94(15):1134-1142. doi:10.1093/jnci/94.15.1134
41. Fahey E, Doyle SL. IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front Immunol*. 2019;10:1426. doi:10.3389/fimmu.2019.01426
42. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003;22(10):1517-1527. doi:10.1038/sj.onc.1206226
43. Sung PS. Crosstalk between tumor-associated macrophages and neighboring cells in hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol*. 2022;28(3):333-350. doi:10.3350/cmh.2021.0308
44. Lv J, Liu C, Chen FK, et al. M2-like tumour-associated macrophage-secreted IGF promotes thyroid cancer stemness and metastasis by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Med Rep*. 2021;24(2):611. doi:10.3892/mmr.2021.12249
45. Wang J sheng, Zhang J, Li JH, et al. High tumor-associated macrophages infiltration is associated with poor prognosis and may contribute to the phenomenon of epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer. *OTT*. 2016;Volume 9:3975-3983. doi:10.2147/OTT.S103112

46. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer*. 2012;12(1):35. doi:10.1186/1471-2407-12-35
47. Zeng XY, Xie H, Yuan J, et al. M2-like tumor-associated macrophages-secreted EGF promotes epithelial ovarian cancer metastasis via activating EGFR-ERK signaling and suppressing lncRNA LIMT expression. *Cancer Biology & Therapy*. 2019;20(7):956-966. doi:10.1080/15384047.2018.1564567
48. Roh-Johnson M, Bravo-Cordero JJ, Patsialou A, et al. Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation. *Oncogene*. 2014;33(33):4203-4212. doi:10.1038/onc.2013.377
49. Anvari S, Osei E, Maftoon N. Interactions of platelets with circulating tumor cells contribute to cancer metastasis. *Sci Rep*. 2021;11(1):15477. doi:10.1038/s41598-021-94735-y
50. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood*. 2005;105(1):178-185. doi:10.1182/blood-2004-06-2272
51. Zhang Y, Zhou N, Yu X, et al. Tumacrophage: macrophages transformed into tumor stem-like cells by virulent genetic material from tumor cells. *Oncotarget*. 2017;8(47):82326-82343. doi:10.18632/oncotarget.19320
52. Broncy L, Paterlini-Bréchet P. Cancer-associated circulating atypical cells with both epithelial and macrophage-specific markers. *J Lab Precis Med*. 2018;3:91-91. doi:10.21037/jlpm.2018.10.05
53. Zhang Y, Ma Q, Liu T, et al. Interleukin-6 suppression reduces tumour self-seeding by circulating tumour cells in a human osteosarcoma nude mouse model. *Oncotarget*. 2016;7(1):446-458. doi:10.18632/oncotarget.6371
54. Xiao YC, Yang ZB, Cheng XS, et al. CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis. *Cancer Letters*. 2015;361(1):22-32. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.021
55. Qian B, Deng Y, Im JH, et al. A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. Bereswill S, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(8):e6562. doi:10.1371/journal.pone.0006562
56. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-827. doi:10.1038/nature04186
57. Deguchi A, Maru Y. Inflammation-associated premetastatic niche formation. *Inflamm Regen*. 2022;42(1):22. doi:10.1186/s41232-022-00208-8
58. Doak GR, Schwertfeger KL, Wood DK. Distant Relations: Macrophage Functions in the Metastatic Niche. *Trends in Cancer*. 2018;4(6):445-459. doi:10.1016/j.trecan.2018.03.011
59. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, et al. Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin. *Cancer Cell*. 2013;23(2):249-262. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.008

60. Belgiovine C, Bello E, Liguori M, et al. Lurbinectedin reduces tumour-associated macrophages and the inflammatory tumour microenvironment in preclinical models. *Br J Cancer*. 2017;117(5):628-638. doi:10.1038/bjc.2017.205
61. Kakoschky B, Pleli T, Schmithals C, et al. Selective targeting of tumor associated macrophages in different tumor models. Mondelli MU, ed. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0193015. doi:10.1371/journal.pone.0193015
62. Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, et al. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(12):2803-2815. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00926.x
63. Rogers TL, Wind N, Hughes R, et al. Macrophages as potential targets for zoledronic acid outside the skeleton—evidence from in vitro and in vivo models. *Cell Oncol*. 2013;36(6):505-514. doi:10.1007/s13402-013-0156-2
64. Vonderheide RH, Bajor DL, Winograd R, Evans RA, Bayne LJ, Beatty GL. CD40 immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(5):949-954. doi:10.1007/s00262-013-1427-5
65. Gomez-Roca C, Cassier P, Zamarin D, et al. Anti-CSF-1R emactuzumab in combination with anti-PD-L1 atezolizumab in advanced solid tumor patients naïve or experienced for immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer*. 2022;10(5):e004076. doi:10.1136/jitc-2021-004076
66. Gelderblom H, de Sande M van. Pexidartinib: first approved systemic therapy for patients with tenosynovial giant cell tumor. *Future Oncology*. 2020;16(29):2345-2356. doi:10.2217/fon-2020-0542
67. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
68. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*. 2022;14(10):2569. doi:10.3390/cancers14102569
69. Bobek-Billewicz B, Didkowska J, Fijuth J, et al. Nowotwory Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego. :96.
70. Religioni U. Cancer incidence and mortality in Poland. *Clinical Epidemiology and Global Health*. 2020;8(2):329-334. doi:10.1016/j.cegh.2019.12.014
71. Kudela E, Samec M, Kubatka P, et al. Breast Cancer in Young Women: Status Quo and Advanced Disease Management by a Predictive, Preventive, and Personalized Approach. *Cancers*. 2019;11(11):1791. doi:10.3390/cancers11111791
72. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology*. 2012;13(11):1141-1151. doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4
73. Mehrgou A, Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran*. 2016;30:12.

74. De Talhouet S, Peron J, Vuilleumier A, et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Sci Rep.* 2020;10(1):7073. doi:10.1038/s41598-020-63759-1
75. Angeli D, Salvi S, Tedaldi G. Genetic Predisposition to Breast and Ovarian Cancers: How Many and Which Genes to Test? *IJMS.* 2020;21(3):1128. doi:10.3390/ijms21031128
76. Chamseddine RS, Wang C, Yin K, et al. Penetrance of male breast cancer susceptibility genes: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2022;191(1):31-38. doi:10.1007/s10549-021-06413-2
77. Jiralerspong S, Goodwin PJ. Obesity and Breast Cancer Prognosis: Evidence, Challenges, and Opportunities. *JCO.* 2016;34(35):4203-4216. doi:10.1200/JCO.2016.68.4480
78. Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(1):307-314. doi:10.1007/s10549-012-2339-3
79. Gilbert CA, Slingerland JM. Cytokines, Obesity, and Cancer: New Insights on Mechanisms Linking Obesity to Cancer Risk and Progression. *Annu Rev Med.* 2013;64(1):45-57. doi:10.1146/annurev-med-121211-091527
80. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention: Breast Cancer, Inflammation, and Obesity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2017;67(5):378-397. doi:10.3322/caac.21405
81. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front Oncol.* 2021;11:692142. doi:10.3389/fonc.2021.692142
82. Danforth DN. The Role of Chronic Inflammation in the Development of Breast Cancer. *Cancers.* 2021;13(15):3918. doi:10.3390/cancers13153918
83. Cem G, Irving K. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine.* Published online 1999:7.
84. Guo L, Liu S, Zhang S, et al. C-reactive protein and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5(1):10508. doi:10.1038/srep10508
85. Visser M. Elevated C-Reactive Protein Levels in Overweight and Obese Adults. *JAMA.* 1999;282(22):2131. doi:10.1001/jama.282.22.2131
86. Agnoli C, Grioni S, Pala V, et al. Biomarkers of inflammation and breast cancer risk: a case-control study nested in the EPIC-Varese cohort. *Sci Rep.* 2017;7(1):12708. doi:10.1038/s41598-017-12703-x
87. Boyd NF, Sun L, Stone J, Fishell E, Jong RA, Chiarelli A. Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine.* Published online 2007:10.
88. Chew GL, Huo CW, Huang D, et al. Increased COX-2 expression in epithelial and stromal cells of high mammographic density tissues and in a xenograft model of mammographic density. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(1):89-99. doi:10.1007/s10549-015-3520-2

89. Esbona K, Yi Y, Saha S, et al. The Presence of Cyclooxygenase 2, Tumor-Associated Macrophages, and Collagen Alignment as Prognostic Markers for Invasive Breast Carcinoma Patients. *The American Journal of Pathology*. 2018;188(3):559-573. doi:10.1016/j.ajpath.2017.10.025
90. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):118. doi:10.1186/s13058-017-0908-4
91. Grosso G, Bella F, Godos J, et al. Possible role of diet in cancer: systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutrition Reviews*. 2017;75(6):405-419. doi:10.1093/nutrit/nux012
92. Szuster E, Kostrzevska P, Pawlikowska-Gorzelańczyk A, Mandera-Grygierzec A. Diet and breast cancer. *J Educ Health Sport*. 2022;12(7):840-847. doi:10.12775/JEHS.2022.12.07.084
93. Khushalani JS, Qin J, Ekwueme DU, White A. Awareness of breast cancer risk related to a positive family history and alcohol consumption among women aged 15–44 years in United States. *Preventive Medicine Reports*. 2020;17:101029. doi:10.1016/j.pmedr.2019.101029
94. John EM, Phipps AI, Knight JA, et al. Medical radiation exposure and breast cancer risk: Findings from the Breast Cancer Family Registry. *Int J Cancer*. 2007;121(2):386-394. doi:10.1002/ijc.22668
95. Zhao X, Qu J, Sun Y, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2017;8(18):30576-30586. doi:10.18632/oncotarget.15736
96. Mahmoud SMA, Lee AHS, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2012;65(2):159-163. doi:10.1136/jclinpath-2011-200355
97. Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, et al. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology*. 2015;66(6):873-883. doi:10.1111/his.12607
98. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *OTT*. Published online August 2014:1475. doi:10.2147/OTT.S61838
99. Gwak JM, Jang MH, Kim DI, Seo AN, Park SY. Prognostic Value of Tumor-Associated Macrophages According to Histologic Locations and Hormone Receptor Status in Breast Cancer. Guan XY, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0125728. doi:10.1371/journal.pone.0125728
100. Mohammed ZM, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(5):864-873. doi:10.1038/bjc.2012.347
101. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *Journal of Immunological Methods*. 2012;375(1-2):196-206. doi:10.1016/j.jim.2011.10.013

102. Klingen TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LA. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Human Pathology*. 2017;69:72-80. doi:10.1016/j.humpath.2017.09.001
103. Zhang W jie, Wang X hua, Gao S ting, et al. Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Journal of Surgical Research*. 2018;222:93-101. doi:10.1016/j.jss.2017.09.035
104. Jeong H, Hwang I, Kang SH, Shin HC, Kwon SY. Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2019;22(1):38. doi:10.4048/jbc.2019.22.e5
105. Miyasato Y, Shiota T, Ohnishi K, et al. High density of CD204-positive macrophages predicts worse clinical prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Sci*. 2017;108(8):1693-1700. doi:10.1111/cas.13287
106. Koru-Sengul T, Santander AM, Miao F, et al. Breast cancers from black women exhibit higher numbers of immunosuppressive macrophages with proliferative activity and of crown-like structures associated with lower survival compared to non-black Latinas and Caucasians. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;158(1):113-126. doi:10.1007/s10549-016-3847-3
107. Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A, et al. Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *International Journal of Oncology*. 2017;51(1):104-114. doi:10.3892/ijo.2017.3996
108. Tu D, Dou J, Wang M, Zhuang H, Zhang X. M2 macrophages contribute to cell proliferation and migration of breast cancer. *Cell Biol Int*. 2021;45(4):831-838. doi:10.1002/cbin.11528
109. Davie SA, Maglione JE, Manner CK, et al. Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic Res*. 2007;16(2):193-201. doi:10.1007/s11248-006-9056-9
110. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, et al. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Research*. 2006;66(23):11238-11246. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1278
111. Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, et al. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discovery*. 2015;5(9):932-943. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0012
112. Harney AS, Karagiannis GS, Pignatelli J, et al. The Selective Tie2 Inhibitor Rebastinib Blocks Recruitment and Function of Tie2Hi Macrophages in Breast Cancer and Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017;16(11):2486-2501. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0241
113. Qian BZ, Li J, Zhang H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475(7355):222-225. doi:10.1038/nature10138
114. Guo L, Cheng X, Chen H, et al. Induction of breast cancer stem cells by M1 macrophages through Lin-28B-let-7-HMGA2 axis. *Cancer Letters*. 2019;452:213-225. doi:10.1016/j.canlet.2019.03.032

115. Valeta-Magara A, Gadi A, Volta V, et al. Inflammatory Breast Cancer Promotes Development of M2 Tumor-Associated Macrophages and Cancer Mesenchymal Cells through a Complex Chemokine Network. *Cancer Research*. 2019;79(13):3360-3371. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2158
116. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):78. doi:10.1186/s12929-019-0568-z
117. Racioppi L, Nelson ER, Huang W, et al. CaMKK2 in myeloid cells is a key regulator of the immune-suppressive microenvironment in breast cancer. *Nat Commun*. 2019;10(1):2450. doi:10.1038/s41467-019-10424-5
118. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, et al. Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell*. 2014;26(5):623-637. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.006
119. Noman MZ, Desantis G, Janji B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(5):781-790. doi:10.1084/jem.20131916
120. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(20):7711-7715. doi:10.1073/pnas.0402490101
121. Dinour D, Beckerman P, Ganon L, Tordjman K, Eisenstein Z, Holtzman EJ. Loss-of-Function Mutations of *CYP24A1*, the Vitamin D 24-Hydroxylase Gene, Cause Long-standing Hypercalciuric Nephrolithiasis and Nephrocalcinosis. *Journal of Urology*. 2013;190(2):552-557. doi:10.1016/j.juro.2013.02.3188
122. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;79(3):362-371. doi:10.1093/ajcn/79.3.362
123. Holick MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. *Annals of Epidemiology*. 2009;19(2):73-78. doi:10.1016/j.annepidem.2007.12.001
124. Rusińska A, Płudowski P, Walczak M, Borszewska-Kornacka MK. Vitamin D supplementation guidelines for Poland – a 2018 update. *Medicine*. 2018;2018(1):1-24. doi:10.31350/postepyneonatologii/2018/1/PN2018001
125. Płudowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe — recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynologia Polska*. 2013;64(4):319-327. doi:10.5603/EP.2013.0012
126. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews*. 2016;96(1):365-408. doi:10.1152/physrev.00014.2015
127. Orlov I, Rochel N, Moras D, Klaholz BP. Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA: Structure of the RXR/VDR DNA complex. *The EMBO Journal*. 2012;31(2):291-300. doi:10.1038/emboj.2011.445

128. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al. Large-Scale in Silico and Microarray-Based Identification of Direct 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Target Genes. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(11):2685-2695. doi:10.1210/me.2005-0106
129. Rowland-Goldsmith MA, Holmquist B, Henry HL. Genomic cloning, structure, and regulatory elements of the 1K,25(OH)2D₃ down-regulated gene for cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta*.:5.
130. Hii C, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016;8(3):135. doi:10.3390/nu8030135
131. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523(1):123-133. doi:10.1016/j.abb.2012.04.001
132. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology*. 2014;21(3):319-329. doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.016
133. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991;54(1):193S-201S. doi:10.1093/ajcn/54.1.193S
134. Eliassen AH, Warner ET, Rosner B, et al. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Breast Cancer in Women Followed over 20 Years. *Cancer Research*. 2016;76(18):5423-5430. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0353
135. Mohr SB, Gorham ED, Kim J, Hofflich H, Garland CF. Meta-analysis of Vitamin D Sufficiency for Improving Survival of Patients with Breast Cancer. *ANTICANCER RESEARCH*. Published online 2014:4.
136. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121(2):469-477. doi:10.1007/s10549-009-0593-9
137. Vrieling A, Hein R, Abbas S, Schneeweiss A, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Serum 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):R74. doi:10.1186/bcr2920
138. Song D, Deng Y, Liu K, et al. Vitamin D intake, blood vitamin D levels, and the risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies. *Aging*. 2019;11(24):12708-12732. doi:10.18632/aging.102597
139. Zhou L, Chen B, Sheng L, Turner A. The effect of vitamin D supplementation on the risk of breast cancer: a trial sequential meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;182(1):1-8. doi:10.1007/s10549-020-05669-4
140. Prentice RL, Pettinger MB, Jackson RD, et al. Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporos Int*. 2013;24(2):567-580. doi:10.1007/s00198-012-2224-2
141. Manson JE, Bassuk SS, Buring JE. Principal results of the VITamin D and Omega-3 Trial (VITAL) and updated meta-analyses of relevant vitamin D trials. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;198:105522. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105522

142. Scragg R. The Vitamin D Assessment (ViDA) study – Design and main findings. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;198:105562. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105562
143. Virtanen JK, Nurmi T, Aro A, et al. Vitamin D supplementation and prevention of cardiovascular disease and cancer in the Finnish Vitamin D Trial: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2022;115(5):1300-1310. doi:10.1093/ajcn/nqab419
144. Welsh J. Function of the vitamin D endocrine system in mammary gland and breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;453:88-95. doi:10.1016/j.mce.2017.04.026
145. Huss L, Butt ST, Borgquist S, et al. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):84. doi:10.1186/s13058-019-1169-1
146. Zinser GM, Welsh J. Vitamin D receptor status alters mammary gland morphology and tumorigenesis in MMTV-neu mice. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2361-2372. doi:10.1093/carcin/bgh271
147. Williams JD, Aggarwal A, Swami S, et al. Tumor Autonomous Effects of Vitamin D Deficiency Promote Breast Cancer Metastasis. *Endocrinology*. 2016;157(4):1341-1347. doi:10.1210/en.2015-2036
148. Lopes N, Sousa B, Martins D, 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. Published online 2010:10.
149. Zhalehjoo N, Shakiba Y, Panjehpour M. Gene expression profiles of CYP24A1 and CYP27B1 in malignant and normal breast tissues. *Molecular Medicine Reports*. 2017;15(1):467-473. doi:10.3892/mmr.2016.5992
150. Li J, Luco AL, Ochiatti B, et al. Tumoral Vitamin D Synthesis by CYP27B1 1- α -Hydroxylase Delays Mammary Tumor Progression in the PyMT-MMTV Mouse Model and Its Action Involves NF- κ B Modulation. *Endocrinology*. 2016;157(6):2204-2216. doi:10.1210/en.2015-1824
151. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney International*. 2010;78(2):140-145. doi:10.1038/ki.2010.17
152. Dhawan P, Weider R, Christakos S. CCAAT Enhancer-binding Protein α Is a Molecular Target of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(5):3086-3095. doi:10.1074/jbc.M803602200
153. Rossdeutscher L, Li J, Luco AL, et al. Chemoprevention Activity of 25-Hydroxyvitamin D in the MMTV-PyMT Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Prevention Research*. 2015;8(2):120-128. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0110
154. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-Induced Apoptosis in LNCaP Cells Is Blocked By Overexpression of Bcl-21. *Endocrinology*. 2000;141(1):10-17. doi:10.1210/endo.141.1.7289

155. Galbiati F, Polastri L, Thorens B, et al. Molecular Pathways Involved in the Antineoplastic Effects of Calcitriol on Insulinoma Cells. *Endocrinology*. 2003;144(5):1832-1841. doi:10.1210/en.2002-221014
156. Díaz L, Díaz-Muñoz M, García-Gaytán A, Méndez I. Mechanistic Effects of Calcitriol in Cancer Biology. *Nutrients*. 2015;7(6):5020-5050. doi:10.3390/nu7065020
157. Campbell MJ, Gombart AF, Kwok SH, Park S, Koeffler HP. The anti-proliferative effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on breast and prostate cancer cells are associated with induction of BRCA1 gene expression. *Oncogene*. 2000;19(44):5091-5097. doi:10.1038/sj.onc.1203888
158. Audo I, Darjatmoko SR, Schlamp CL, et al. Vitamin D Analogues Increase p53, p21, and Apoptosis in a Xenograft Model of Human Retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(10):4192. doi:10.1167/iovs.02-1198
159. Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, et al. Modulation of the Vitamin D3 Response by Cancer-Associated Mutant p53. *Cancer Cell*. 2010;17(3):273-285. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.025
160. Lopes N, Carvalho J, Durães C, et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 Induces de novo E-cadherin Expression in Triple-negative Breast Cancer Cells by CDH1-promoter Demethylation. *ANTICANCER RESEARCH*. Published online 2012:9.
161. Li J, Luco AL, Camirand A, St-Arnaud R, Kremer R. Vitamin D Regulates CXCL12/CXCR4 and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in a Model of Breast Cancer Metastasis to Lung. *Endocrinology*. 2021;162(7):bqab049. doi:10.1210/endo/bqab049
162. Horas K, Zheng Y, Fong-Yee C, 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*. 2019;34(9):1721-1732. doi:10.1002/jbmr.3744
163. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Circulation Research*. 2000;87(3):214-220. doi:10.1161/01.RES.87.3.214
164. Santos-Martínez N, Díaz L, Ordaz-Rosado D, et al. Calcitriol restores antiestrogen responsiveness in estrogen receptor negative breast cancer cells: A potential new therapeutic approach. *BMC Cancer*. 2014;14(1):230. doi:10.1186/1471-2407-14-230
165. Chung I, Han G, Seshadri M, et al. Role of Vitamin D Receptor in the Antiproliferative Effects of Calcitriol in Tumor-Derived Endothelial Cells and Tumor Angiogenesis *In vivo*. *Cancer Research*. 2009;69(3):967-975. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2307
166. Kong F, Li L, Wang G, Deng X, Li Z, Kong X. VDR signaling inhibits cancer-associated-fibroblasts' release of exosomal miR-10a-5p and limits their supportive effects on pancreatic cancer cells. *Gut*. 2019;68(5):950-951. doi:10.1136/gutjnl-2018-316627
167. Ferrer-Mayorga G, Gómez-López G, Barbáchano A, et al. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut*. 2017;66(8):1449-1462. doi:10.1136/gutjnl-2015-310977
168. Campos LT, Brentani H, Roela RA, et al. Differences in transcriptional effects of $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D3 on fibroblasts associated to breast carcinomas and from paired normal breast tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;133:12-24. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.08.002

169. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2008;18(1):3-10. doi:10.1016/j.gde.2008.01.003
170. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51(1):311-336. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100611
171. Wang Q, He Y, Shen Y, et al. Vitamin D Inhibits COX-2 Expression and Inflammatory Response by Targeting Thioesterase Superfamily Member 4. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(17):11681-11694. doi:10.1074/jbc.M113.517581
172. Fan P, He L, Hu N, et al. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes and Expressions of Pro-Inflammatory Cytokines through Regulating MicroRNA-22 in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(1):145-155. doi:10.1159/000477123
173. Giangreco AA, Dambal S, Wagner D, et al. Differential expression and regulation of vitamin D hydroxylases and inflammatory genes in prostate stroma and epithelium by 1,25-dihydroxyvitamin D in men with prostate cancer and an in vitro model. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2015;148:156-165. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.10.004
174. Dimitrov V, Bouttier M, Boukhaled G, et al. Hormonal vitamin D up-regulates tissue-specific PD-L1 and PD-L2 surface glycoprotein expression in humans but not mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(50):20657-20668. doi:10.1074/jbc.M117.793885
175. Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, et al. Lineage-specific Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on the Development of Effector CD4 T Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(2):997-1004. doi:10.1074/jbc.M110.163790
176. Sun D, Luo F, Xing J chao, Zhang F, Xu J zhong, Zhang Z hua. 1,25(OH)₂D₃ inhibited Th17 cells differentiation via regulating the NF-κB activity and expression of IL-17. *Cell Prolif*. 2018;51(5):e12461. doi:10.1111/cpr.12461
177. Berer A, Stöckl J, Majdic O, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Experimental Hematology*. 2000;28(5):575-583. doi:10.1016/S0301-472X(00)00143-0
178. Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-α,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY*. Published online 2001:7.
179. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T. Identification of 25-hydroxyvitamin D₃ 1α-hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney International*. 2000;58(2):559-568. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00202.x
180. Delves PJ, Roitt IM, eds. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed. Academic Press; 1998.
181. Esteban L, Vidal M, Dusso A. 1α-Hydroxylase transactivation by γ-interferon in murine macrophages requires enhanced C/EBPβ expression and activation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;89-90:131-137. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.03.092
182. Skrobot A, Demkow U, Wachowska M. Immunomodulatory Role of Vitamin D: A Review. In: Pokorski M, ed. *Current Trends in Immunity and Respiratory Infections*. Vol

1108. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2018:13-23. doi:10.1007/5584_2018_246
183. Fernandez GJ, Ramírez-Mejía JM, Urcuqui-Inchima S. Vitamin D boosts immune response of macrophages through a regulatory network of microRNAs and mRNAs. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022;109:109105. doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109105
184. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J Immunol*. 2004;173(5):2909-2912. doi:10.4049/jimmunol.173.5.2909
185. White JH. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012;13(1):21-29. doi:10.1007/s11154-011-9195-z
186. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol*. 2006;36(2):361-370. doi:10.1002/eji.200425995
187. Moeenrezakhanlou A, Shephard L, Lam L, Reiner NE. Myeloid cell differentiation in response to calcitriol for expression CD11b and CD14 is regulated by myeloid zinc finger-1 protein downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(2):519-528. doi:10.1189/jlb.1207833
188. Tokuda N, Levy RB. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Stimulates Phagocytosis but Suppresses HLA-DR and CD13 Antigen Expression in Human Mononuclear Phagocytes. *Experimental Biology and Medicine*. 1996;211(3):244-250. doi:10.3181/00379727-211-43967
189. Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, Ciaprini C, Rocchi G, Bergamini A. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in Human Monocytes. *Cytokine*. 2009;45(3):190-197. doi:10.1016/j.cyto.2008.12.009
190. Gunasekar P, Swier VJ, Fleegel JP, Boosani CS, Radwan MM, Agrawal DK. Vitamin D and macrophage polarization in epicardial adipose tissue of atherosclerotic swine. Sun J, ed. *PLoS ONE*. 2018;13(10):e0199411. doi:10.1371/journal.pone.0199411
191. Liang S, Cai J, Li Y, Yang R. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 induces macrophage polarization to M2 by upregulating T-cell Ig-mucin-3 expression. *Mol Med Report*. Published online March 15, 2019. doi:10.3892/mmr.2019.10047
192. Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, et al. 1- α ,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide release in macrophage-like RAW 264.7 cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2004;143(1):14-22. doi:10.1016/j.lab.2003.08.002
193. Yang Y, Wei S, Chu K, et al. Upregulation of autophagy in M2 macrophage by vitamin D alleviates crystalline silica-induced pulmonary inflammatory damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;225:112730. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112730
194. Nygaard RH, Nielsen MC, Antonsen KW, Højskov CS, Sørensen BS, Møller HJ. Metabolism of 25-Hydroxy-Vitamin D in Human Macrophages Is Highly Dependent on Macrophage Polarization. *IJMS*. 2022;23(18):10943. doi:10.3390/ijms231810943
195. Nunès JA. Vitamin D Controls Tumor Growth and CD8+ T Cell Infiltration in Breast Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:12.

196. Zhang Y, Guo Q, Zhang Z, et al. VDR Status Arbitrates the Prometastatic Effects of Tumor-Associated Macrophages. *Molecular Cancer Research*. 2014;12(8):1181-1191. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0036
197. Weilbaeher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):411-425. doi:10.1038/nrc3055
198. Quinn JMW, McGee JO, Athanasou NA. Human tumour-associated macrophages differentiate into osteoclastic bone-resorbing cells. *J Pathol*. 1998;184(1):31-36. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199801)184:1<31::AID-PATH962>3.0.CO;2-V
199. Staquicini FI, Hajitou A, Driessen WH, et al. Targeting a cell surface vitamin D receptor on tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer. *eLife*. 2021;10:e65145. doi:10.7554/eLife.65145
200. Anisiewicz A, Łabędź N, Krauze I, Wietrzyk J. Calcitriol in the Presence of Conditioned Media from Metastatic Breast Cancer Cells Enhances Ex Vivo Polarization of M2 Alternative Murine Bone Marrow-Derived Macrophages. *Cancers*. 2020;12(11):3485. doi:10.3390/cancers12113485
201. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar A. Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor. Published online 1978:8.
202. Aslakson CJ, Miller FR. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. :7.
203. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*. 2000;39(1). doi:10.1002/0471142735.im2002s39
204. Le Naour A, Rossary A, Vasson M. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. *Cancer Med*. 2020;9(21):8074-8085. doi:10.1002/cam4.3295
205. Anisiewicz A, Kowalski K, Banach J, et al. Vitamin D Metabolite Profile in Cholecalciferol- or Calcitriol-Supplemented Healthy and Mammary Gland Tumor-Bearing Mice. *Nutrients*. 2020;12(11):3416. doi:10.3390/nu12113416
206. Łabędź N, Stachowicz-Suhs M, Psurski M, et al. Modulation of Fibroblast Activity via Vitamin D3 Is Dependent on Tumor Type—Studies on Mouse Mammary Gland Cancer. *Cancers*. 2022;14(19):4585. doi:10.3390/cancers14194585
207. Cutler SJ, Doecke JD, Ghazawi I, et al. Novel STAT binding elements mediate IL-6 regulation of MMP-1 and MMP-3. *Sci Rep*. 2017;7(1):8526. doi:10.1038/s41598-017-08581-y
208. Uchibori T, Matsuda K, Shimodaira T, Sugano M, Uehara T, Honda T. IL-6 trans-signaling is another pathway to upregulate Osteopontin. *Cytokine*. 2017;90:88-95. doi:10.1016/j.cyto.2016.11.006
209. Tan Y, Zhao L, Yang YG, Liu W. The Role of Osteopontin in Tumor Progression Through Tumor-Associated Macrophages. *Front Oncol*. 2022;12:953283. doi:10.3389/fonc.2022.953283

210. Manore SG, Doheny DL, Wong GL, Lo HW. IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment. *Front Oncol.* 2022;12:866014. doi:10.3389/fonc.2022.866014
211. Finetti F, Travelli C, Ercoli J, Colombo G, Buoso E, Trabalzini L. Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology.* 2020;9(12):434. doi:10.3390/biology9120434
212. Lukert B, Higgins J, Stoskopf M. Menopausal bone loss is partially regulated by dietary intake of vitamin D. :7.
213. Polskie zalecenia dotyczące profilaktyki niedoborów witaminy D – 2009. *Pediatrics Polska.* 2010;85(1):57-61. doi:10.1016/S0031-3939(10)70055-X
214. Eknayan G. Adolphe Quetelet (1796 1874) the average man and indices of obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2007;23(1):47-51. doi:10.1093/ndt/gfm517
215. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2012;12(1):306. doi:10.1186/1471-2407-12-306
216. Schrörs B, Boegel S, Albrecht C, et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front Oncol.* 2020;10:1195. doi:10.3389/fonc.2020.01195
217. Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer.* 2012;12(1):120. doi:10.1186/1471-2407-12-120
218. Wang B, Li Q, Qin L, Zhao S, Wang J, Chen X. Transition of tumor-associated macrophages from MHC class IIhi to MHC class IIlow mediates tumor progression in mice. *BMC Immunol.* 2011;12(1):43. doi:10.1186/1471-2172-12-43
219. Chang YC, Chen TC, Lee CT, et al. Epigenetic control of MHC class II expression in tumor-associated macrophages by decoy receptor 3. *Blood.* 2008;111(10):5054-5063. doi:10.1182/blood-2007-12-130609
220. Marchesi M, Andersson E, Villabona L, et al. HLA-dependent tumour development: a role for tumour associate macrophages? *J Transl Med.* 2013;11(1):247. doi:10.1186/1479-5876-11-247
221. Kim H, Cha J, Jang M, Kim P. Hyaluronic acid-based extracellular matrix triggers spontaneous M2-like polarity of monocyte/macrophage. *Biomater Sci.* 2019;7(6):2264-2271. doi:10.1039/C9BM00155G
222. Xiao Y, Yang K, Wang Z, et al. CD44-Mediated Poor Prognosis in Glioma Is Associated With M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages and Immunosuppression. *Front Surg.* 2022;8:775194. doi:10.3389/fsurg.2021.775194
223. Chen H, Li M, Sanchez E, et al. JAK1/2 pathway inhibition suppresses M2 polarization and overcomes resistance of myeloma to lenalidomide by reducing TRIB1, MUC1, CD44, CXCL12, and CXCR4 expression. *Br J Haematol.* 2020;188(2):283-294. doi:10.1111/bjh.16158

224. Fujita N, Yaegashi N, Ide Y. Expression of CD44 in Normal Human versus Tumor Endometrial Tissues: Possible Implication of Reduced Expression of CD44 in Lympho-Vascular Space Involvement of Cancer Cells. Published online 1994:9.
225. Amash A, Wang L, Wang Y, et al. CD44 Antibody Inhibition of Macrophage Phagocytosis Targets Fc γ Receptor- and Complement Receptor 3-Dependent Mechanisms. *Jl*. 2016;196(8):3331-3340. doi:10.4049/jimmunol.1502198
226. Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 2001;7(5):213-221. doi:10.1016/S1471-4914(01)01963-3
227. McFarlane S, Coulter JA, Tibbits P, et al. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(13):11465-11476. doi:10.18632/oncotarget.3410
228. Wijdeven RH, Luijn MM, Wierenga-Wolf AF, et al. Chemical and genetic control of IFN γ -induced MHCII expression. *EMBO Reports*. 2018;19(9). doi:10.15252/embr.201745553
229. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084
230. Strack E, Rolfe PA, Fink AF, et al. Identification of tumor-associated macrophage subsets that are associated with breast cancer prognosis. *Clinical and Translational Medicine*. 2020;10(8). doi:10.1002/ctm2.239
231. So JY, Smolarek AK, Salerno DM, et al. Targeting CD44-STAT3 Signaling by Gemini Vitamin D Analog Leads to Inhibition of Invasion in Basal-Like Breast Cancer. Glynn SA, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54020. doi:10.1371/journal.pone.0054020
232. Pazhohan A, Amidi F, Akbari-Asbagh F, et al. Expression and shedding of CD44 in the endometrium of women with endometriosis and modulating effects of vitamin D: A randomized exploratory trial. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;178:150-158. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.12.001
233. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Journal of Cell Biology*. 1992;116(3):817-825. doi:10.1083/jcb.116.3.817
234. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990;61(7):1303-1313. doi:10.1016/0092-8674(90)90694-A
235. Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, et al. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol*. 2000;184(1):118-130. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1<118::AID-JCP13>3.0.CO;2-Y
236. Rigby WFC, Waugh MG. Decreased Accessory Cell Function and Costimulatory Activity BY 1, 25-Dihydroxyvitamin D3-Treated Monocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 1992;35(1):110-119. doi:10.1002/art.1780350117
237. Kania JR, Kehat-Stadler T, Kupfer SR. CD44 Antibodies Inhibit Osteoclast Formation. *J Bone Miner Res*. 1997;12(8):1155-1164. doi:10.1359/jbmr.1997.12.8.1155

238. Wei R, Wong JPC, Kwok HF. Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. *J Cancer*. 2017;8(12):2173-2183. doi:10.7150/jca.20480
239. Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BLM. Altered Wound Healing in Mice Lacking a Functional Osteopontin Gene (spp1). :11.
240. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(10):1648-1656. doi:10.1161/01.ATV.14.10.1648
241. Lin CN, Wang CJ, Chao YJ, Lai MD, Shan YS. The significance of the co-existence of osteopontin and tumor-associated macrophages in gastric cancer progression. *BMC Cancer*. 2015;15(1):128. doi:10.1186/s12885-015-1114-3
242. Wei J, Marisetty A, Schrand B, et al. Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;129(1):137-149. doi:10.1172/JCI121266
243. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(8):2037-2044. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01115.x
244. Clemente N, Raineri D, Cappellano G, et al. Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:1-15. doi:10.1155/2016/7675437
245. Chang PL, Ridall AL, Prince CW. Calcitriol regulation of osteopontin expression in mouse epidermal cells. :7.
246. Noda M, Vogel RL, Craig AM, Prah J, DeLuca HF, Denhardt DT. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(24):9995-9999. doi:10.1073/pnas.87.24.9995
247. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM. Vitamin D Receptor Activators Induce an Anticalcific Paracrine Program in Macrophages: Requirement of Osteopontin. *ATVB*. 2010;30(2):321-326. doi:10.1161/ATVBAHA.109.196576
248. Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, et al. Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: Evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *J Cell Physiol*. 2004;198(1):155-167. doi:10.1002/jcp.10394
249. Rao G, Wang H, Li B, et al. Reciprocal Interactions between Tumor-Associated Macrophages and CD44-Positive Cancer Cells via Osteopontin/CD44 Promote Tumorigenicity in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(4):785-797. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2788
250. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *npj Precision Onc*. 2018;2(1):4. doi:10.1038/s41698-018-0047-0

251. Pang X, Gong K, Zhang X, Wu S, Cui Y, Qian BZ. Osteopontin as a multifaceted driver of bone metastasis and drug resistance. *Pharmacological Research*. 2019;144:235-244. doi:10.1016/j.phrs.2019.04.030
252. Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Differential Osteopontin Expression in Phenotypically Distinct Subclones of Murine Breast Cancer Cells Mediates Metastatic Behavior. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(45):46659-46667. doi:10.1074/jbc.M407952200
253. Kitamura T, Qian BZ, Soong D, et al. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 2015;212(7):1043-1059. doi:10.1084/jem.20141836
254. Martin AP, Rankin S, Pitchford S, Charo IF, Furtado GC, Lira SA. Increased Expression of CCL2 in Insulin-Producing Cells of Transgenic Mice Promotes Mobilization of Myeloid Cells From the Bone Marrow, Marked Insulinitis, and Diabetes. *Diabetes*. 2008;57(11):3025-3033. doi:10.2337/db08-0625
255. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311-317. doi:10.1038/ni1309
256. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, et al. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(8):1363-1376. doi:10.1007/s00018-017-2724-5
257. Oft M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. *Cancer Immunology Research*. 2014;2(3):194-199. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0214
258. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11(10):889-896. doi:10.1038/ni.1937
259. Günthner R, Anders HJ. Interferon-Regulatory Factors Determine Macrophage Phenotype Polarization. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:1-8. doi:10.1155/2013/731023
260. Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in Wound Care*. 2012;1(1):10-16. doi:10.1089/wound.2011.0307
261. Wang Q, Ni H, Lan L, Wei X, Xiang R, Wang Y. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res*. 2010;20(6):701-712. doi:10.1038/cr.2010.52
262. Kishimoto T. INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):1-21. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806
263. Conze D, Weiss L, Regen PS, et al. Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. :8.
264. Salem M, Elbaz O, Zahran M, et al. Identification of Predictors of Disease Status and Progression in Patients with Myeloma (MM). *Hematology*. 2000;5(1):41-45. doi:10.1080/10245332.2000.11746486

265. Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(3):657-664. doi:10.1007/s10549-013-2488-z
266. Zhou SF, Chen XW. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF- κ B axis, and tumorigenesis. *DDDT.* Published online June 2015:2941. doi:10.2147/DDDT.S86396
267. Hou Y, Zhu L, Tian H, et al. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell.* 2018;9(12):1027-1038. doi:10.1007/s13238-018-0505-z
268. Nie W. Tumor-promoting effect of IL-23 in mammary cancer mediated by infiltration of M2 macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Published online 2017:7.
269. Chonov DC, Ignatova MMK, Ananiev JR, Gulubova MV. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(14):2391-2398. doi:10.3889/oamjms.2019.589
270. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity.* 2019;51(1):27-41. doi:10.1016/j.immuni.2019.06.025
271. Finetti F, Travelli C, Ercoli J, Colombo G, Buoso E, Trabalzini L. Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology.* 2020;9(12):434. doi:10.3390/biology9120434
272. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol.* 2013;35(2):123-137. doi:10.1007/s00281-012-0342-8
273. Akbari N, Ghorbani M, Salimi V, et al. Cyclooxygenase enzyme and PGE2 expression in patients with functional and non-functional pituitary adenomas. *BMC Endocr Disord.* 2020;20(1):39. doi:10.1186/s12902-020-0515-8
274. Harris RE. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *WJCO.* 2014;5(4):677. doi:10.5306/wjco.v5.i4.677
275. Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;89(3):215-220. doi:10.1007/s10549-004-0714-4
276. Tian J, Hachim MY, Hachim IY, et al. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):40258. doi:10.1038/srep40258
277. Gómez-Valenzuela F, Escobar E, Pérez-Tomás R, Montecinos VP. The Inflammatory Profile of the Tumor Microenvironment, Orchestrated by Cyclooxygenase-2, Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol.* 2021;11:686792. doi:10.3389/fonc.2021.686792
278. Cho JS, Han IH, Lee HR, Lee HM. Prostaglandin E2 Induces IL-6 and IL-8 Production by the EP Receptors/Akt/NF- κ B Pathways in Nasal Polyp-Derived Fibroblasts. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014;6(5):449. doi:10.4168/air.2014.6.5.449
279. Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(10):4885-4890. doi:10.1073/pnas.93.10.4885

280. Khuder SA, Mutgi AB. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2001;84(9):1188-1192. doi:10.1054/bjoc.2000.1709
281. de Pedro M, Baeza S, Escudero MT, et al. Effect of COX-2 inhibitors and other non-steroidal inflammatory drugs on breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(2):525-536. doi:10.1007/s10549-015-3267-9
282. Thill M, Reichert K, Woeste A, et al. Combined Treatment of Breast Cancer Cell Lines with Vitamin D and COX-2 Inhibitors. *ANTICANCER RESEARCH*. Published online 2015:7.
283. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of Prostaglandin Metabolism by Calcitriol Attenuates Growth Stimulation in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*. 2005;65(17):7917-7925. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1435
284. Ravid A, Shenker O, Buchner-Maman E, Rotem C, Koren R. Vitamin D Induces Cyclooxygenase 2 Dependent Prostaglandin E₂ Synthesis in HaCaT Keratinocytes: VITAMIN D INDUCES COX-2 IN KERATINOCYTES. *J Cell Physiol*. 2016;231(4):837-843. doi:10.1002/jcp.25132
285. Wang F, Chang HM, Yi Y, Lin YM, Li H, Leung PCK. TGF- β 1 promotes vitamin D-induced prostaglandin E₂ synthesis by upregulating vitamin D receptor expression in human granulosa-lutein cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2020;318(5):E710-E722. doi:10.1152/ajpendo.00361.2019
286. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523(1):9-18. doi:10.1016/j.abb.2011.11.003
287. Townsend K, Banwell CM, Guy M, et al. Autocrine Metabolism of Vitamin D in Normal and Malignant Breast Tissue. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(9):3579-3586. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2359
288. Osanai M, Lee GH. CYP24A1-induced vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth. *Oncology Reports*. 2016;36(5):2755-2762. doi:10.3892/or.2016.5072
289. Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW. Enhancers located in the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;103(3-5):435-439. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.12.019
290. Budzik MP, Badowska-Kozakiewicz AM. The multidirectional role of osteopontin in cancer. :8.
291. Jain S, Chakraborty G, Kundu GC. The Crucial Role of Cyclooxygenase-2 in Osteopontin-Induced Protein Kinase C α /c-Src/I κ B Kinase α / β -Dependent Prostate Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Research*. 2006;66(13):6638-6648. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0661
292. Sheibanie AF, Tadmori I, Jing H, Vassiliou E, Ganea D. Prostaglandin E₂ induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *FASEB j*. 2004;18(11):1318-1320. doi:10.1096/fj.03-1367fje
293. Luan B, Yoon YS, Le Lay J, Kaestner KH, Hedrick S, Montminy M. CREB pathway links PGE₂ signaling with macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(51):15642-15647. doi:10.1073/pnas.1519644112

294. Na YR, Yoon YN, Son DI, Seok SH. Cyclooxygenase-2 Inhibition Blocks M2 Macrophage Differentiation and Suppresses Metastasis in Murine Breast Cancer Model. Mattei F, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63451. doi:10.1371/journal.pone.0063451
295. Magidey-Klein K, Cooper TJ, Kveler K, et al. IL-6 contributes to metastatic switch via the differentiation of monocytic-dendritic progenitors into prometastatic immune cells. *J Immunother Cancer*. 2021;9(6):e002856. doi:10.1136/jitc-2021-002856
296. Abdel-Mohsen MA, Abo Deif SamarM, Abou-Shamaa LA. IL-6 Impairs the Activity of Vitamin D3 in the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple Negative Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(8):2267-2273. doi:10.31557/APJCP.2019.20.8.2267
297. Gao X, Jia G, Guttman A, et al. Osteopontin Links Myeloid Activation and Disease Progression in Systemic Sclerosis. *Cell Reports Medicine*. 2020;1(8):100140. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100140
298. Labudzynski D, Shymanskyi I, Veliky M. Role of vitamin D3 in regulation of interleukin-6 and osteopontin expression in liver of diabetic mice. :4.
299. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
300. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J Immunol*. 2009;182(8):4499-4506. doi:10.4049/jimmunol.0802740
301. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 Promotes Tumor Progression by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*. 2007;67(9):4507-4513. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4174
302. Mao Y, Sarhan D, Steven A, Seliger B, Kiessling R, Lundqvist A. Inhibition of Tumor-Derived Prostaglandin-E2 Blocks the Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Recovers Natural Killer Cell Activity. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(15):4096-4106. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0635
303. Cătoi AF, Iancu M, Pârvu AE, et al. Relationship between 25 Hydroxyvitamin D, Overweight/Obesity Status, Pro-Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Simplified Empirical Path Model. *Nutrients*. 2021;13(8):2889. doi:10.3390/nu13082889
304. Vranić L, Mikolašević I, Milić S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Medicina*. 2019;55(9):541. doi:10.3390/medicina55090541
305. Walsh JS, Bowles S, Evans AL. Vitamin D in obesity: *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 2017;24(6):389-394. doi:10.1097/MED.0000000000000371
306. Janssen HCJP, Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJJ, van der Schouw YT. Determinants of vitamin D status in healthy men and women aged 40–80 years. *Maturitas*. 2013;74(1):79-83. doi:10.1016/j.maturitas.2012.10.008
307. Knight JA, Wong J, Blackmore KM, Raboud JM, Vieth R. Vitamin D association with estradiol and progesterone in young women. *Cancer Causes Control*. 2010;21(3):479-483. doi:10.1007/s10552-009-9466-0

308. Li J, Papadopoulos V, Vihma V. Steroid biosynthesis in adipose tissue. *Steroids*. 2015;103:89-104. doi:10.1016/j.steroids.2015.03.016
309. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2548-2556. doi:10.1210/jc.2004-0395
310. Pinti M, Appay V, Campisi J, et al. Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol*. 2016;46(10):2286-2301. doi:10.1002/eji.201546178
311. Min J, Jo H, Chung YJ, Song JY, Kim MJ, Kim MR. Vitamin D and the Immune System in Menopause: A Review. *J Menopausal Med*. 2021;27(3):109. doi:10.6118/jmm.21011
312. Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2000;117(1-3):57-68. doi:10.1016/S0047-6374(00)00137-8
313. Danon D, Kowatch MA, Roth GS. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(6):2018-2020. doi:10.1073/pnas.86.6.2018
314. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-Related Alterations in the Inflammatory Response to Dermal Injury. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(5):1027-1035. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01539.x
315. Rüttsche D, Michalak-Micka K, Zielinska D, et al. The Role of CD200–CD200 Receptor in Human Blood and Lymphatic Endothelial Cells in the Regulation of Skin Tissue Inflammation. *Cells*. 2022;11(6):1055. doi:10.3390/cells11061055
316. Koning N, van Eijk M, Pouwels W, et al. Expression of the Inhibitory CD200 Receptor Is Associated with Alternative Macrophage Activation. *J Innate Immun*. 2010;2(2):195-200. doi:10.1159/000252803
317. Weng L chun, Hou S hui, Lei S ting, Peng H yan, Li M qing, Zhao D. Estrogen-regulated CD200 inhibits macrophage phagocytosis in endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology*. 2020;138:103090. doi:10.1016/j.jri.2020.103090
318. Normal Reference Laboratory Values. *The New England Journal of Medicine*. Published online 2004:16.
319. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, et al. Inflammatory Monocyte Mobilization Decreases Patient Survival in Pancreatic Cancer: A Role for Targeting the CCL2/CCR2 Axis. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(13):3404-3415. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0525
320. Ge Z, Ding S. The Crosstalk Between Tumor-Associated Macrophages (TAMs) and Tumor Cells and the Corresponding Targeted Therapy. *Front Oncol*. 2020;10:590941. doi:10.3389/fonc.2020.590941
321. Rieger MA, Hoppe PS, Smejkal BM, Eitelhuber AC, Schroeder T. Hematopoietic Cytokines Can Instruct Lineage Choice. *Science*. 2009;325(5937):217-218. doi:10.1126/science.1171461
322. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303-7311. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7303

323. Way KJ, Dinh H, Keene MR, et al. The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;85(5):766-778. doi:10.1189/jlb.1108689
324. Bellora F, Castriconi R, Doni A, et al. M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages: Innate immunity. *Eur J Immunol*. 2012;42(6):1618-1626. doi:10.1002/eji.201142173
325. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):97-103. doi:10.1002/jlb.67.1.97
326. Hamilton TA, Zhao C, Pavicic PG, Datta S. Myeloid Colony-Stimulating Factors as Regulators of Macrophage Polarization. *Front Immunol*. 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00554
327. Krakow S, Crescimone ML, Bartels C, et al. Re-expression of CD14 in Response to a Combined IL-10/TLR Stimulus Defines Monocyte-Derived Cells With an Immunoregulatory Phenotype. *Front Immunol*. 2019;10:1484. doi:10.3389/fimmu.2019.01484
328. Schmittel A, Scheibenbogen C, Keilholz U. Lipopolysaccharide Effectively Up-Regulates B7-1 (CD80) Expression and Costimulatory Function of Human Monocytes. *Scand J Immunol*. 1995;42(6):701-704. doi:10.1111/j.1365-3083.1995.tb03714.x
329. Mir MA. Concept of Reverse Costimulation and Its Role in Diseases. In: *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases*. Elsevier; 2015:45-81. doi:10.1016/B978-0-12-802585-7.00002-9
330. Sochorová K, Budinský V, Rožková D, et al. Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) exert potent immunomodulatory effects on dendritic cells and inhibit induction of antigen-specific T cells. *Clinical Immunology*. 2009;133(1):69-77. doi:10.1016/j.clim.2009.06.011
331. Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, et al. Oral Administration of an Active Form of Vitamin D₃ (Calcitriol) Decreases Atherosclerosis in Mice by Inducing Regulatory T Cells and Immature Dendritic Cells With Tolerogenic Functions. *ATVB*. 2010;30(12):2495-2503. doi:10.1161/ATVBAHA.110.215459
332. Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, et al. Calcitriol analog ZK191784 ameliorates acute and chronic dextran sodium sulfate-induced colitis by modulation of intestinal dendritic cell numbers and phenotype. :9.
333. Kiss M, Caro AA, Raes G, Laoui D. Systemic Reprogramming of Monocytes in Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:1399. doi:10.3389/fonc.2020.01399
334. Ramos RN, Rodriguez C, Hubert M, et al. CD163⁺ tumor-associated macrophage accumulation in breast cancer patients reflects both local differentiation signals and systemic skewing of monocytes. *Clin Transl Immunol*. 2020;9(2). doi:10.1002/cti2.1108
335. Wang L, Simons DL, Lu X, et al. Breast cancer induces systemic immune changes on cytokine signaling in peripheral blood monocytes and lymphocytes. *EBioMedicine*. 2020;52:102631. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102631

-
336. Zhang XL, Guo YF, Song ZX, Zhou M. Vitamin D Prevents Podocyte Injury via Regulation of Macrophage M1/M2 Phenotype in Diabetic Nephropathy Rats. *Endocrinology*. 2014;155(12):4939-4950. doi:10.1210/en.2014-1020
337. Scott JF, Das LM, Ahsanuddin S, et al. Oral Vitamin D Rapidly Attenuates Inflammation from Sunburn: An Interventional Study. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(10):2078-2086. doi:10.1016/j.jid.2017.04.040
338. Wherry TLT, Dassanayake RP, Bannantine JP, Mooyottu S, Stabel JR. Vitamin D3 alters macrophage phenotype and endosomal trafficking markers in dairy cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:1021657. doi:10.3389/fcimb.2022.1021657
339. Milani C, Katayama MLH, de Lyra EC, et al. Transcriptional effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 physiological and supra-physiological concentrations in breast cancer organotypic culture. *BMC Cancer*. 2013;13(1):119. doi:10.1186/1471-2407-13-119

SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Białka powierzchniowe użyte w ramach niniejszej pracy do charakterystyki makrofagów oraz cząsteczki stymulujące do różnicowania w kierunku poszczególnych subpopulacji makrofagów. Opracowanie własne na podstawie [26]. (str. 17)

Rycina 2. Epidemiologia raka gruczołu sutkowego w Polsce. Dane zaczerpnięte ze strony Światowej Organizacji Zdrowia - bazy danych GLOBOCAN. (str.22)

Rycina 3. Schemat eksperymentu *in vivo*. (str.43)

Rycina 4. Schemat eksperymentu *ex vivo* z użyciem komórek szpikowych myszy BALB/c obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. (str.45)

Rycina 5. Schemat eksperymentu *ex vivo* z użyciem komórek szpikowych pochodzących od zdrowych myszy BALB/c. (str. 46)

Rycina 6. Schemat różnicowania monocytów z krwi obwodowej (MDMs) pacjentek do klas makrofagów M0, M1, M2a, M2c w obecności kalcytriolu stosowanego w stężeniach 1 nM, 10 nM oraz 100 nM.(str.48)

Rycina 7. Wpływ diety zróżnicowanej w poziomie witaminy D₃ oraz traktowania kalcytriolem na: A. masę ciała myszy BALB/c obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. D0- dzień wszczepienia komórek nowotworowych, D7- dzień rozpoczęcia traktowania kalcytriolem 1µg/kg masy ciała w grupach 1000 IU oraz 100 IU (odpowiednio 1000 IU + cal oraz 100 IU + cal); B. kinetykę wzrostu guza 4T1 u myszy BALB/c; C. obecność ognisk przerzutowych w płucach myszy BALB/c obarczonych rakiem 4T1- ocena makroskopowa. (str.58)

Rycina 8. Charakterystyka guzów 4T1 pochodzących od myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem pod kątem poziomu wybranych białek. (str.60)

Rycina 9. Analiza fenotypowa TAMs izolowanych z guzów 4T1 (A), 67NR (B) i E0771 (C). (str.63)

Rycina 10. Mapa cieplna wyników przedstawionych w Tabeli 9. (str.66)

Rycina 11. Analiza fenotypowa BMDMs różnicowanych czynnikiem M-CSF z komórek szpikowych myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1. (str.68)

Rycina 12. Przesiewowa analiza ekspresji mRNA genów w komórkach BMDMs pochodzących ze szpiku myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (BMDMs 4T1). (str. 73)

Rycina 13. Analiza obecności przerzutów w kościach myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. (str. 74)

Rycina 14. Ocena stymulowanego LPS (100 ng/mL - 24 h) poziomu wydzielania IL-23 (A, B) oraz IL-6 (C) przez komórki TAMs (n=4 izolacje; na jedną składał się materiał pochodzący od 3 myszy) oraz BMDMs (n= 3 myszy) izolowane z guzów oraz szpiku myszy BALB/c karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem, obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR (tylko TAMs). (str.75)

Rycina 15. Analiza fenotypowa BMDMs pochodzących od myszy zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem.(str.78)

Rycina 16. Analiza qPCR poziomu wybranych genów w BMDMs pochodzących od myszy BALB/c zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. (str.79)

Rycina 17. Analiza western blot wykonana z lizatów BMDMs pochodzących od myszy zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem. (str. 83)

Rycina 18. Poziom sekrecji IL-6 do medium przez komórki i BMDMs pochodzących od myszy zdrowych, karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem) różnicowane w obecności medium kondycjonowanego z nad komórek 4T1 (CM 4T1) oraz z nad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal) lub w obecności medium kontrolnego (KM). (str. 84)

Rycina 19. Charakterystyka linii komórkowych 4T1, 67NR i E0771 wykorzystanych w badaniach na zwierzętach, traktowanych *in vitro* przez 72 godziny kalcytriolem w stężeniu 100 nM. (str. 86)

Rycina 20. Wpływ kalcytriolu na poziom czynników zapalnych w komórkach linii 4T1. (str. 87)

Rycina 21. Schemat separacji i bramkowania makrofagów izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. (str.90)

Rycina 22. Ocena poziomu białek powierzchniowych TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. (str.93)

Rycina 23. Ocena poziomu białek powierzchniowych TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Podział ze względu na poziom metabolitu witaminy D₃ (25(OH)D₃) w osoczu. (str.94)

Rycina 24. Ocena poziomu białek powierzchniowych TAMs izolowanych z guzów pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Podział ze względu na obecność przerzutów w dole pachowym. (str. 95)

Rycina 25. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego Wyniki dla pacjentek z grupy pomenopauzalnej. (str.105)

Rycina 26. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego Wyniki dla pacjentek z grupy pomenopauzalnej. (str. 106)

Rycina 27. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Wyniki dla pacjentek z grupy przedmenopauzalnej. (str. 107)

Rycina 28. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z miejscowo zlokalizowanym rakiem gruczołu sutkowego. Wyniki dla pacjentek z grupy przedmenopauzalnej.(str. 108)

Rycina 29. Ocena poziomu białek powierzchniowych MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem w stadium rozsianym (n=11). (str.109)

Rycina 30. Odsetek populacji komórek CD14+CD163+ w grupach M0 oraz M2c MDMs pochodzących z krwi pacjentek: A. w rozsianym stadium nowotworu- (R), B. ze zlokalizowanym miejscowo rakiem- po menopauzie, C. ze zlokalizowanym miejscowo rakiem- przed menopauzą. D. Odsetek populacji komórek CD14+CD163+ w MDMs przedstawiony jako porównanie ww. grup klinicznych względem siebie w klasach makrofagów- M0 (D) oraz M2c (E). (str.111)

Tabela 1. Charakterystyka linii komórkowych użytych w eksperymentach *in vivo* oraz *in vitro*.(str.40)

Tabela 2. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji. (str.51)

Tabela 3. Lista użytych sond. (str.52)

Tabela 4. Skład żeli rozdzielających do elektroforezy białek. Podane w tabeli objętości roztworów dotyczą dwóch płytek o wymiarach 100×80×1mm. (str.54)

Tabela 5. Przeciwciała użyte do immunodetekcji białek.(str.55)

Tabela 6. Lista komercyjnych zestawów ELISA użytych do detekcji poszczególnych cząsteczek. (str.56)

Tabela 7. Spis przeciwciał użytych do analizy cytometrycznej. (str.57)

Tabela 8. Liczba monocytów we krwi obwodowej myszy (n=10-12) karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ oraz traktowanych kalcytriolem, zdrowych i obarczonych komórkami mysich raków gruczołu sutkowego. (str.59)

Tabela 9. Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA związanych z właściwościami pro- lub przeciwnowotworowymi makrofagów i mechanizmem działania witaminy D₃ w TAMs izolowanych z guzów 4T1 i 67NR. (str.64-65)

Tabela 10. Przesiewowa analiza ekspresji genów na poziomie mRNA związanych z właściwościami pro- lub przeciwnowotworowymi makrofagów i mechanizmem działania witaminy D₃ w BMDMs pochodzących ze szpiku myszy BALB/c obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR. (str.70-71)

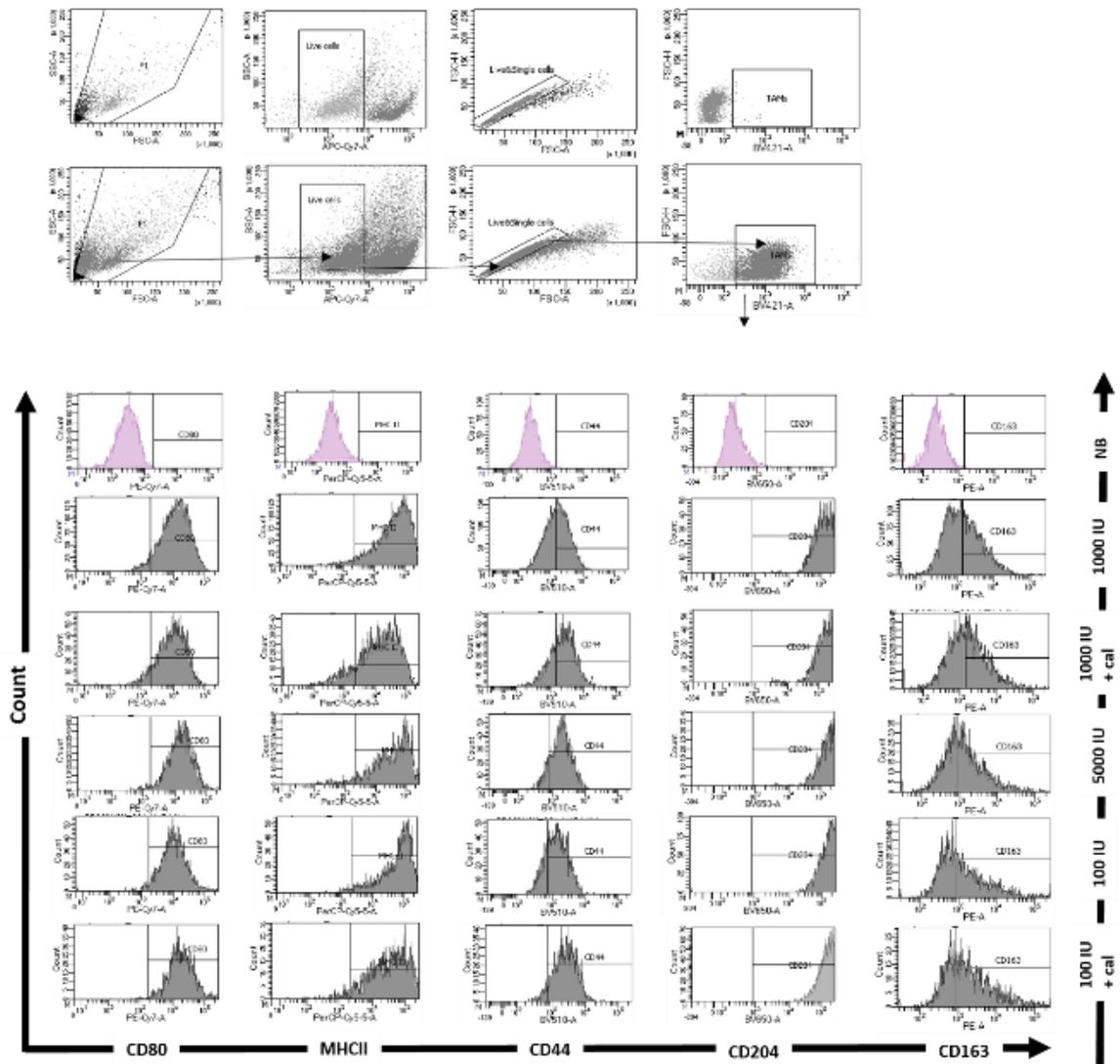
Tabela 11. Charakterystyka parametrów klinicznych pacjentek w poszczególnych grupach badanych. (str. 92)

Tabela 12. Charakterystyka parametrów klinicznych pacjentek w poszczególnych grupach badanych. (str. 97)

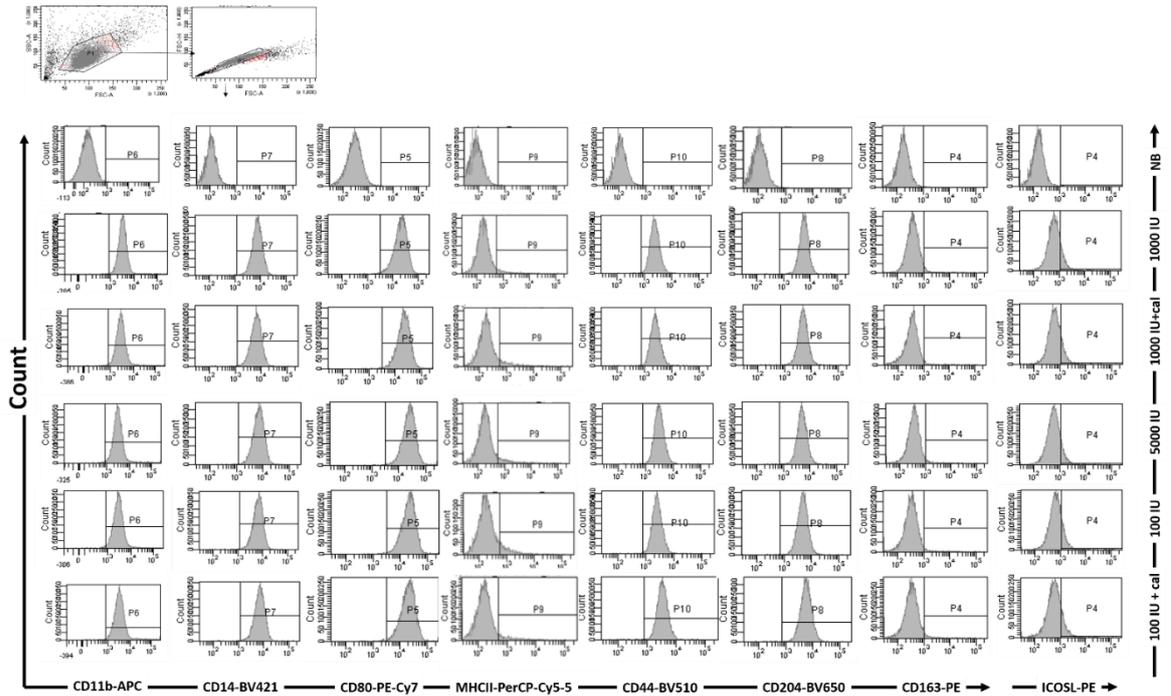
SUPPLEMENT

Tabela S-1. Lista genów badanych w przesiewowej analizie qPCR wykonanej na płytkach mikrofluidowych. Analizy mRNA TAMs oraz BMDMs pochodzących od myszy obciążonych rakiem 4T1 oraz 67NR.

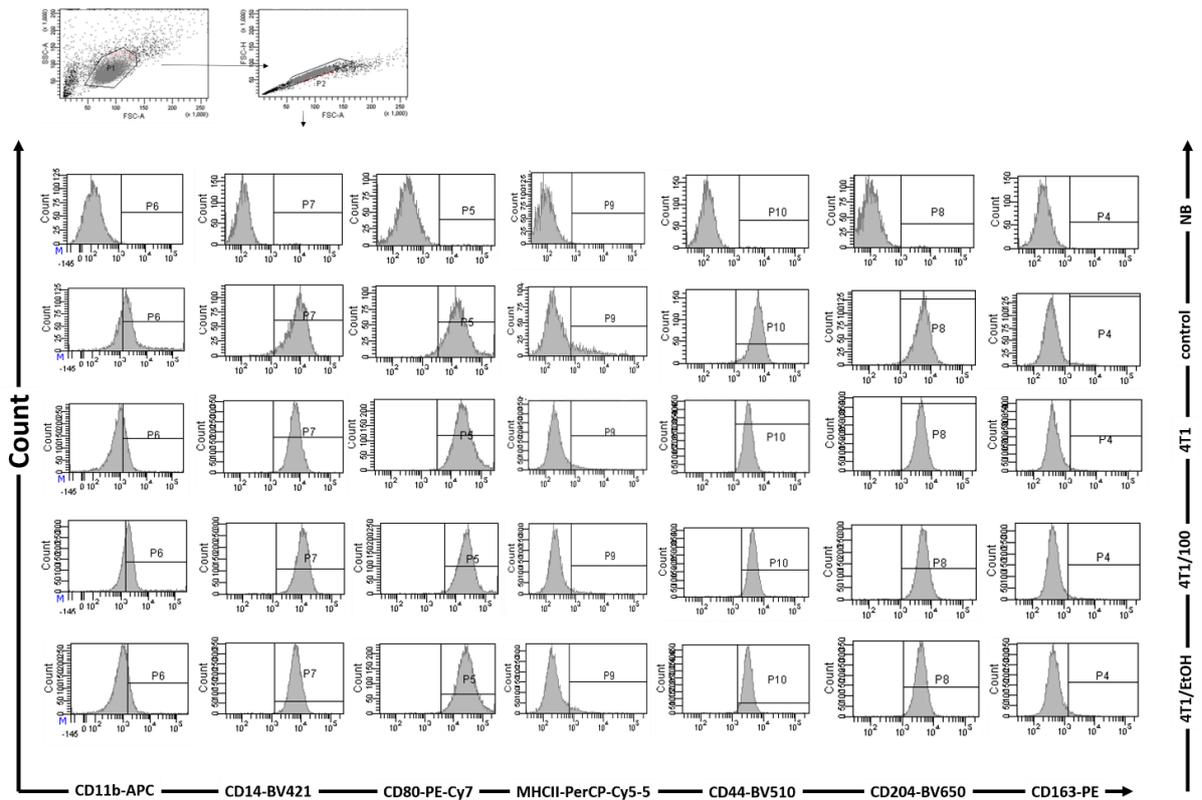
Symbol	Pełna nazwa	Symbol	Pełna nazwa
<i>Inos</i>	inducible nitric oxide synthase	<i>Il21b</i>	interleukin 12b
<i>Runx1</i>	runt-related transcription factor 1	<i>Il23a</i>	interleukin 23a
<i>Nf-κb</i>	nuclear factor kappaB	<i>Mmp1</i>	matrix metalloproteinase 1
<i>Irf8</i>	interferon regulatory factor 8	<i>Mmp2</i>	matrix metalloproteinase 2
<i>Irf3</i>	interferon regulatory factor 3	<i>Mmp7</i>	matrix metalloproteinase 7
<i>Irf4</i>	interferon regulatory factor 4	<i>Mmp9</i>	matrix metalloproteinase 9
<i>Irf5</i>	interferon regulatory factor 5	<i>Mmp14</i>	matrix metalloproteinase 14
<i>Tlr4</i>	Toll-like receptor 4	<i>Ptges</i>	prostaglandin E synthase
<i>Stat1</i>	signal transducer and activator of transcription 1	<i>Arg1</i>	arginase 1
<i>Stat3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	<i>Irak3</i>	interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK M)
<i>Stat6</i>	signal transducer and activator of transcription 6	<i>Hif1a</i>	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
<i>Ppar-γ</i>	peroxisome proliferator-activated receptor-gamma	<i>Ccl1</i>	chemokine (C-C motif) ligand 1
<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer-binding protein beta	<i>Spp1</i>	osteopontin
<i>Cox2</i>	cytochrome c oxidase II	<i>Vdr</i>	vitamin D receptor
<i>Mrc1</i>	macrophage mannose receptor c1	<i>Rxra</i>	retinoid X receptor alpha
<i>Ifnγ</i>	interferon - gamma	<i>Rara</i>	retinoic acid receptor alpha
<i>Myd88</i>	myeloid differentiation primary response gene88	<i>Cyp27b1</i>	cytochrome P450, family 27, subf. b, polypept. 1
<i>Trif</i>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β	<i>Cyp24a1</i>	cytochrome P450, family 24, subf. a, polypeptide 1
<i>Vegf</i>	vascular endothelial growth factor	<i>Cd86</i>	CD86 molecule
<i>Pdgf</i>	platelet derived growth factor	<i>Cd163</i>	CD163 antigen
<i>Hgf</i>	hepatocyte growth factor	<i>Fosl1</i>	fos-like antigen 1,
<i>Egf</i>	epidermal growth factor	<i>Ets2</i>	E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain secreted acidic cysteine rich glycoprotein; osteonectin
<i>Alox15</i>	arachidonate 15-lipoxygenase	<i>Sparc</i>	secreted acidic cysteine rich glycoprotein; osteonectin
<i>Clec10a</i>	C-type lectin domain containing 10A	<i>Gas6</i>	growth arrest specific 6
<i>Mgl2</i>	macrophage galactose-type C-type lectin 1/2	<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2 (basic)
<i fn1<="" i=""></i>	fibronectin 1	<i>Wnt5a</i>	wingless-type MMTV integration site family, 5A
<i>Tnfa</i>	tumor necrosis factor-alpha	<i>Wnt5b</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 5B
<i>Tgfb</i>	transforming growth factor beta	<i>Ccr2</i>	chemokine (C-C motif) receptor 2
<i>Il10</i>	interleukin 10	<i>Epcam</i>	EpCAM
<i>Il12</i>	interleukin 12a		



Rycina S-1. Schemat bramkowania komórek F4/80⁺ (TAMs) na przykładzie izolacji z guzów myszy BALB/c obciążonych rakiem 4T1 oraz reprezentatywne histogramy dla oznaczanych markerów powierzchniowych.



Rycina S-2. Reprezentatywne dot ploty bramkowania komórek oraz histogramy dla oznaczonych markerów powierzchniowych komórek BMDMs z hodowli *ex vivo* izolowanych ze szpiku myszy obciążonych rakiem 4T1.



Rycina S-3. Reprezentatywne dot ploty bramkowania komórek oraz histogramy dla oznaczonych markerów powierzchniowych komórek BMDMs izolowanych ze szpiku myszy kontrolnych (zdrowych) różnicowanych *ex vivo* w obecności medium kondycjonowanego znad komórek 4T1 (CM 4T1) oraz znad hodowli komórek 4T1 traktowanych przez 72h kalcytriolem w stężeniu 100 nM (CM 4T1 cal) lub kontrolą rozpuszczalnika (CM 4T1 EtOH).

Tabela S-2. Wartości *p* otrzymane z porównań pomiędzy poszczególnymi grupami traktowań kalcytrolem komórek MDMs (izolowanych z krwi pacjentek z zaawansowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego - po menopauzie, n=64) różnicowanych do klas makrofagów M1, M2a lub M2c względem grupy komórek wyjściowych M0 (A). (B) Grupa pacjentek z niskim poziomem 25(OH)D₃, (C) grupa pacjentek z prawidłowym poziomem 25(OH)D₃. Analiza statystyczna: test Fishera (LSD); **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001.

Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD200R	CD204	CD163
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość <i>p</i>							
M1	0	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0001	ns	ns
	1	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	0,0094	ns
	10	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001	0,0116	ns	0,016	ns
	100	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	0,04	ns
M2a	0	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	ns
	1	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	ns
	10	<0,0001	ns	<0,0001	0,0116	ns	<0,0001	ns	ns
	100	0,0005	ns	<0,0001	ns	ns	0,0026	ns	ns
M2c	0	ns	<0,0001	ns	ns	0,0005	ns	ns	<0,0001
	1	ns	<0,0001	ns	ns	0,0228	ns	ns	<0,0001
	10	0,0221	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001
	100	ns	0,0043	ns	ns	ns	ns	ns	0,0056

Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD200R	CD204	CD163
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość <i>p</i>							
M1	0	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	0,0323	ns	ns	ns
	1	<0,0001	0,0434	<0,0001	<0,0001	ns	ns	0,0484	ns
	10	<0,0001	0,0059	<0,0001	<0,0001	0,0287	ns	0,0029	ns
	100	ns	0,0343	0,0134	<0,0001	ns	ns	ns	ns
M2a	0	0,0007	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	ns
	1	ns	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	ns
	10	<0,0001	ns	<0,0001	0,0164	ns	0,0003	ns	ns
	100	ns	ns	0,0005	ns	ns	0,0049	ns	ns
M2c	0	ns	0,0004	ns	ns	0,0104	ns	ns	<0,0001
	1	0,0427	0,0163	ns	ns	ns	ns	ns	0,0006
	10	0,0057	0,0033	ns	ns	0,0059	ns	ns	0,0035
	100	ns	0,0200	ns	ns	ns	ns	ns	0,0086

Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD204	CD163	
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość <i>p</i>							
M1	0 nM	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	
	1 nM	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0155	ns	
	10 nM	<0,0001	0,0021	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	
	100 nM	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0101	ns	
M2a	0 nM	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns	
	1 nM	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns	
	10 nM	<0,0001	ns	<0,0001	0,0297	ns	ns	ns	
	100 nM	<0,0001	ns	<0,0001	0,0435	ns	ns	ns	
M2c	0 nM	ns	<0,0001	ns	ns	0,0065	ns	<0,0001	
	1 nM	ns	<0,0001	ns	ns	0,0345	ns	<0,0001	
	10 nM	0,0197	<0,0001	ns	ns	0,0007	ns	0,0002	
	100 nM	ns	0,0131	ns	ns	ns	ns	0,0124	

Tabela S-3. Wartości p otrzymane z porównań pomiędzy poszczególnymi grupami traktowań kalcytrolem komórek MDMs (izolowanych z krwi pacjentek z zaawansowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego przed menopauzą, $n=26$) różnicowanych do klas makrofagów M1, M2a lub M2c względem grupy komórek wyjściowych M0 (A). (B) Grupa pacjentek z niskim poziomem $25(OH)D_3$, (C) grupa pacjentek z prawidłowym poziomem $25(OH)D_3$. Analiza statystyczna: test Fishera (LSD), * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

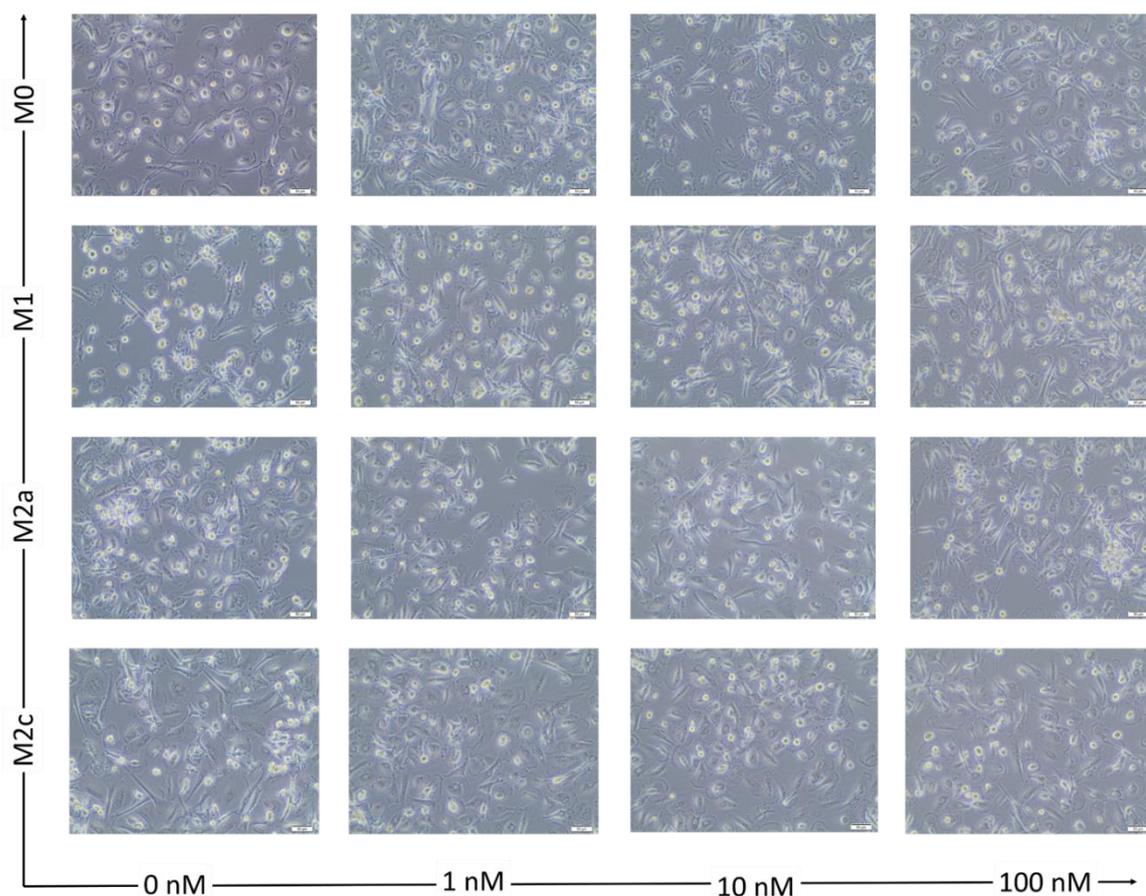
Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD200R	CD204	CD163
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość p							
M1	0	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	ns
	1	<0,0001	ns	<0,0001	0,0004	ns	ns	ns	ns
	10	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0116	ns	ns	ns
	100	0,0301	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M2a	0	0,0012	ns	<0,0001	ns	ns	0,0004	ns	ns
	1	0,0007	ns	0,0003	ns	ns	ns	ns	ns
	10	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns
	100	0,0003	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M2c	0	ns	0,0005	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001
	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,0224
	10	ns	0,0014	ns	ns	0,0200	ns	ns	0,0164
	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD200R	CD204	CD163
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość p							
M1	0	<0,0001	ns	<0,0001	0,0007	ns	ns	ns	ns
	1	0,0002	ns	<0,0001	0,0016	ns	ns	ns	ns
	10	<0,0001	0,0013	<0,0001	0,0014	ns	ns	ns	ns
	100	0,0399	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M2a	0	0,0099	ns	<0,0001	ns	ns	0,0050	ns	ns
	1	0,0727	ns	0,0017	ns	ns	ns	ns	ns
	10	0,0006	ns	0,0013	ns	ns	ns	ns	ns
	100	0,0023	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M2c	0	ns	0,0009	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001
	1	ns	0,0218	ns	ns	ns	ns	ns	0,0067
	10	ns	0,0116	ns	ns	0,0038	ns	ns	0,0163
	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,0417

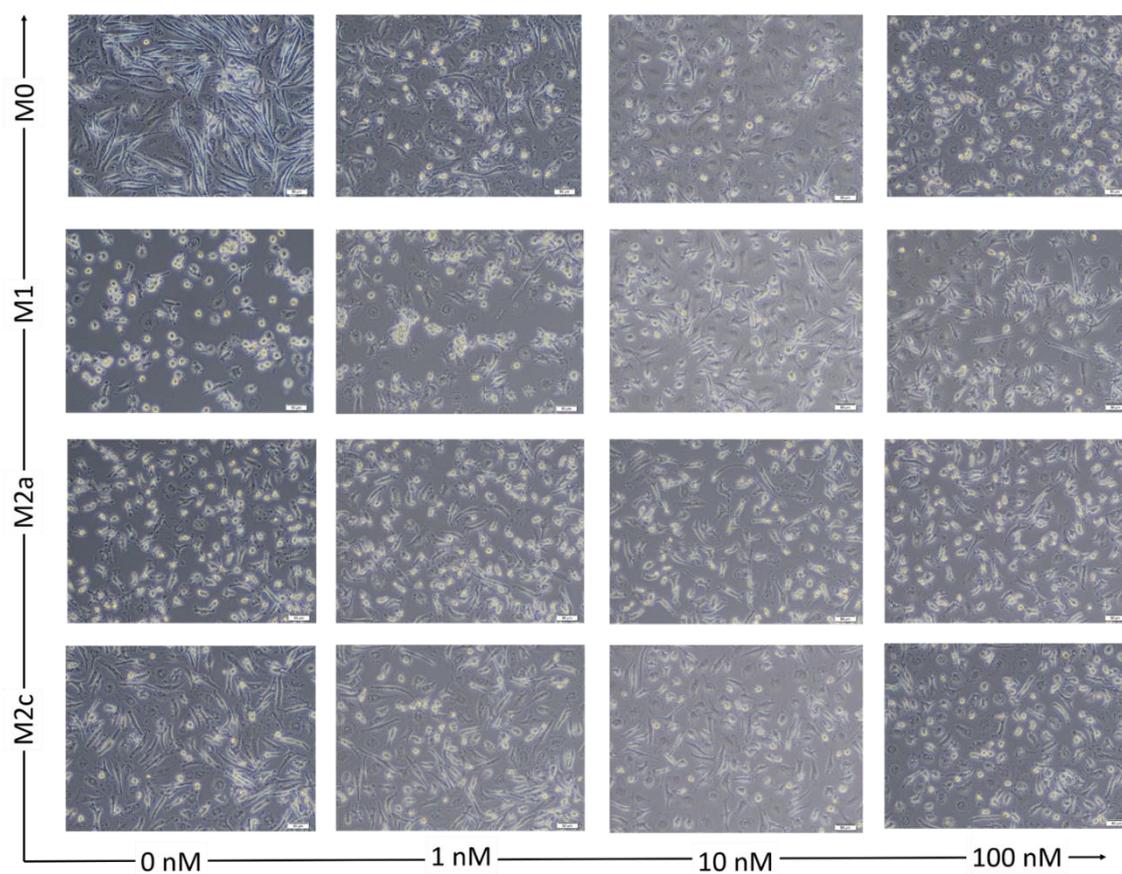
Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD200R	CD204	CD163
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość p							
M1	0	0,0010	ns	<0,0001	0,0006	0,0309	ns	ns	ns
	1	0,0017	ns	<0,0001	0,0053	ns	ns	ns	ns
	10	0,0037	0,0061	<0,0001	<0,0001	ns	ns	0,0060	ns
	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M2a	0	0,0084	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	ns
	1	0,0048	ns	0,0019	ns	ns	ns	ns	ns
	10	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns
	100	0,0126	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
M2c	0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	10	ns	0,0074	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabela S-4. Wartości p otrzymane z porównań pomiędzy poszczególnymi grupami traktowań kalcytrolem komórek MDMs (izolowanych z krwi pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego w stadium rozsiałym, $n=11$) różnicowanych do klas makrofagów M1, M2a lub M2c względem grupy komórek wyjściowych M0. Analiza statystyczna: test Fishera (LSD), * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

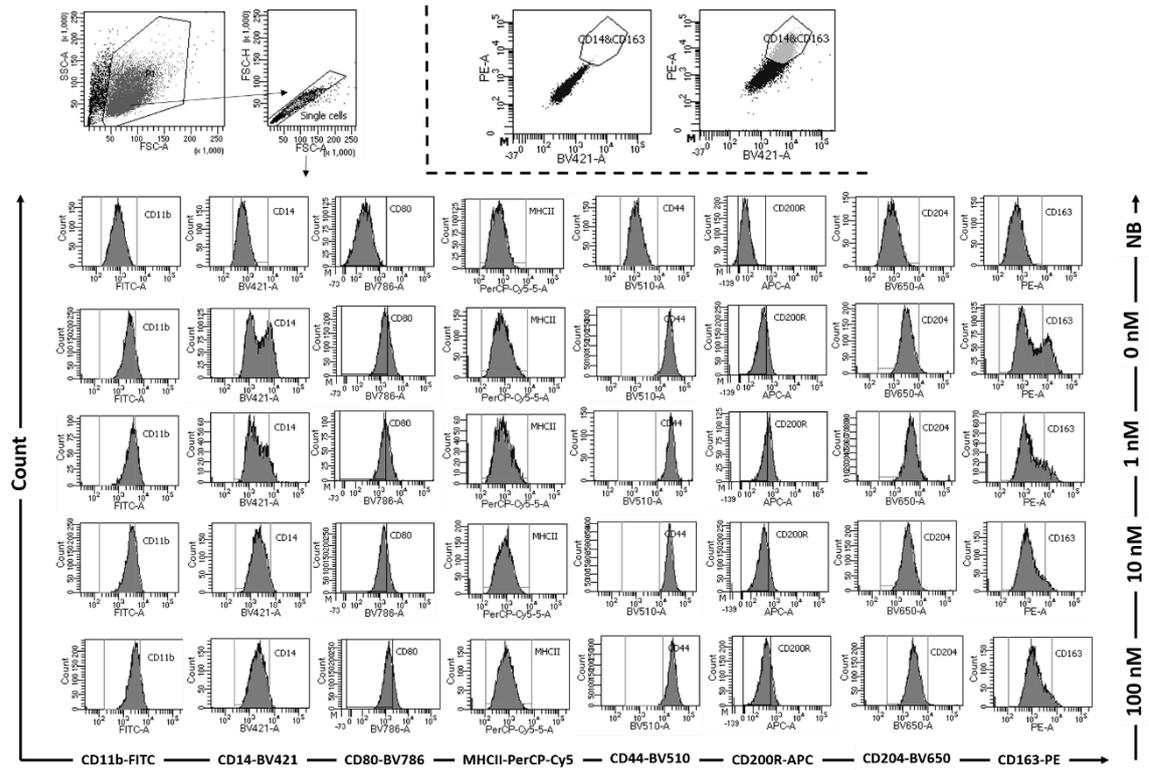
Marker		CD11b	CD14	MHCII	CD80	CD44	CD204	CD163
Grupa MDM	Cal [nM]	wartość p						
M1	0 nM	<0,0001	ns	0,0013	<0,0001	ns	ns	ns
	1 nM	<0,0001	ns	0,0027	<0,0001	ns	ns	ns
	10 nM	<0,0001	ns	0,0159	<0,0001	ns	ns	ns
	100 nM	0,0059	ns	0,0258	<0,0001	ns	ns	ns
M2a	0 nM	0,0002	ns	0,0003	ns	ns	ns	ns
	1 nM	0,0001	0,0468	0,0328	ns	ns	ns	ns
	10 nM	<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	100 nM	<0,0001	ns	0,0377	ns	ns	ns	ns
M2c	0 nM	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns	<0,0001
	1 nM	ns	0,0088	ns	ns	ns	ns	0,0115
	10 nM	0,0148	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	100 nM	ns	0,0149	ns	ns	ns	ns	ns



Rycina S-4. Reprezentatywne zdjęcia hodowli komórek MDMs izolowanych z krwi pacjentek z miejscowo zaawansowanym rakiem gruczołu sutkowego różnicowanych bez lub w obecności kalcytroliu w stężeniach 1 nM, 10 nM, 100 nM do klas makrofagów M0, M1 oraz M2a i M2c- dzień 10 hodowli (przed stymulacją 100 ng/mL LPS, 24 h). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu Olympus CKX41 (Olympus Europa Holding GMBH, Hamburg, Niemcy), długość paska skali: 50 µm.



Rycina S-5. Reprezentatywne zdjęcia hodowli komórek MDMs (izolowanych z krwi pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego w stadium rozsiały) różnicowanych bez lub w obecności kalcetriolu w stężeniach 1 nM, 10 nM, 100 nM do klas makrofagów M0, M1 oraz M2a i M2c - dzień 10 hodowli (przed stymulacją 100 ng/mL LPS, 24h). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu Olympus CKX41 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Niemcy), długość paska skali: 50 µm.



Rycina S-6. Schemat bramkowania MDMs izolowanych z krwi obwodowej pacjentki z grupy z zaawansowanym miejscowo rakiem gruczołu sutkowego na przykładzie komórek różnicowanych do klasy makrofagów M2c. NB-komórki nieznakowane; 0 nM- różnicowane bez obecności kalcytriolu; 1 nM, 10 nM, 100 nM- stężenie kalcytriolu stosowane podczas procesu polaryzacji do makrofagów M2c.