

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA  
HIRSZFELDA WE WROCŁAWIU

POLSKA AKADEMIA NAUK

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Natalia Łabędź

WPŁYW WITAMINY D<sub>3</sub> NA FIBROBLASTY  
TOWARZYSZĄCE NOWOTWOROM GRUCZOŁU  
SUTKOWEGO

PROMOTORZY:

prof. dr hab. Joanna Wietrzyk

prof. dr hab. Rafał Matkowski

Praca zrealizowana w  
Laboratorium Doświadczalnej Terapii  
Przeciwnowotworowej

Wrocław 2022

*Chciałabym złożyć serdeczne podziękowania:*

*Pani promotor, **profesor Joannie Wietrzyk** za możliwość realizacji badań w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, za wsparcie zarówno w procesie planowania, realizacji eksperymentów jak i dyskusji uzyskanych wyników, za cierpliwość, wyrozumiałość i poświęcony czas.*

*Panu promotorowi, **profesorowi Rafałowi Matkowskiemu** za możliwość realizacji badań we współpracy z Dolnośląskim Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii, za nieocenioną pomoc w opisywaniu i dyskusji wyników w ramach niniejszej rozprawy.*

***Koleżankom i Kolegom** z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej za pomoc, życzliwość i wspaniałe towarzystwo.  
W szczególności chciałabym podziękować:*

***Martynie Stachowicz-Suhs, Arturowi Anisiewiczowi i Joannie Banach** za fantastyczną współpracę w ramach realizowanego projektu, za wsparcie, motywację i ciepłe słowa,*

***Beacie Filip-Psurskiej** za wsparcie podczas realizacji eksperymentów i pisaniu rozprawy doktorskiej,*

***Dagmarze Kłopotowskiej, Annie Nasulewicz-Goldeman** za pomoc w planowaniu eksperymentów i opisywaniu wyników.*

***Moim bliskim** za cierpliwość, wyrozumiałość, wiarę we mnie i ciepłe słowa w chwilach wątplenia.*



## NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki pt. „Wpływ witaminy D na makrofagi i fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu piersiowego” 2017/27/B/NZ5/01167

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 Nov;12(11):3416.

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 D<sub>3</sub> Is Dependent on Tumor Type—Studies on Mouse Mammary Gland Cancer. *Cancers*. 2022 Jan;14(19):4585

**SPIS TREŚCI**

SPIS TREŚCI.....	4
STRESZCZENIE.....	10
SUMMARY.....	11
WYKAZ SKRÓTÓW.....	12
WSTĘP.....	15
1. Charakterystyka nowotworów gruczołu sutkowego.....	15
2. Rola witaminy D <sub>3</sub> w organizmie.....	17
2.1. Plejotropowe działanie witaminy D <sub>3</sub> .....	19
3. Witamina D <sub>3</sub> i nowotwory gruczołu sutkowego.....	20
4. Mikrośrodowisko nowotworowe.....	27
4.1. Fibroblasty towarzyszące nowotworom.....	27
4.1.1. Fibroblasty zdrowych tkanek.....	28
4.1.2. Fibroblasty towarzyszące nowotworom, ich definicja i markery.....	29
4.1.3. Pochodzenie fibroblastów towarzyszących nowotworom.....	30
4.1.4. Funkcje fibroblastów towarzyszących nowotworom w rakach gruczołu sutkowego.....	31
5. Wpływ witaminy D <sub>3</sub> na fibroblasty.....	35
6. Wpływ witaminy D <sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom.....	37
ZAŁOŻENIE I CELE PRACY.....	41
MATERIAŁY I METODY.....	42
7. Odczynniki.....	42
8. Linie komórkowe.....	43
9. Zwierzęta doświadczalne.....	45
10. METODY.....	46
10.1. BADANIA NA MATERIALE POCHODZĄCYM OD MYSZY.....	46
10.1.1. Badania <i>in vivo</i> .....	46



10.1.1.1. Analiza poziomu wybranych białek w lizatach z guzów za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA .....	47
10.1.1.1.1. Przygotowanie lizatów z guzów .....	47
10.1.1.1.2. Testy ELISA .....	47
10.1.1.2. Izolacja fibroblastów z tkanek .....	48
10.1.1.2.1. CAFs .....	48
10.1.1.2.1.1. Separacja magnetyczna .....	49
10.1.1.2.1.2. Fibroblasty płuc .....	49
10.1.1.3. Analiza fenotypu CAFs i NFs myszy obciążonych nowotworami za pomocą cytometrii przepływownej.....	50
10.1.2. Badania <i>ex vivo</i> .....	52
10.1.2.1. Stymulacja NFs za pomocą TGFβ1 i mediów kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek nowotworowych .....	52
10.1.2.1.1. Przygotowanie mediów kondycjonowanych .....	52
10.1.2.1.2. Hodowla i stymulacja NFs .....	52
10.1.2.1.3. Analiza fenotypu NFs za pomocą cytometrii przepływownej....	53
10.1.2.1.4. Analiza poziomu białek VDR i FAP metodą immunofluorescencji .....	53
10.1.2.1.5. Analiza ekspresji mRNA za pomocą real-time PCR.....	54
10.1.2.1.5.1. Izolacja RNA.....	54
10.1.2.1.5.2. Synteza cDNA.....	55
10.1.2.1.5.3. Real-time PCR .....	55
10.1.3. Badania <i>in vitro</i> .....	57
10.1.3.1. Badanie wpływu NFs stymulowanych TGFβ1 na proliferację komórek nowotworowych i ich potencjał do tworzenia kolonii.....	57
10.1.3.1.1. Przygotowanie medium kondycjonowanego (CM) z fibroblastów .....	57
10.1.3.1.2. Ocena wpływu medium kondycjonowanego z NFs na proliferację komórek nowotworowych metodą SRB .....	57

---

10.1.3.1.3. Ocena wpływu medium kondycjonowanego z nad NFs na potencjał do tworzenia kolonii przez komórki nowotworowe .....	58
10.2. BADANIA NA MATERIALE POCHODZĄCYM OD PACJENEK ....	59
10.2.1. Analiza poziomu wybranych białek w lizatach z guzów za pomocą techniki Western-blot .....	60
10.2.1.1. Przygotowanie lizatów z guzów.....	60
10.2.1.2. Western-blot.....	60
10.2.2. Izolacja CAFs z tkanki guza .....	62
10.2.2.1. Separacja magnetyczna .....	62
10.2.2.2. Ocena czystości separacji za pomocą cytometrii przepływowej ....	64
10.2.3. Badania <i>ex vivo</i> .....	65
10.2.3.1. Pasażowanie CAFs.....	65
10.2.3.2. Ocena ekspresji wimentyny w CAFs za pomocą metody immunofluorescencji .....	65
10.2.3.3. Badanie wrażliwości CAFs na kalcytriol metodą SRB.....	65
10.2.3.4. Krótkoterminowe hodowle CAFs z kalcytriolem .....	66
10.2.3.5. Analiza fenotypu CAFs stymulowanych kalcytriolem .....	66
10.2.3.6. Analiza poziomu białek VDR i FAP w CAFs za pomocą metody immunofluorescencji .....	67
10.2.3.7. Analiza ekspresji mRNA za pomocą real-time PCR .....	67
10.2.3.7.1. Izolacja RNA .....	67
10.2.3.7.2. Synteza cDNA .....	68
10.2.3.7.3. Przesiewowy real-time PCR na płytkach mikrofluidowych.....	68
10.2.3.7.4. Real-time PCR dla wybranych genów.....	70
10.2.3.8. Analiza poziomu produkowanych białek w supernatantach z nad hodowli za pomocą testów ELISA .....	70
10.2.3.9. Analiza poziomu wybranych białek w lizatach komórkowych za pomocą techniki Western-blot.....	71

---

10.2.3.9.1. Przygotowanie lizatów.....	71
10.2.3.9.2. Western-blot .....	71
10.2.3.10. Analiza aktywności żelatynaz metodą zymografii żelatynowej ...	72
10.2.3.10.1. Przygotowanie lizatów i zebranie supernatantów.....	72
10.2.3.11. Zymografia żelatynowa.....	72
10.2.4. Badania <i>in vitro</i> .....	74
10.2.4.1. Badanie wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na właściwości komórek raka gruczołu sutkowego .....	74
10.2.4.1.1. Przygotowanie medium kondycjonowanego znad CAFs stymulowanych kalcytriolem .....	74
10.2.4.1.2. Test migracji komórek nowotworowych w obecności medium kondycjonowanego znad CAFs.....	74
10.2.4.1.3. Stymulacja komórek linii MDA-MB-231 i MCF-7 medium kondycjonowanym znad CAFs .....	75
10.2.4.1.4. Analiza poziomu ekspresji wybranych białek techniką Western-blot w lizatach komórkowych .....	75
10.2.4.1.4.1. Przygotowanie lizatów .....	75
10.2.4.1.4.2. Western-blot.....	75
11. Analiza statystyczna wyników .....	76
WYNIKI .....	77
12. Wpływ witaminy D <sub>3</sub> na mysie CAFs i NFs .....	77
12.1. Badania <i>in vivo</i> .....	77
12.1.1. Porównanie poziomu wybranych białek w tkankach guzów pochodzących od myszy obciążonych mysimi rakami gruczołu sutkowego.....	79
12.1.2. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy i doustnych podań kalcytriolu na poziom wybranych białek w mysich guzach ..	80
12.1.3. Charakterystyka CAFs i NFs pochodzących od myszy obciążonych mysimi rakami gruczołu sutkowego – porównanie zastosowanych modeli badawczych .....	82

12.1.3.1. Charakterystyka CAFs w guzach mysich raków gruczołu sutkowego.....	82
12.1.3.2. Charakterystyka NFs w płucach myszy obciążonych rakami gruczołu sutkowego.....	83
12.1.4. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na poziom białek specyficznych dla CAFs raka gruczołu sutkowego.....	85
12.1.5. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w NFs płuc myszy obciążonych komórkami mysich raków gruczołu sutkowego .....	86
12.2. Badania <i>ex vivo</i> .....	88
12.2.1. Porównanie poziomu wybranych białek NFs płuc między szczepami zdrowych myszy C57BL/6 i BALB/c .....	88
12.2.2. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w NFs płuc zdrowych myszy szczepów C57BL/6 i BALB/c.....	89
12.2.3. Wpływ zróżnicowanego poziomu witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na proces aktywacji NFs – ocena poziomu wybranych białek .....	90
12.2.4. Ocena wpływu zróżnicowanej zawartości witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy oraz doustnego podawania kalcytriolu na poziom VDR i FAP w NFs stymulowanych TGFβ1 i mediami z nacieków komórek nowotworowych .....	92
12.2.5. Ocena wpływu zróżnicowanej zawartości witaminy D <sub>3</sub> w diecie myszy oraz doustnego podawania kalcytriolu na ekspresję wybranych mRNA w NFs stymulowanych TGFβ1 i mediami z nacieków komórek nowotworowych .....	96
12.3. Badania <i>in vitro</i> .....	99
12.3.1. Ocena wpływu NFs stymulowanych TGFβ1 na proliferację komórek nowotworowych .....	99
12.3.2. Ocena wpływu NFs stymulowanych TGFβ1 na tworzenie kolonii przez komórki nowotworowe .....	100
13. Wpływ witaminy D <sub>3</sub> na ludzkie CAFs – pochodzące z guzów pacjentek .....	102

---

13.1.	Porównanie poziomu wybranych białek w tkankach guzów pochodzących od pacjentek z różnych grup klinicznych .....	104
13.2.	Ocena czystości izolacji CAFs .....	105
13.3.	Ocena ekspresji wimentyny w CAFs.....	105
13.4.	Ocena fenotypu świeżo wyizolowanych CAFs .....	105
13.5.	Badania <i>ex vivo</i> .....	108
13.5.1.	Ocena wrażliwości CAFs na kalcytriol.....	108
13.5.2.	Ocena wpływu kalcytriolu na poziom białek specyficznych dla CAFs.....	109
13.5.3.	Ocena wpływu kalcytriolu na poziom VDR i FAP.....	110
13.5.4.	Ocena wpływu kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów... 111	
13.5.4.1.	Macierz ekspresji mRNA.....	111
13.5.4.2.	Ocena ekspresji mRNA wybranych genów .....	112
13.5.5.	Ocena wpływu kalcytriolu na poziom wydzielanych białek przez fibroblasty towarzyszące nowotworom.....	114
13.5.6.	Ocena wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek w CAFs.....	116
13.5.7.	Ocena wpływu kalcytriolu na aktywność żelatynaz w CAFs .....	118
13.6.	Badania <i>in vitro</i> .....	120
13.6.1.	Ocena wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na migrację komórek nowotworowych .....	120
13.6.2.	Ocena wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na ekspresję wybranych białek w komórkach nowotworowych.....	122
	PODSUMOWANIE WYNIKÓW .....	126
	DYSKUSJA.....	132
	WNIOSKI .....	153
	BIBLIOGRAFIA .....	155
	SPIS RYCIN I TABEL.....	180
	ZAŁĄCZNIK DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	186

## STRESZCZENIE

Witamina D<sub>3</sub> odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji komórek nowotworowych w procesach wzrostu, progresji i przerzutowania raka gruczołu sutkowego. Ma ona również duże znaczenie w modulacji aktywności fibroblastów towarzyszących procesom włóknienia. Mimo to rola witaminy D<sub>3</sub> w modulacji funkcji fibroblastów towarzyszących nowotworom (CAFs) gruczołu sutkowego nie została do tej pory dokładnie wyjaśniona.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie wpływu witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego. Aby zrealizować ten cel, wykorzystano: 1) myszy zdrowe oraz obarczone dobrze scharakteryzowanymi komórkami mysich raków gruczołu sutkowego (4T1, 67NR, E0771), karmione dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i otrzymujące doustnie kalcytriol oraz 2) CAFs stymulowane kalcytriolem wyizolowane z tkanek guzów pacjentek o zróżnicowanym poziomie 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu.

Karmienie myszy obarczonych guzami 4T1 dietą bogatą w witaminę D<sub>3</sub>, czego rezultatem był wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu, prowadziło do rozwoju fibroblastów płuc (NFs) o cechach świadczących o ich obniżonej aktywacji (niskie poziomy αSMA, PDGFRβ i TNC) w miejscu przerzutowania raka gruczołu sutkowego. Z kolei deficyt witaminy D<sub>3</sub> wraz z podawaniem kalcytriolu myszom obarczonym 4T1 zwiększał aktywację NFs w miejscu przerzutowania (wzrost poziomu αSMA, PDPN i TNC). Z drugiej strony, zarówno wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu, jak i podawanie kalcytriolu myszom, u których rozwinął się rak gruczołu sutkowego E0771 skutkowały rozwojem CAFs o tym samym fenotypie (PDPN<sup>+</sup>, TNC<sup>+</sup>). Zwiększony poziom PDPN i TNC świadczył o zwiększonej aktywacji i właściwościach pronowotworowych – promocji immunosupresji i procesów zaangażowanych w przerzutowanie. W przypadku CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> stymulacja *ex vivo* kalcytriolem wywarła przeważający efekt przeciwnowotworowy, zarówno w kontekście fenotypu CAFs świadczącego o ich zaangażowaniu w promowanie stanu immunosupresji, jak i promocji przerzutowania (obniżenie poziomu CCL2, TNC, IDO1 i MMPs). Podobny efekt zaobserwowano również poprzez obniżenie poziomu OPN i ZEB1 w komórkach potrójnie ujemnego raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231 stymulowanych medium znad CAFs inkubowanych z kalcytriolem.

Dieta bogata w witaminę D<sub>3</sub>, traktowanie/stymulacja kalcytriolem *in vivo* lub *ex vivo* mogą wywierać zarówno przeciw-, jak i pronowotworowe działanie w kontekście CAFs. Biorąc pod uwagę ten niejednoznaczny wpływ witaminy D<sub>3</sub> i kalcytriolu, niezbędne są dalsze badania, które pozwolą jednoznacznie rozstrzygnąć zasadność suplementacji witaminą D<sub>3</sub> w różnych podtypach raka gruczołu sutkowego.

## SUMMARY

Vitamin D<sub>3</sub> plays an important role in modulation of cancer cells by regulating the growth, progression or metastasis of breast cancer. Vitamin D<sub>3</sub> is also crucial in modulation of fibroblasts in fibrosis. However, the effect of vitamin D<sub>3</sub> on breast cancer associated fibroblasts (CAFs) has not been elucidated.

The aim of this study was to investigate the influence of vitamin D<sub>3</sub> on breast cancer associated fibroblasts. To achieve this goal, the following approaches were used: 1) healthy mice and mice bearing well-characterized breast tumors (4T1, 67NR, and E0771) were fed with vitamin D<sub>3</sub>-normal, -deficient or -supplemented diet and treated with calcitriol, or 2) breast CAFs, isolated from tumor tissues from female patients with different plasma vitamin D<sub>3</sub> levels were stimulated with calcitriol *ex vivo*.

Vitamin D<sub>3</sub>-supplemented diet which led to high vitamin D<sub>3</sub> metabolite plasma level, resulted in the development of lung fibroblasts (NFs) at the metastatic site of 4T1 tumor with reduced activation features (low level of  $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$ , TNC). On the other hand, 4T1-bearing mice deficient in vitamin D<sub>3</sub> and treated with calcitriol developed activated NFs at the metastatic site (increase in  $\alpha$ SMA, PDPN and TNC levels). Moreover, in mice with E0771 tumors, high plasma vitamin D<sub>3</sub> metabolite levels and calcitriol administration triggered the development of CAFs with the same phenotype (PDPN+, TNC+). The increase in PDPN and TNC could be associated with enhanced activation and pro-tumoral properties in CAFs in the context of immunosuppression and promotion of metastasis. In CAFs derived from patients with vitamin D<sub>3</sub> deficiency, stimulation with calcitriol resulted in predominant anticancer effects, both in terms of immunosuppression and promotion of metastasis by CAFs (decrease in levels of CCL2, TNC, IDO1, and MMPs). A similar effect was observed when triple negative breast cancer cells (MDA-MB-231) were treated with the medium from calcitriol-stimulated CAFs (decrease in OPN and ZEB1 levels).

Vitamin D<sub>3</sub>-rich diet, calcitriol treatment *in vivo*, or calcitriol stimulation *ex vivo* may lead to anti- and pro-tumoral CAFs activity. Considering the inconclusive effects of vitamin D<sub>3</sub> or calcitriol, further studies are needed to clearly establish the validity of vitamin D<sub>3</sub> supplementation in various types of breast cancer.

## WYKAZ SKRÓTÓW

ACTA2	ang. <i>Alpha-actin 2</i> – alfa-aktyna 2
$\alpha$ SMA	ang. <i>Alpha-smooth muscle actin</i> – alfa-aktyna mięśni gładkich
CAFs	ang. <i>Cancer associated fibroblasts</i> – fibroblasty towarzyszące nowotworom
CAV1	ang. <i>Caveolin-1</i> – kaweolina 1
CCL2	ang. <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> – ligand chemokiny motywu C-C 2
CD	ang. <i>Cluster of differentiation</i> – antygen różnicowania komórkowego
CDK	ang. <i>Cyclin dependent kinase</i> – kinaza zależna od cyklin
CDKN1A	ang. <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> – inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1A
CDKN2A	ang. <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> – inhibitor kinaz zależnych od cyklin 2A
CTGF	ang. <i>Connective tissue growth factor</i> – czynnik wzrostu tkanki łącznej
CSCs	ang. <i>Cancer stem cells</i> – macierzyste komórki nowotworowe
CXCL12	ang. <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> – ligand chemokiny motywu C-X-C 12
CXCR	ang. <i>CXC chemokine receptor</i> – receptor chemokin motywu C-X-C
CYP24A1	ang. <i>Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i> – polipeptyd 1 podrodziny A rodziny 24 cytochromu P450
CYP27B1	ang. <i>Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1</i> – polipeptyd 1 podrodziny B rodziny 27 cytochromu P450
CYR61	ang. <i>Cysteine rich angiogenic inducer 61</i> – angiogeny induktor bogaty w cysteinę 61
ECM	ang. <i>Extracellular matrix</i> – macierz zewnątrzkomórkowa
EMT	ang. <i>Epithelial to mesenchymal transition</i> – przejście nabłonkowo-mezenchymalne
EndMT	ang. <i>Endothelial to mesenchymal transition</i> – przejście śródbłonkowo-mezenchymalne
EpCAM	ang. <i>Epithelial cell adhesion molecule</i> – cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych
ER	ang. <i>Estrogen receptor</i> – receptor estrogenowy
Erk	ang. <i>Mitogen activated kinases</i> – kinazy aktywowane mitogenami
FAP	ang. <i>Fibroblast activation protein</i> – białko aktywacji fibroblastów
FGF	ang. <i>Fibroblast growth factor</i> – czynnik wzrostu fibroblastów
FSP1	ang. <i>Fibroblast specific protein 1</i> – białko specyficzne dla fibroblastów
GAPDH	ang. <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego



hCAFs	ang. <i>Human CAFs</i> – ludzkie CAFs (wyzolowane od pacjentek)
HER2	ang. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2
HGF	ang. <i>Hepatocyte growth factor</i> – czynnik wzrostu hepatocytów
HIF-1 $\alpha$	ang. <i>Hipoxia inducible factor 1</i> – czynnik indukowany hipoksją 1
IDO1	ang. <i>Idolamine 1</i> – idolamina 1
IGFBP-3	ang. <i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i> – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 3
IL	ang. <i>Interleukin</i> – interleukina
LIF	ang. <i>Leukemia inhibitory factor</i> – czynnik hamujący białaczkę
LOX	ang. <i>Lysyl oxidase</i> – oksydazala lizozylowa
MAPK	ang. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> – kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MDSCs	ang. <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> – mieloidalne komórki supresorowe
MMPs	ang. <i>Metaloproteinases</i> – metaloproteinazy
NF- $\kappa$ B	ang. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
NFs	ang. <i>Normal Fibroblasts</i> – prawidłowe fibroblasty tkanek
NG2	ang. <i>Neural/glial antigen 2</i> – antygen nerwowy/glejowy 2
NRG1	ang. <i>Neuregulin 1</i> – neuregulina 1
OPN	ang. <i>Osteopontin</i> – osteopontyna
PDGF	ang. <i>Platelet Derived Growth Factor</i> – płytkopochodny czynnik wzrostu
PDGFR $\alpha/\beta$	ang. <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha/beta</i> – receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa/beta
PDPN	ang. <i>Podoplanin</i> – podoplanina
PI3K/Akt	ang. <i>Phosphoinositide 3-kinase and protein kinase Akt</i> – 3-kinazy fosfoinozytydu i kinazy białkowej Akt
POSTN	ang. <i>Periostin</i> - periostyna
PR	ang. <i>Progesterone receptor</i> – receptor progesteronowy
PSCs	ang. <i>Pancreatic stellate cells</i> – komórki gwiaździste trzustki
PTH	ang. <i>Parathyroid hormone</i> – parathormon
RANKL	ang. <i>receptor activator for nuclear factor <math>\kappa</math>B ligand</i> – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika $\kappa$ B
RPLP0	ang. <i>60S acidic ribosomal protein P0</i> – 60S kwaśne białko rybosomalne P0
RPS27a	ang. <i>40S ribosomal protein S27a</i> – podjednostka 40S rybosomalnego białka S27a
RXR	ang. <i>Retinoid X receptor</i> – receptor retinoidów X
S100A4	ang. <i>S100 calcium binding protein A4</i> – białko wiążące wapń A4

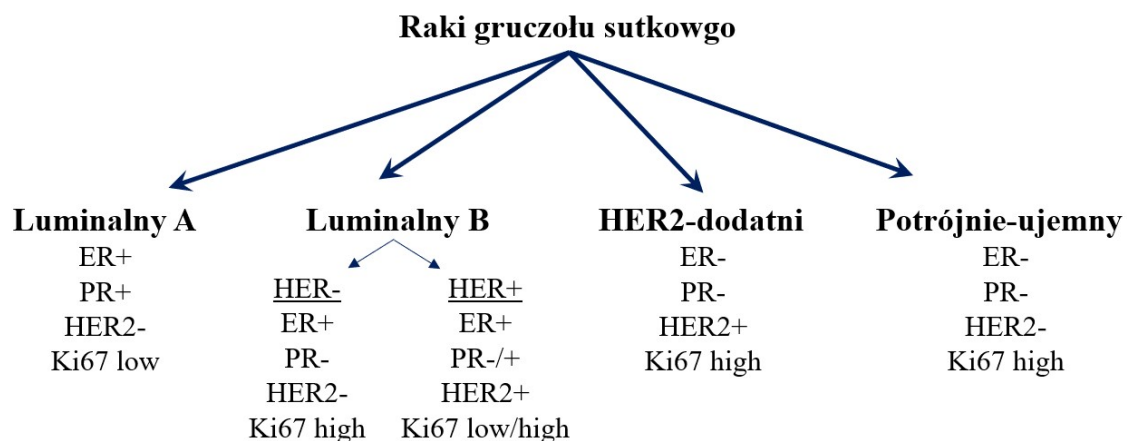
---

SDF-1	ang. <i>Stromal cell-derived factor 1</i> – czynnik pochodzenia zrębowego-1
SHH	ang. <i>Sonic hedgehog homolog</i> – homolog sonic hedgehog
SMAD3	ang. <i>SMAD family member 3</i> – członek 3 rodziny SMAD
SPP1	ang. <i>Secreted phosphoprotein</i> – wydzielana fosfoproteina
STAT	ang. <i>Signal transducer and activator of transcription</i> – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
TAMs	ang. <i>Tumor associated macrophages</i> – makrofagi związane z guzem
TGFβ1	ang. <i>Transforming growth factor beta 1</i> – transformujący czynnik wzrostu beta 1
TIMP1	ang. <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1
TME	ang. <i>Tumor Microenvironment</i> – mikrośrodowisko nowotworowe, stroma
TNBC	ang. <i>Triple-negative breast cancer</i> – potrójnie ujemny rak gruczołu sutkowego
TNC	ang. <i>Tenascin C</i> – tenascyna C
tNFs	ang. <i>TGFβ1 stimulated NFs</i> – NFs stymulowane TGFβ1
TSP-1	ang. <i>Thrombospondin 1</i> – trombospondyna 1
VDR	ang. <i>Vitamin D receptor</i> – receptor witaminy D
VEGF	ang. <i>Vascular endothelial growth factor</i> – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
ZEB1	ang. <i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i> – homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym

## WSTĘP

### 1. Charakterystyka nowotworów gruczołu sutkowego

Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia (system GLOBOCAN 2020), nowotwory gruczołu sutkowego są aktualnie najczęściej występującą grupą nowotworów wśród kobiet, a także najczęstszą przyczyną śmierci na choroby nowotworowe pośród kobiet [1]. Wcześniej wykrywane nowotwory gruczołu sutkowego są łatwo uleczalne, zaś późno rozpoznane wiążą się z ryzykiem śmierci [2]. Nowotwory gruczołu sutkowego są często w publikacjach traktowane jako jedna jednostka chorobowa, a w rzeczywistości stanowią bardzo heterogenną grupę chorób o zróżnicowanych cechach klinicznych, morfologicznych, charakterystyce molekularnej i odmiennych strategiach leczenia i rokowania [3]. Opracowano kilka systemów klasyfikacji nowotworów gruczołu sutkowego, takich jak klasyfikacja TNM, histopatologiczna i molekularna. System klasyfikacji TNM oparty jest o ocenę wielkości guza pierwotnego (T - ang. *tumor*), obecności przerzutów w węzłach chłonnych (N - ang. *lymph nodes*) i obecności przerzutów odległych (M - ang. *metastasis*) [4]. Klasyfikacja histopatologiczna dzieli nowotwory gruczołu sutkowego na dwie grupy: raki przedinwazyjne (rak *in situ*) i raki inwazyjne (naciekające) [5]. Zastosowanie klasyfikacji molekularnej umożliwia zaplanowanie celowanej terapii systemowej i po uwzględnieniu pozostałych klasyfikacji – dobranie indywidualnego planu leczenia dla każdego pacjenta [6,7]. Klasyfikacja molekularna w oparciu o ekspresję białek, tj. receptor estrogenowy (ER), receptor progesteronowy (PR), receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) i antygen Ki67 wyodrębnia 4 podtypy raków inwazyjnych gruczołu sutkowego: luminalny A (ang. *luminal A*), luminalny B (ang. *luminal B*), HER2-dodatni (ang. *HER2-positive*) i potrójnie ujemny (TNBC – ang. *triple negative breast cancer*) (Rycina 1) [6,7].



*Rycina 1. Klasyfikacja molekularna nowotworów złośliwych gruczołu sutkowego. Opracowanie własne.*

W systemowym leczeniu chorych na luminalne raki gruczołu sutkowego najczęściej stosuje się hormonoterapię w skojarzeniu z innymi terapiami systemowymi [8]. Schemat leczenia pacjentów z rakiem gruczołu sutkowego HER<sup>-</sup> ER<sup>+</sup> może zakładać również wykorzystanie drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDK), tj. palbocyklib, rybocyklib, abemacyklib [9]. W przypadku nowotworów HER2-dodatnich stosuje się terapię celowaną w receptor HER-2. Przykładem takiego leczenia jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych tj. trastuzumab, pertuzumab lub inhibitorów kinazy tyrozynowej [10,11]. W przypadku TNBC terapią najczęściej stosowaną jest chemioterapia, aczkolwiek do stosowania zostały zatwierdzone także dwie terapie celowane dla tego podtypu raka gruczołu sutkowego z mutacją w genach podatności na raka gruczołu sutkowego 1/2 (BRCA1/2) – olaparyb i talazoparyb – inhibitory polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP) [12,13]. Coraz częściej w terapii, zwłaszcza TNBC, stosuje się immunoterapię – w 2021 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) zarejestrowała terapię skojarzoną pembrolizumab + chemioterapia jako leczenie przedoperacyjne inwazyjnego TNBC [14]. Pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią został również dopuszczony jako leczenie nawrotowego TNBC [14]. Wszystkie terapie lekowe raka gruczołu sutkowego stosuje się najczęściej w skojarzeniu z leczeniem operacyjnym i radioterapią oraz bisfosfonianami [15]. W trakcie i po zakończeniu terapii przeciwnowotworowej zaleca się suplementację witaminy D<sub>3</sub>, wapnia, wysoką aktywność fizyczną, zbilansowaną dietę, utrzymywanie lub doprowadzenie masy ciała do należytą oraz unikanie alkoholu i dymu tytoniowego. Czynniki te mają udowodnioną skuteczność w poprawie wyników leczenia onkologicznego i redukcji jego powikłań [16].

Na przestrzeni lat obserwuje się zwiększającą się zachorowalność na raka gruczołu sutkowego [17,18]. Do czynników ryzyka zachorowania na raka gruczołu sutkowego wlicza się płeć żeńską, wiek, nosicielstwo mutacji zwiększających ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego, historię rodzinną zachorowań na raka gruczołu sutkowego i raka jajnika, czynniki reprodukcyjne (wiek pierwszej miesiączki (wczesna pierwsza menstruacja), późne rozpoczęcie okresu menopauzy czy też późny wiek pierwszej ciąży), czynniki hormonalne (tabletki antykoncepcyjne czy zastępcza terapia hormonalna (HRT)), styl życia (wysokotłuszczowa dieta, niska aktywność fizyczna, spożywanie alkoholu i tytoniu) iotyłość [17,19].

## **2. Rola witaminy D<sub>3</sub> w organizmie**

Tradycyjnie witaminę D<sub>3</sub> zalicza się do witamin, aczkolwiek w organizmie ludzkim pełni ona funkcję pre-hormonu i w szeregu procesów zostaje przekształcona do aktywnej biologicznie formy - kalcytriolu. Wyróżnia się dwie podstawowe formy witaminy D: (1) cholekalcyferol (witamina D<sub>3</sub>) występujący w organizmach zwierzęcych oraz (2) ergokalcyferol (witamina D<sub>2</sub>) występujący w roślinach i drożdżach, produkowany w wyniku promieniowania ultrafioletowego z ergosterolu [20,21]. W wyniku działania promieniowania UV, 7-dehydrocholesterol w keratynocytach ulega przekształceniu do cholekalcyferolu [20,21]. Powstała witamina D<sub>3</sub> (cholekalcyferol) jest nieaktywna biologicznie. Dzięki połączeniu z globuliną wiążącą witaminę D<sub>3</sub> (DBP) zostaje przetransportowana do wątroby, gdzie z udziałem enzymu CYP2R1 ulega 25-hydroksylacji. Kalcydiol (25(OH)D<sub>3</sub>) jest głównym krążącym metabolitem witaminy D<sub>3</sub> w organizmie. 25(OH)D<sub>3</sub> za pośrednictwem DBP zostaje przetransportowany do kanalików proksymalnych nerek, gdzie w wyniku aktywności CYP27B1 (polipeptyd 1 podrodziny B rodziny 27 cytochromu P450) ulega hydroksylacji w pozycji 1 $\alpha$ , tworząc 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, aktywną hormonalnie formę witaminy D<sub>3</sub> (kalcytriol). Kolejny etap metabolizmu witaminy D<sub>3</sub>, również mający miejsce w nerkach, polega na 24-hydroksylacji. Metabolity witaminy D<sub>3</sub> hydroksylowane przez CYP24A1 (polipeptyd 1 podrodziny A rodziny 24 cytochromu P450) w pozycji 24 wydalone są z organizmu poprzez mocz lub kał [20,21].

Swoją biologiczną aktywność kalcytriol realizuje głównie za pośrednictwem receptora dla witaminy D<sub>3</sub> (VDR). VDR jest czynnikiem transkrypcyjnym. Wiązanie kalcytriolu do VDR wywołuje zmianę konformacyjną receptora, która umożliwia utworzenie heterodimeru z receptorem retinoidów X (RXR). Heterodimer VDR/RXR wiąże się

do specyficznych sekwencji DNA (znanych jako sekwencje odpowiedzi VDR, VDRE), co w konsekwencji prowadzi do aktywacji lub zahamowania transkrypcji docelowych genów. Poza klasycznym, genomowym działaniem opisanym powyżej, kalcytriol może wywierać znacznie szybsze, mierzone w sekundach/minutach reakcje. Przypuszcza się, że działanie pozagenomowe kierowane jest wiązaniem kalcytriolu do alternatywnego, błonowego receptora - białka błonowego wiążącego sterydy (1,25D3-MARRS, PDIA3). Działanie pozagenomowe angażuje aktywację cząsteczek sygnałowych (fosfolipaza C (PKC), fosfolipaza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K), p21ras), stymulację wytwarzania szybkich drugorzędowych przekaźników (tj. Ca<sup>2+</sup>, cykliczne AMP, wolne kwasy tłuszczowe czy fosfatydyloinozytol, których stymulacja skutkuje aktywacją kinaz białkowych - kinazy A, kinazy C, SRC, aktywowanej mitogenami kinazy (MAPK) i kinazy zależnej od kalmoduliny) oraz otwieranie kanałów błonowych Ca<sup>2+</sup> i Cl<sup>-</sup> [22].

Witamina D<sub>3</sub> uczestniczy w utrzymaniu zdrowych kości poprzez regulację absorpcji wapnia w jelitach, utrzymanie właściwego poziomu wapnia i fosforanów w osoczu oraz poprzez bezpośredni wpływ na osteoblasty i osteoklasty [23]. W odpowiedzi na obniżenie poziomu wapnia w osoczu pobudzona zostaje produkcja parathormonu (PTH), co z kolei stymulując CYP27B1, zwiększa syntezę kalcytriolu [24]. W wyniku działania soku żołądkowego zostają uwolnione z pożywienia jony wapnia, które następnie są transportowane przez nabłonek dwunastnicy drogą para- lub trans-komórkową, transport ten podlega regulacji przez kalcytriol [25]. W nerkach większość przefiltrowanego przez kłębuszki wapnia ulega zwrotnemu wchłanianiu: pasywnie, zgodnie z gradientem w proksymalnych kanalikach nerek lub za pomocą transportu aktywnego w dystalnych kanalikach nerkowych. Kalcytriol wraz z PTH wspierają reabsorpcję Ca<sup>2+</sup> w dystalnych kanalikach nerek [20]. W fizjologicznych warunkach większość przefiltrowanych w nerkach fosforanów ulega wchłanianiu zwrotnemu w kanalikach proksymalnych. Proces ten jest negatywnie regulowany przez czynnik wzrostu fibroblastów 23 (FGF23), PTH oraz kalcytriol. FGF23 indukuje internalizację i lizosomalną degradację białek transportowych, zaś PTH obniża ich ekspresję – razem zwiększają wydalanie fosforanów. Udział kalcytriolu polega na stymulacji ekspresji FGF23 w osteocytach oraz  $\alpha$ -klotho w kanalikach dystalnych, których działanie również prowadzi do zwiększenia wydalania fosforanów z moczem [20,23,26]. Wapń jest głównym budulcem kości tak jak, i kości są głównym magazynem wapnia. Integralność kościca ściśle zależy od dostarczanego z osocza Ca<sup>2+</sup> i pośrednio od jego wchłaniania w jelitach.

Kości podlegają stałej przebudowie – resorpcja kości (z udziałem osteoklastów) i ich formowanie (dzięki aktywności osteoblastów) są w stałej równowadze [20]. Zbyt niska podaż wapnia z pożywieniem w stosunku do jego utraty przez nerki, aktywuje wzrostu poziomu PTH w osoczu, który w konsekwencji pobudza produkcję kalcytriolu. W odpowiedzi kalcytriol stymuluje procesy resorpcji kości i hamuje procesy mineralizacji. Swoją aktywność resorpcyjną realizuje głównie poprzez wpływ na osteoblasty – aktywacja VDR w komórkach indukuje ekspresję i sekrecję RANKL (liganda aktywatora receptora jądrowego czynnika  $\kappa$ B), który łącząc się z RANK (receptorem RANKL) na powierzchni osteoklastów, wzmacnia procesy osteoklastogeny [20,27]. Ponadto kalcytriol w odpowiedzi na niedobór wapnia w osoczu hamuje mineralizację macierzy kości – utrzymując właściwy poziom  $\text{Ca}^{2+}$ . Kalcytriol reguluje mineralizację kości także pośrednio, zwiększając poziom pirofosforanów i ekspresję osteopontyny (OPN) – inhibitorów mineralizacji kości. Ścieżka sygnałowa VDR poprzez aktywację ekspresji RANKL odgrywa również istotną rolę w chondrocytach podczas okresu wzrostu kości, kiedy komórki te są obficie obecne [20]. Odwrotna sytuacja - zwiększenie poziomu wapnia w osoczu - skutkuje zahamowaniem produkcji PTH, obniżeniem syntezy kalcytriolu i zmniejszeniem mobilizacji wapnia z kości. Dodatkowo bardzo wysokie stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w osoczu stymuluje w komórkach przypęcherzykowych trzustki produkcję kalcytoniny, która blokuje mobilizację wapnia z kości, stymuluje jego wydzielanie wraz z fosforanami z kości, utrzymując fizjologiczny poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w osoczu [23].

### **2.1. Plejotropowe działanie witaminy D<sub>3</sub>**

Aktywność witaminy D<sub>3</sub> nie ogranicza się do opisanej w poprzednim rozdziale klasycznej roli utrzymywania równowagi wapnia i fosforu. Kalcytriol bierze udział w regulacji funkcjonowania komórek układu odpornościowego, procesów zapalnych, zwłóknienia, apoptozy, migracji oraz proliferacji i różnicowania komórek [20,28–31]. Według licznych badań witamina D<sub>3</sub> oraz jej analogi istotnie wpływają na wzrost guza, hamują proliferację komórek nowotworowych, indukują ich różnicowanie czy też działają proapoptotycznie. Kalcytriol może również regulować angiogenezę guza, adhezję i migrację komórek nowotworowych oraz wpływać na inwazyjność nowotworów. Większość komórek nowotworowych posiada ekspresję VDR, a nawet i enzymów uczestniczących w metabolizmie kalcytriolu – CYP27B1 oraz CYP24A1 [20]. Co więcej, niski poziom 25(OH)D<sub>3</sub>, najczęściej badanego w osoczu metabolitu witaminy D<sub>3</sub>,

zwiększa ryzyko rozwinięcia wielu stanów patologicznych i chorobowych takich jak choroby autoimmunologiczne (np. cukrzyca typu 1, łuszczyca, sepsa, zwłóknienie rozsiane) [32–36], choroby alergiczne (np. astma, atopowe zapalenie skóry) [37,38], choroby neuropsychiatryczne (np. schizofrenia i choroby neurodegeneracyjne) [39,40], niewydolność nerek czy wątroby [41,42], infekcje (np. COVID-19, gruźlica, choroby układu oddechowego) [43–45], nadciśnienie, choroby serca [46,47], otyłość czy zaburzenia wchłaniania jelitowego (np. celiakia, mukowiscydoza, zespół jelita drażliwego) [48–51].

### 3. Witamina D<sub>3</sub> i nowotwory gruczołu sutkowego

#### *Obserwacje epidemiologiczne i badania kliniczne*

Niski poziom 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu pacjentów został powiązany z ryzykiem wystąpienia raka gruczołu sutkowego u kobiet przed menopauzą [52] i po menopauzie [53]. Zaskakująco według *Ordóñez-Mena i wsp.* ryzyko wystąpienia raka gruczołu sutkowego u starszych pacjentek wrasta wraz ze stężeniem 25(OH)D<sub>3</sub> [54]. Ponadto *Kanstrup i wsp.* zaobserwowali, że wysokie stężenie 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu, ponad 110nmol/l, może skutkować krótszym czasem przeżycia pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego [55]. Pacjentki z rozpoznaniem raka gruczołu sutkowego zwykle mają niższy poziom 25(OH)D<sub>3</sub> niż ich zdrowe rówieśniczki, a pacjentki z zaawansowanym (wysoki stopień zaawansowania nowotworu, typ inny niż luminalny, typ ER-negatywny) rakiem gruczołu sutkowego mają poziom 25(OH)D<sub>3</sub> jeszcze niższy niż w początkowych stadiach choroby [56–58]. Jednakże suplementacja witaminy D<sub>3</sub> nie wiąże się z obniżeniem ryzyka wystąpienia raka gruczołu sutkowego [59].

Badania wskazują, że ekspresja VDR w tkance guza jest odwrotnie skorelowana z agresywnością nowotworu [60]. W łagodnych, początkowych zmianach rakowych, VDR ulega wyższej ekspresji niż w nowotworach inwazyjnych lub *in situ* [61] tak, jak i ekspresja VDR jest wyższa w rakach typu luminalnego A niż w najbardziej agresywnym podtypie TNBC [62,63]. Wraz z rozwojem nowotworu gruczołu sutkowego ekspresja VDR maleje a wraz z nią maleje wrażliwość guza na kalcytriol [61,62]. Co więcej, według *Al-Azhri i wsp.* ekspresja VDR w komórkach raka gruczołu sutkowego koreluje z korzystnymi cechami takimi jak mała wielkość guza, niski stopień zaawansowania, obecność receptorów: ER i PR lub niska ekspresja Ki67 [60].



***Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na wzrost raków gruczołu sutkowego***

Opublikowane do tej pory badania zgłębiające temat wpływu witaminy D<sub>3</sub> lub jej aktywnego biologicznie metabolitu, kalcytriolu, na wzrost raków gruczołu sutkowego nie przedstawiają jednoznacznych wyników. Według *Rossdeutscher i wsp.* dieta uboga w witaminę D<sub>3</sub> (25IU/kg) przyspiesza spontaniczny wzrost raka gruczołu sutkowego u myszy modelu MMTV-PyMT. Zaś podania kalcytriolu lub 25(OH)D<sub>3</sub> spowalniają jego rozwój [64]. Co więcej, taki sam efekt kalcytriolu lub 25(OH)D<sub>3</sub> został zaobserwowany *in vitro* na pierwotnych komórkach raka gruczołu sutkowego MMTV-PyMT. Zahamowaniu proliferacji komórek *in vitro* towarzyszyło obniżenie ekspresji markerów proliferacji - Ki67, ErbB2 oraz białka progresji cyklu komórkowego - cykliny D1 [64]. *Williams i wsp.* również zaobserwowali, że niedobór cholekalcyferolu w diecie myszy (25IU/kg) promuje wzrost guza w modelu MMTV-Wnt1 [65]. Według badań *in vitro* na mysich (WT145, KO240) [66] i ludzkich (MCF-7, MDA-MB-231, HCC1937) [67,68] komórkach raka gruczołu sutkowego kalcytriol hamuje proliferację komórek nowotworowych poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Co więcej, aktywacja sygnalizacji VDR prowadzi do zwiększonej ekspresji inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDKN), tj. *CDKN2D* (p19), *CDKN1A* (p21) i *CDKN1B* (p27) tak, jak i obniżonej ekspresji kinaz zależnych od cyklin (CDK) i samych cyklin – CDK2/4, cyklina D1/3, cyklina A1 czy cyklina E1 [66–71]. W przypadku ksenoprzeszczepienia komórek linii MCF-7 (typ luminalny raka gruczołu sutkowego) dootrzewnowe iniekcje kalcytriolu również zmniejszyły tempo wzrostu guza [72]. Zahamowaniu wzrostu guza towarzyszyło obniżenie ekspresji mRNA dla ER $\alpha$ , aromataz uczestniczących w syntezie i przekazywaniu sygnału estrogenów oraz cyklooksygenazy 2 (COX-2) o aktywności przeciwzapalnej. Zaskakująco podawanie kalcytriolu prowadziło również do zwiększonej ekspresji mRNA dla uczestniczących w proliferacji p21 i białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 3 (IGFBP-3) [72]. Codzienne doustne podania cholekalcyferolu (rozpoczęte 7 dni po inokulacji guza) myszom zaszczepionym ortotopowo komórkami linii E0771 (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, ErbB2<sup>+</sup> podtyp raka gruczołu sutkowego) poskutkowały zmniejszeniem wielkości guza [73]. Aczkolwiek w modelu ksenograficznym, gdzie wykorzystano komórki ludzkich guzów gruczołu sutkowego, doguzowe dostarczanie kalcytriolu nie było w stanie zredukować proliferacji komórek guza, nie zaobserwowano również zmian w poziomie Ki67, CDKN1A, CDKN1B, BCL2 (jedno z białek antyapoptotycznych) [74]. Według wyników badań *Anisiewicz i wsp.* kalcytriol lub jego analog (PRI-2191) podawane trzy razy w tygodniu podskórnie nie

wpłynęły na tempo wzrostu guza modelu 4T1 u myszy zarówno w modelu przed- [75], jak i po-menopauzalnym [76]. Jedyne podania analogu kalcytriolu PRI-2205 skutkowały zmniejszeniem objętości guza u myszy modelu po-menopauzalnego [76]. Podobnie w badaniach będących częścią niniejszej rozprawy doktorskiej ani dieta ze zróżnicowaną zawartością witaminy D<sub>3</sub> (normalny, niski lub wysoki poziom), ani podania kalcytriolu (rozpoczęte po inokulacji komórek raków gruczołu sutkowego 4T1 i E0771) nie wpłynęły na wzrost guzów [77]. Jedyne u myszy obarczonych komórkami 67NR zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza u myszy otrzymujących podania kalcytriolu [77]. Zaś *Cao i wsp.*, stosując codzienne, doustne podania kalcytriolu począwszy od 17 dnia po inokulacji komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1, zaobserwowali stymulację wzrostu guza oraz mniejsze przeżycie w grupie myszy otrzymujących kalcytriol [78]. Dodatkowo *Trivedi i wsp.*, pracując *in vitro* na komórkach linii MCF-7, zaobserwowali, że wyciszenie genu dla VDR skutkuje obniżeniem proliferacji oraz zwiększeniem apoptozy, sugerując aktywność pronowotworową VDR niezależną od liganda – kalcytriolu [79].

#### ***Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na apoptozę komórek raka gruczołu sutkowego***

Kalcytriol reguluje proces apoptozy poprzez obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xl oraz zwiększenie odpowiadających im proapoptotycznych Bax i Bak [80]. Ponadto kalcytriol obniża aktywność szlaku MAPK/ERK w komórkach raka gruczołu sutkowego ER<sup>+</sup> (MCF-7) i ER<sup>-</sup> (MDA-MB-231) [20]. *Weitsman i wsp.* zaobserwowali, że kalcytriol uwrażliwia komórki MCF-7 na działanie reaktywnych form tlenu, które poprzez zmiany w potencjale błony mitochondrium promują uwolnienie cytochromu C, prowadząc do apoptozy [81]. Co więcej, według pracy *Kłopotowska i wsp.* kalcytriol lub jego analog takalcytol (PRI-2191) zmniejszają ekspresję miR-125b, co prowadzi do zwiększenia ekspresji BAK1 [82].

#### ***Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na procesy przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, migracji, inwazji i przerzutowania w rakach gruczołu sutkowego***

*Williams i wsp.* zaobserwowali, że ekspresja VDR w tkance guza chroni przed powstawaniem przerzutów raka gruczołu sutkowego do wątroby [65]. Według *Li i wsp.* dieta uboga w cholekalcyferol (25IU/kg) przyspiesza przerzutowanie komórek raka gruczołu sutkowego do płuc w modelu myszy transgenicznym MMTV-PyMT, zaś w płucach obserwuje się zwiększony poziom liganda chemokiny 12 motywu C-X-C (CXCL12, znanego również jako czynnik pochodzenia zrębowego, SDF-1) oraz

kolokalizację CXCL12 i receptora chemokin CXC 4 (CXCR4) [83]. Deficyt witaminy D<sub>3</sub> wiąże się ze zwiększoną ekspresją promotorów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) w tkance guza: STAT3 (białka - przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 3) i supresora E-kadheryny – Zeb1 (homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym) [83]. Badania przeprowadzone w naszym laboratorium przedstawiają zróżnicowane wyniki wpływu kalcytriolu na powstawanie przerzutów w modelu przed- [75] i pomenopauzalnym [76] myszy obciążonych komórkami mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1. *Anisiewicz i wsp.* (2018) zaobserwowali promocję przerzutowania u myszy młodych (model przedmenopauzalny) otrzymujących kalcytriol i jego analogi (PRI-2191 i PRI-2205) [75]. Pro-przerzutujący wpływ kalcytriolu wiązał się ze wzrostem poziomu OPN w tkance guza 4T1. Co więcej, traktowanie myszy obciążonych komórkami 4T1 za pomocą analogów kalcytriolu PRI-2191 i PRI-2205 skutkowało zwiększeniem poziomu SNAIL-1 (markera fenotypu mezenchymalnego) [75]. W modelu pomenopauzalnym *Anisiewicz i wsp.* (2019) zaobserwowali, że zastosowane analogów kalcytriolu zredukowało przerzutowanie do płuc. Ekspresja OPN uległa zmniejszeniu [76]. *Zhang i wsp.*, pracując na tym samym modelu przed-menopauzalnego raka gruczołu sutkowego 4T1, zaobserwowali zmniejszenie przerzutowania po codziennych dootrzewnowych dawkach kalcytriolu rozpoczętych od dnia poprzedzającego wszczepienie komórek guza [84]. Zaś badanie poprzedzające eksperymenty ujęte w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazało, że zarówno dieta bogata w witaminę D<sub>3</sub>, jak i podania kalcytriolu myszom otrzymującym dietę z niedoborem witaminy D<sub>3</sub> (100IU/kg) i ze standardową ilością witaminy D<sub>3</sub> (1000IU/kg) zwiększają powstawanie przerzutów w płucach myszy obciążonych nowotworem 4T1. Nie zaobserwowano natomiast wpływu na przerzutowanie u myszy obciążonych guzami 67NR i E0771 [77]. Co więcej, badania *in vitro* wskazują na ochronny charakter kalcytriolu w procesach istotnych dla przerzutowania – migracji, inwazji i EMT. *Horas i wsp.* dowiedli, że wyciszenie genu VDR zwiększa migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, zwiększa ich potencjał przerzutowania do kości oraz obniża poziom markerów nabłonkowych, tj.  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i F-aktyny, a zwiększa poziom wimentyny [85]. Według badań wykorzystujących różne linie raka gruczołu sutkowego stymulacja kalcytriolem skutkuje obniżeniem potencjału do przerzutowania oraz związaną z tym redukcją poziomu N-kadheryny, P-kadheryny,  $\alpha$ -aktyny mięśni gładkich ( $\alpha$ SMA), integryn  $\alpha_v$  i  $\beta_5$  oraz wzrostem ekspresji E-kadheryny [86–88]. *González-Sancho i wsp.* wskazali, że kalcytriol może zmniejszać wzrost, inwazję, jak i angiogenezę guza poprzez

redukcję ekspresji promującej te procesy tenascyny C (TNC) [89]. Kalcytriol obniża ekspresję inhibitora białka wiążącego DNA 1 (ID-1) i promuje różnicowanie komórek [65]. Kalcytriol ma również wpływ na ekspresję szeregu innych czynników promujących migrację, inwazję czy zdolności do przerzutowania – hamuje te procesy poprzez obniżenie poziomu lub aktywności składowych macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) tj. wspomnianych TNC czy periostyny (POSTN), metaloproteinaz (MMPs) - MMP1 i MMP9 i proteaz serynowych [66,87,89–92].

#### ***Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na charakter macierzysty komórek raków gruczołu sutkowego***

Kaskady sygnałowe takie jak Notch, Wnt/Frizzled/ $\beta$ -kateina, Hippo, Hedgehog są zaangażowane w generowanie macierzystych komórek nowotworowych (CSCs), które to inicjują powstawanie guza, jego progresję i nawroty [59,93,94]. CSCs charakteryzują się wysoką ekspresją antygenu różnicowania komórkowego 44 (CD44) i niską CD24 (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>) oraz markerów takich jak: dehydrogenaza aldehydowa (ALDH-1), CD326, CD133 oraz CXCR4 [95–98]. W swojej pracy *Shan i wsp.* zaobserwowali, że kalcytriol oraz jego analog Gemini (BXL0124) hamują zdolność CSCs do tworzenia mammosfer i obniżają ekspresję białek zaangażowanych w utrzymanie macierzystego fenotypu, tj. CD44, OCT4, Notch1/2/3, JAG1/2 (ligand Notch) czy jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- $\kappa$ B) [99]. *Wahler i wsp.* poza redukcją ekspresji CD44 zaobserwowali, że kalcytriol zmienia organizację i symetrię mammosfer, zbliżając ich kształt do tych formowanych przez zdrowe komórki nabłonka [100]. *So i wsp.* zaobserwowali, że analog witaminy D<sub>3</sub> BXL1024 zwiększa ekspresję HES1 - inhibitora sygnalizacji Notch1 [94]. Zaś *Zheng i wsp.* dowiedli, że kalcytriol obniża fenotyp macierzysty komórek raka gruczołu sutkowego poprzez zahamowanie kaskady sygnałów Wnt/ $\beta$ -katenina [93]. Według badań *Jeong i wsp.* kalcytriol zmniejsza zdolność CSCs do tworzenia drugorzędowych sfer a więc zaburza zdolność CSCs do samoodnowy [101].

#### ***Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na metabolizm komórek raka gruczołu sutkowego***

Witamina D<sub>3</sub> może modyfikować metabolizm komórek nowotworowych poprzez wpływ na glikolizę, produkcję mleczanów, cykl kwasów trkarboksylowych (TCA) czy stres oksydacyjny. Według *Zheng i wsp.* stymulacja kalcytriolem komórek MCF10A-ras (model wczesnego stadium raka gruczołu sutkowego) negatywnie wpływa na poziom enzymów zaangażowanych w te procesy oraz przepływ metabolitów przez błonę komórkową [102]. Badanie *Wilmanski i wsp.* potwierdza te obserwacje wskazując, że kalcytriol modyfikuje ekspresję karboksylazy pirogronianowej (jednego z enzymów

cyklu TCA) i zwiększa stres oksydacyjny w komórkach raka gruczołu sutkowego [103]. *Abu El Maaty i wsp.* zaobserwowali, że w komórkach raka gruczołu sutkowego MCF-7 kalcytriol zwiększył wewnątrzkomórkowe stężenie ROS i seryny oraz obniżył ekspresję TXNIP (regulatora homeostazy redoks i wchłaniania glukozy). W komórkach MCF-7 i MDA-MB-231 stymulacja kalcytriolem aktywowała sygnalizację AMPK (kinazy aktywowanej 5'AMP, która może hamować wysokoenergetyczną produkcję kwasów tłuszczowych lub indukować wchłanianie glukozy) i zwiększyła aktywność cyklu pentozofosforanowego (PPP) i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (katalizującej pierwszy etap PPP) [104]. Według badań *Santos i wsp.* kalcytriol zakłóca aktywność pompy protonowej ATP. Zahamowanie pompy prowadzi do wzrostu pH w komórkach nowotworowych, prowadząc do ich śmierci [105,106].

### ***Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na procesy zapalne w środowisku nowotworowym***

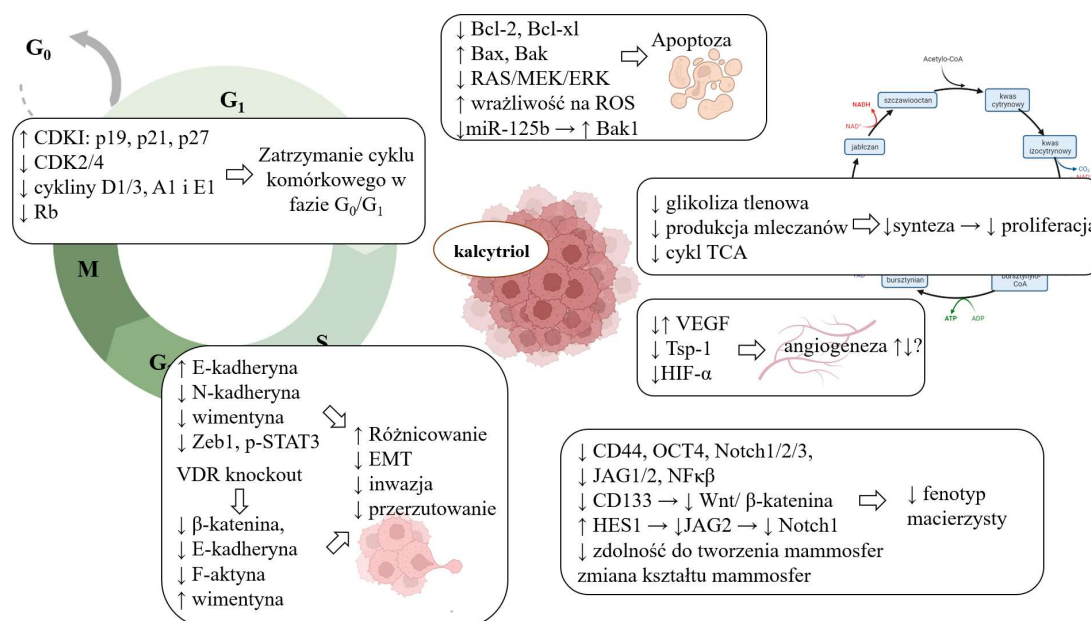
Cytotoksyczne limfocyty T (T<sub>c</sub>, CD8<sup>+</sup> lub CTLs) charakteryzuje aktywność przeciwnowotworowa, a ich duża infiltracja w tkance guza wiąże się z lepszą prognozą dla pacjentów cierpiących na raka gruczołu sutkowego TNBC, HER<sup>+</sup> ale nie ER<sup>+</sup> [107–110]. Badania *in vivo*, gdzie myszy traktowano codzienną dawką cholekalcyferolu od 7 dnia po inokulacji komórek E0771, wykazały zwiększoną infiltrację limfocytów T CD8<sup>+</sup> w guzach pochodzących od myszy otrzymujących cholekalcyferol. Jednakże efekt suplementacji był ściśle zależny od zawartości tłuszczu w diecie myszy – u myszy karmionych paszą wysokotłuszczową zaobserwowano obniżenie infiltracji CTLs i stymulację wzrostu guzów w grupie myszy suplementowanych cholekalcyferolem [73]. Natomiast *Cao i wsp.*, prowadząc badania na myszach obciążonych guzami 4T1, zaobserwowali negatywny wpływ podań witaminy D<sub>3</sub> na odpowiedź komórkową limfocytów T CD4<sup>+</sup>, jak i T CD8<sup>+</sup>. Suplementacja myszy cholekalcyferolem prowadziła również do wzrostu ilości mieloidalnych komórek supresorowych (MDSCs) o właściwościach immunosupresyjnych. Zmiany te mogły być konsekwencją zwiększonego poziomu TGFβ (transformujący czynnik wzrostu β) [78]. Co więcej, według *Pawlik i wsp.* podawanie kalcytriolu lub jego analogów (PRI-2191 PRI-2205) myszom obciążonym 4T1 prowadziło do obniżenia odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK CD335<sup>+</sup> (ang. *natural killer*) i jednocześnie do zwiększenia odsetka monocytów we krwi myszy [111]. Ponadto w śledzienie i regionalnych węzłach chłonnych zaobserwowano przewagę odpowiedzi typu T<sub>h2</sub> i zwiększoną aktywność limfocytów T<sub>reg</sub> [111]. *Anisiewicz i wsp.* zanotowali wzrost stosunku prozapalnych monocytów (Ly6C<sub>high</sub>CXCR1<sup>low</sup>CCR2<sup>+</sup>) do monocytów

przeciwwzapalnych (Ly6C<sup>low</sup>CXCR1<sup>high</sup>) w śledzionie myszy w tym samym modelu eksperymentalnym [112]. Oprócz tego *Anisiewicz i wsp.* opisali, że kalcytriol może wzmacniać polaryzację makrofagów M2 stymulowaną medium zebrany z komórek 4T1 [113].

### Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na angiogenezę raków gruczołu sutkowego

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) i trombospondyna 1 (Tsp-1) są kluczowymi czynnikami zaangażowanymi w przeciwne procesy: promocję (VEGF) i hamowanie (Tsp-1) angiogenezy. *García-Quiroz i wsp.* zaobserwowali, że kalcytriol promuje angiogenezę *in vitro* w 7 na 8 badanych komórkach linii raka gruczołu sutkowego (zwiększa ekspresję VEGF i zmniejsza Tsp-1) [114]. Co więcej, podawanie kalcytriolu myszom obciążonym nowotworem gruczołu sutkowego istotnie zwiększa poziom VEGF w surowicy, jednakże unaczynienie guza u myszy traktowanych i nietraktowanych kalcytriolem pozostaje zbliżone [114]. Według *Anisiewicz i wsp.* podania kalcytriolu oraz jego analogów PRI-2191 i PRI-2205 *in vivo* zwiększają przepływ krwi w guzach myszy młodych [75] i nie wywierają żadnego efektu na unaczynienie guza u myszy startych (model pomenopauzalny) [76]. Jednakże w pracy *Ben-Shoshan i wsp.* [115] wykazali, że kalcytriol obniża poziom VEGF i HIF- $\alpha$  w różnych liniach nowotworowych, w tym MCF-7 a według *Mantell i wsp.* [116] kalcytriol może redukować unaczynienie guzów *in vivo*.

Podsumowanie mechanizmów aktywności kalcytriolu w komórkach raka gruczołu sutkowego przedstawia rycina 2.



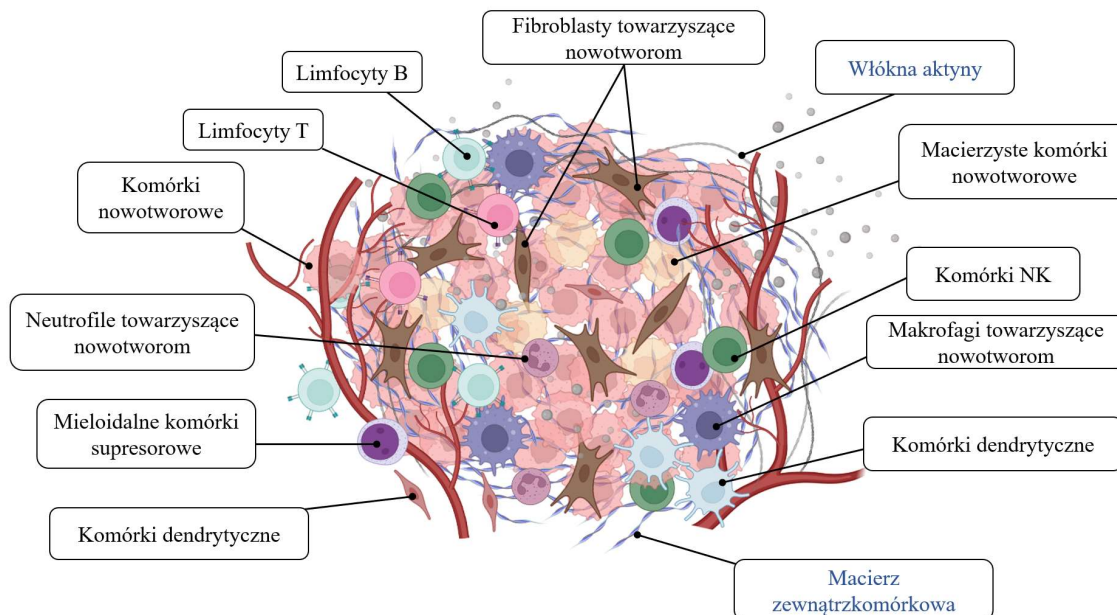
Rycina 2. Mechanizmy aktywności kalcytriolu w komórkach raka gruczołu sutkowego. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.

#### 4. Mikrośrodowisko nowotworowe

Procesy wzrostu i progresji guza nie wynikają wyłącznie z charakterystyki samych komórek nowotworowych, są one również determinowane przez pozostałe komórki obecne w mikrośrodowisku nowotworowym (TME). TME, inaczej zwane stromą nowotworu, złożone jest z macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i osadzonych w niej komórek o pochodzeniu nabłonkowym, śródbłonkowym, mezenchymalnym i hematopoetycznym. Wszystkie elementy TME są ze sobą ściśle powiązane i stale na siebie oddziałują [117–119]. Skład mikrośrodowiska prezentuje rycina 3.

##### 4.1. Fibroblasty towarzyszące nowotworom

Fibroblasty towarzyszące nowotworom, w skrócie CAFs, zostały zaobserwowane w prawie wszystkich litych guzach (nowotwory głowy i szyi, gruczołu sutkowego, płuc, skóry, przewodu pokarmowego, żółciowego i nowotwory układu płciowo-moczowego). W nowotworach gruczołu sutkowego, prostaty czy trzustki stanowią one najliczniejszą populację TME. Zdecydowana większość CAFs wykazuje aktywność pronowotworową, uczestnicząc w procesach inicjacji, progresji nowotworu i przerzutowaniu – wszystkich etapach rozwoju guza [117,118,120–122].



Rycina 3. Skład mikrośrodowiska nowotworowego. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.

#### 4.1.1. Fibroblasty zdrowych tkanek

Normalne fibroblasty (takim mianem określa się komórki o pochodzeniu poza-nowotworowym, NFs) to osadzone w ECM komórki o wrzecionowatym kształcie. Najczęściej NFs definiuje się w oparciu o ich kształt, lokalizację tkankową i brak markerów dla komórek linii nabłonkowej (tj. cytokeratyna, E-kadheryna lub CD326/cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych (CD326/EpCAM)), śródbłonkowej (CD31) oraz leukocytarnej (CD45) [117,119]. Fibroblasty są najliczniejszą grupą komórek tkanki łącznej i głównym twórcą ECM. Macierz zewnątrzkomórkowa złożona jest z włókien kolagenu, fibronektyny, kwasu hialuronowego i proteoglikanów. ECM jest rezerwuarem czynników wzrostu, stanowi rusztowanie dla migracji komórek, uczestniczy w homeostazie i naprawie tkanek. Zwykle rezydualne fibroblasty tkanek charakteryzują się bardzo niską aktywnością metaboliczną i transkrypcyjną. Gdy dochodzi do uszkodzenia tkanki, w odpowiedzi na cytokiny i czynniki wzrostu, takie jak TGF $\beta$ , interleukina 6 (IL-6) i PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu), NFs ulegają aktywacji do miofibroblastów. W procesie aktywacji nabywają zdolności transkrypcyjne, wydzielają duże ilości komponentów ECM, zaczynają produkować  $\alpha$ SMA, włókna kurczliwe oraz fibronektynę. Zwiększa się ich zdolność do syntezy komponentów ECM i jej remodelingu dzięki produkowanym proteazom, w wyniku czego powstaje zmieniona, reaktywna stroma. Zwiększająca się ekspresja  $\alpha$ SMA skutkuje zmianą organizacji cytoszkieletu i konsekwentnie fibroblasty kurczą się, dzięki czemu zbliżają do siebie granice rany. Wydzielane białka ECM zapewniają dalszą naprawę tkanki. Po zakończonym procesie gojenia rany fibroblasty ulegają dezaktywacji poprzez apoptozę, zaprogramowaną śmierć komórki [117,119,120,123]. W odpowiedzi na uszkodzenie tkanki i rozwijający się stan zapalny może dojść do niekontrolowanej, nadmiernej produkcji komponentów ECM, prowadząc do nieodwracalnego usztywnienia tkanki (zwłóknienia), które może skutkować nieprawidłowym działaniem wielu narządów takich jak płuca, wątroba, nerki czy serce [124–126]. Procesy zwłóknienia mają swój wkład również w patologię nowotworów i chorób autoimmunologicznych, takich jak sklerodermia, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Crohn'a, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, mielofibroza czy toczeń rumieniowaty układowy [126].



#### 4.1.2. Fibroblasty towarzyszące nowotworom, ich definicja i markery

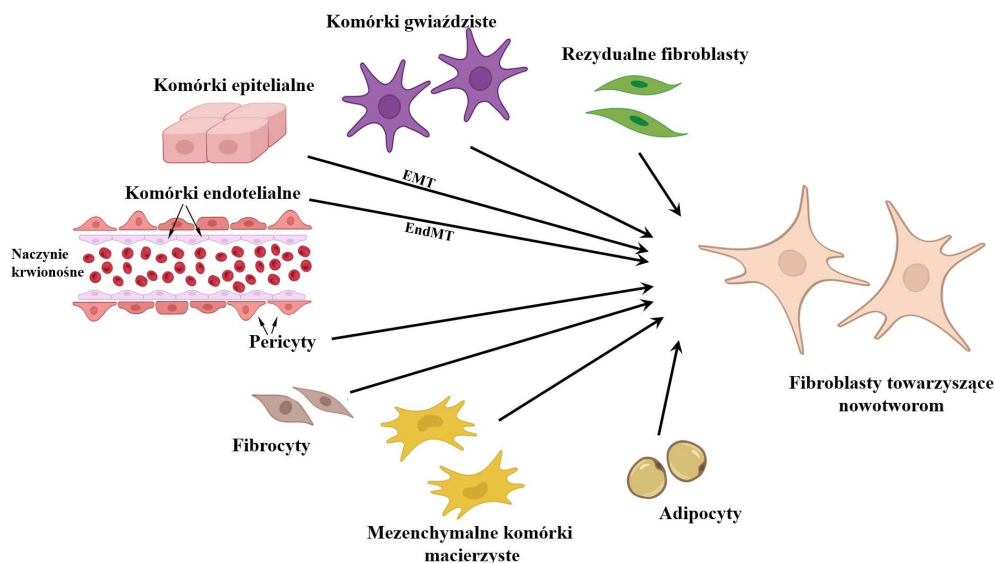
CAFs, podobnie jak NFs, definiuje się w oparciu o ich wrzecionowaty kształt i wykluczenie pochodzenia śródbłonkowego, nabłonkowego czy immunologicznego. Ważną cechą, odróżniającą CAFs od komórek nowotworowych, jest stabilny kariotyp i brak zmian genetycznych. CAFs, w przeciwieństwie do NFs, oddziałują z komórkami nowotworowymi, wspomagając progresję nowotworu przez serię różnych mechanizmów [117,118]. Miofibroblasty w procesie gojenia się ran ulegają przejściowej aktywacji, zaś CAFs raz aktywowane, zgodnie z hipotezą *Dvorak i wsp.*: „guz to rana, która nigdy się nie goi” [127], pozostają permanentnie aktywne. Określenie morfologii, lokalizacji tkankowej i wykluczenie markerów dla pochodzenia nabłonkowego, śródbłonkowego czy immunologicznego często uzupełniane jest przez określenie ekspresji markerów dla linii mezenchymalnej, np. wimentyny,  $\alpha$ SMA, białka aktywacji fibroblastów (FAP) czy receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa (PDGFR $\alpha$ ). W praktyce wszystkie komórki spełniające przedstawione cechy określa się jako CAFs [117,118,120,128]. Do tej pory nie udało się zidentyfikować unikalnego dla CAFs markera. Najczęściej wykorzystywanym w tym celu białkiem jest wspomniana  $\alpha$ SMA. Typowa także dla miofibroblastów, może występować również w zdrowych fibroblastach często na porównywalnym poziomie ekspresji. Ponadto komórki takie jak pericyty, kardiomiocyty czy komórki mięśni gładkich także charakteryzują się ekspresją  $\alpha$ SMA. Kolejnym, powszechnie stosowanym markerem do identyfikacji CAFs w rakach gruczołu sutkowego, płuc, jajnika czy trzustki jest FAP $\alpha$ , specyficzny także dla rezydualnych komórek mezodermalnych wielu tkanek. Dobrze zbadanym markerem CAFs jest białko specyficzne dla fibroblastów (FSP1), znane również jako S100A4 (białko wiążące wapń A4), aczkolwiek występuje ono także na powierzchni NFs, komórkach szpiku takich jak makrofagi czy komórkach nowotworowych podczas procesu EMT. Jako unikalne markery CAFs proponowano także antygen nerwowy/glejowy 2 (NG2), PDGFR $\beta$  oraz hydroksylazę 4-prolinową. NG2 jest białkiem typowym dla układu nerwowego, zaś PDGFR $\beta$  występuje w komórkach mięśni gładkich naczyń, mięśni szkieletowych oraz komórkach raka trzustki. [118,120]. Według aktualnego piśmiennictwa do markerów CAFs również należą: PDGFR $\alpha$ , wimentyna, podoplanina (PDPN), CD29, CD90, POSTN, tenascyna C (TNC), desmina, DDR2 (receptor 2 zawierający diskoidynę) i MFA5 (drugorzędowa podjednostka fimbrialna MFA5). Żaden z przedstawionych

markerów nie jest unikalny dla CAFs ani żaden z nich nie występuje we wszystkich typach CAFs [118–120,128].

#### 4.1.3. Pochodzenie fibroblastów towarzyszących nowotworom

Fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego są heterogenną populacją komórek. Mogą powstawać w wyniku przekształcenia komórek różnego pochodzenia, przedstawionych na rycinie 4. Powszechnie uważa się, że CAFs powstają w wyniku aktywacji rezydualnych fibroblastów tkanek w odpowiedzi na sygnały pochodzące z komórek nowotworowych, takie jak TGF $\beta$ , PDGF, czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2/bFGF), czynnik wzrostu naskórka (EGF), IL-1 i IL-6 [120,129,130]. Aktywacja receptora TGF typu 2 (TGF $\beta$ R2) prowadzi do indukcji szlaku sygnałowego Smad2/3 i ekspresji  $\alpha$ SMA, produkcji i remodelingu ECM [120,129]. OPN, poprzez wiązanie się z występującymi na powierzchni fibroblastów cząsteczkami CD44 i integryną  $\alpha$ v $\beta$ 3, może niezależnie od innych czynników indukować transformację fibroblastów do CAFs [131]. Komórki immunologiczne, dzięki wydzielaniu m.in. IL-1, IL-6 i czynnika hamującego białaczkę (LIF), pobudzają w fibroblastach szlaki sygnałowe NF- $\kappa$ B i STAT prowadząc do aktywacji CAFs i produkcji przez nie czynników pronowotworowych oraz prozapalnych [132–134]. Rozciąganie fibroblastów, będące wynikiem nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych, może indukować w komórkach transkrypcję czynników SRF (czynnik odpowiedzi surowicy) i YAP1-TEAD (regulator transkrypcyjny związany z Yes1), które stymulują CAFs do produkcji czynnika wzrostu tkanki łącznej (CTGF) i angiogenego induktora bogatego w cysteinę 61 (CYR61). Z kolei CTGF i CYR61 zwiększają sztywność ECM, co zamyka CAFs w samo-napędzającej się pętli [135,136]. CAFs mogą być generowane również w wyniku przekształcenia komórek gwiaździstych trzustki lub wątroby. Komórki gwiaździste są zaangażowane w regenerację narządu oraz w patologiczne zwłóknienie tkanek, będące stanem poprzedzającym wystąpienie zmian nowotworowych [119,120]. CAFs mogą powstawać także w wyniku przekształcenia komórek nabłonkowych na drodze procesu EMT. Komórki nabłonkowe przekształcają się w CAFs w wyniku utraty ekspresji E-kadheryny i aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej Ras i TGF $\beta$  [118,119]. Natomiast komórki śródbłonka mogą ulegać transformacji do CAFs w procesie tzw. przejścia śródbłonkowo-mezenchymalnego (EndMT) w odpowiedzi na TGF $\beta$  [137]. Kolejnym lokalnym źródłem CAFs mogą być pericyty, macierzyste komórki mezenchymalne obecne w ścianach naczyń krwionośnych, które ulegają przekształceniu w wyniku

stymulacji przez PDGF [138]. Adipocyty mogą nabywać fenotyp CAFs w wyniku aktywacji szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w odpowiedzi na wydzielane przez komórki raka gruczołu sutkowego białko 3a rodziny Wnt (Wnt3a) [139]. Fibrocyty, czyli pochodzące od monocytów krążące komórki mezenchymalne, zwykle są rekrutowane do miejsc przewlekłego zapalenia, one również mogą ulegać przekształceniu w CAFs [119,120]. Rekrutowane ze szpiku kostnego mezenchymalne komórki macierzyste mogą nabywać cechy CAFs w odpowiedzi na stymulację OPN lub TGF $\beta$ 1 [140,141].



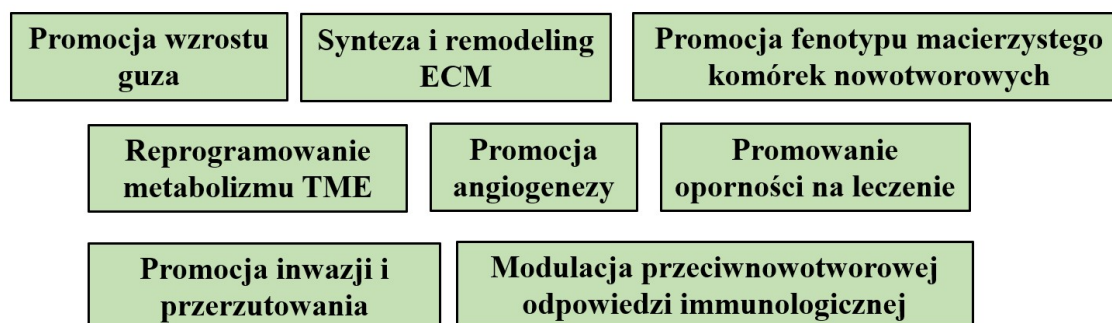
Rycina 4. Pochodzenie fibroblastów towarzyszących nowotworom. Opracowanie własne za pomocą Bioender, na podstawie [119].

#### 4.1.4. Funkcje fibroblastów towarzyszących nowotworom w rakach gruczołu sutkowego

Fibroblasty towarzyszące nowotworom, będące najliczniejszą populacją komórek stromy raka gruczołu sutkowego, pełnią wszechstronną rolę w progresji nowotworu [142]. Poprzez przebudowę ECM, promowanie tworzenia naczyń krwionośnych, indukowanie charakteru macierzystego komórek nowotworowych, ich proliferacji, migracji i inwazji uczestniczą w oporności na terapię i wspierają powstawanie przerzutów [143,144]. CAFs mogą również modulować metabolizm w komórkach nowotworowych oraz modyfikować przeciwnowotworową odpowiedź odpornościową poprzez interakcje z otaczającymi komórkami [145,146]. Działania te realizują przy pomocy wydzielanych zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu, cytokin i egzosomów. Funkcje CAFs w rakach gruczołu sutkowego podsumowano na Rycinie 5. Cechą charakterystyczną CAFs, podobnie jak zdrowych fibroblastów, jest synteza i przebudowa ECM. W wyniku aktywności oksydazy lizozymowej (LOX) i postępującego sieciowania kolagenu, skutkującego zwłóknieniem tkanki, ECM ulega usztywnieniu [147]. Stymulowane przez

komórki nowotworowe CAFs produkują TNC [148], która blokuje wiązanie komórek nowotworowych do fibronektyny poprzez syndekan-4, co skutkuje osłabieniem adhezji komórek raka gruczołu sutkowego [148]. Wydzielany przez CAFs czynnik FGF2 aktywuje w komórkach raka gruczołu sutkowego ekspresję cykliny D, ważnej dla progresji cyklu komórkowego [149]. Zwłóknienie tkanki, utrata adhezji, progresja cyklu komórkowego promują wzrost i przeżycie komórek raka gruczołu sutkowego [147–149].

#### Funkcje fibroblastów towarzyszących nowotworom



Rycina 5. Funkcje CAFs. Opracowanie własne.

CAFs mogą promować wzrost raka gruczołu sutkowego również dzięki wydzielaniu szeregu innych czynników wzrostu, cytokin czy chemokin [142,150]. Stymulowane aktywnością LOX sieciowanie kolagenu może prowadzić do zwiększonej kolonizacji komórek raka gruczołu sutkowego w miejscach przerzutowania [147]. Uczestniczące w degradacji ECM metaloproteinazy (MMPs) tworzą rusztowanie dla migracji komórek nowotworowych [151,152]. CXCL12, wydzielany w dużych ilościach przez CAFs, wzmacnia w komórkach raka gruczołu sutkowego ekspresję markerów fenotypu mezenchymalnego – wimentyny lub N-kadheryny oraz zmniejsza ekspresję białka charakterystycznego dla fenotypu nabłonkowego – E-kadheryny [153,154]. Według *Dvorak i wsp.* CXCL12 prowadzi również do rozpadu cytoszkieletu F-aktynowego, skutkując zwiększoną mobilnością komórek raka gruczołu sutkowego [155]. Poza proteolizą ECM MMPs mogą uwalniać aktywną formę TGF $\beta$  z ECM oraz inaktywować E-kadherynę [156]. Ponadto CAFs wydzielają egzozozomy zawierające microRNA (miR). miR-21, miR-378e i miR-14 mogą być przeniesione z CAFs do komórek raka gruczołu sutkowego, promując w tych komórkach fenotyp EMT [157]. Wspomniane procesy promują w komórkach raka gruczołu sutkowego migrację, inwazję, wynaczynienie czy proces EMT, leżące u podstaw przerzutowania [153,154]. Co więcej, edukowane przez CAFs makrofagi wydzielają TGF $\beta$ , dzięki któremu promują migrację, inwazję i EMT w komórkach raka gruczołu sutkowego [158,159]. CAFs pełnią również istotną rolę

w formowaniu niszy przedmetastatycznej w miejscu przerzutowania [160]. Poza produkcją strukturalnych komponentów ECM, takich jak kolagen czy fibronektyna, CAFs produkują białka niestrukturalne, m.in. TNC i POSTN [161]. We wczesnym etapie przerzutowania w raku gruczołu sutkowego ER<sup>-</sup>, POSTN rekrutuje MDSCs do miejsc przerzutowania w płucach, gdzie MDSCs kreują immunosupresyjne mikrośrodowisko, korzystne dla rozwoju przerzutów [162]. Białka produkowane przez FAP<sup>+</sup> CAFs w miejscach przerzutowania - VEGF i TNC - zapewniają komórkom nowotworowym przeżycie i sprzyjające progresji powstawanie nowych naczyń krwionośnych [163]. Co więcej, dzięki wydzielanemu SDF-1 (CXCL12), CAFs rekrutują progenitorowe komórki śródbłonna [164]. CAFs mogą również zwiększać potencjał do angiogenezy komórek śródbłonna [165]. Zaś edukowane przez CAFs makrofagi towarzyszące nowotworom (TAMs) produkują VEGF, dzięki któremu stymulują angiogenezę [158,159]. Ponadto POSTN aktywuje w naciekających komórkach nowotworowych szlak Wnt, ważny dla utrzymania fenotypu macierzystego [166]. *Wang i wsp.* zaobserwowali, że medium zebrane z hodowli CAFs stymuluje tworzenie mammosfer w hodowlach linii raka gruczołu sutkowego MCF-7 [167]. Ponadto CAFs zwiększają w komórkach nowotworowych ekspresję ALDH i CD44 – markerów charakteryzujących CSCs [167]. Efekt ten wynika prawdopodobnie z wydzielanego przez CAFs liganda chemokiny motywu C-C 2 (CCL2) i aktywowanego przez niego w komórkach nowotworowych szlaku NOTCH1 [168]. Wydzielane przez CAFs egzosomy zawierające miR-21, miR-378e i miR-14 również promują macierzysty charakter komórek raka gruczołu sutkowego [157]. Według *Su i wsp.* populacja CAFs CD10<sup>+</sup>GPR77<sup>+</sup> poprzez utrzymywanie charakteru macierzystego komórek nowotworowych może promować chemiooporność raka gruczołu sutkowego [169]. Według innych badań wydzielany przez CAFs FGF5 prowadzi do nabycia przez komórki raka gruczołu sutkowego fenotypu CSCs i w konsekwencji oporności na chemioterapię [170]. Poprzez wiązanie się ze swoim receptorem FGF5 może aktywować HER2, prowadząc do oporności na terapię skierowaną przeciwko HER2 [171]. Ponadto ECM może stanowić fizyczną barierę dla komórek odpornościowych oraz dla transportu leków [172]. Oporność na terapię może być również rezultatem zmian zachodzących w metabolizmie CAFs i komórek raka gruczołu sutkowego. Komórki raka gruczołu sutkowego promują w CAFs hipoksję, która prowadzi do degradacji kaweoliny 1 (CAV1) [173]. Obniżenie poziomu CD36 i CAV1 w CAFs stabilizuje czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1 $\alpha$ ), prowadząc do przełączenia metabolizmu z mitochondrialnej

fosforylacji oksydacyjnej na tlenową glikolizę. CAFs zaczynają korzystać z tzw. „efektu Warburga” [174]. Co więcej, według *Becker i wsp.* zmiany metaboliczne wiążące się ze zwiększoną aktywnością glikolityczną wynikają ze zmian epigenetycznych w kluczowym dla tego procesu HIF-1 $\alpha$  [175]. W wyniku „efektu Warburga” CAFs wydzielają duże ilości mleczanów, ciał ketonowych czy glutaminy. Produkty CAFs działają jako parakrynne onko-metabolity i zasilają tlenowy metabolizm w mitochondriach komórek nowotworowych, co z kolei nazywane jest „odwrotnym efektem Warburga” [120,176,177]. Wzajemne oddziaływanie komórek nowotworowych i CAFs umożliwia biosyntezę nukleotydów, przyspieszając proliferację komórek nowotworowych [118,178]. W odpowiedzi na duże ilości produkowanych przez CAFs ciał ketonowych, pirogranianu i mleczanów zwiększa się aktywność metaboliczna w komórkach raka gruczołu sutkowego co może przyczyniać się do powstawania oporności na tamoksifen lub terapie celowane w receptor HER-2 [173,179].

Niektóre populacje CAFs mogą regulować przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną [158]. FAP<sup>+</sup> CAFs, dzięki wydzielaniu CXCL12, rekrutują limfocyty T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> a następnie indukują ich różnicowanie w kierunku komórek regulatorowych CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, w rezultacie hamując funkcje efektorowe limfocytów T [172]. Wydzielane przez CAFs CCL2, CXCL12, CXCL16, IL-6 i TGF $\beta$  promują rekrutację monocytów/makrofagów do TME oraz ich polaryzację do MDSCs i makrofagów typu M2 [159,180–184]. Makrofagi, w TME określane często jako TAMs, wykazują ekspresję PD-1 o aktywności immunosupresyjnej [159]. Zaś, kierowane IL-6 i TGF $\beta$  generowanie MDSCs, makrofagów M2 i rekrutowanie limfocytów T regulatorowych odbywa się kosztem różnicowania komórek dendrytycznych [182,185].

Poza omówionymi w tym rozdziale pronowotworowymi funkcjami CAFs należy wspomnieć o pojawiających się doniesieniach naukowych dotyczących ich aktywności przeciwnowotworowej. *Özdemir i wsp.* wykazali, że usunięcie komórek  $\alpha$ SMA-dodatnich ze środowiska mysiego raka trzustki przyspiesza progresję nowotworu oraz zwiększa odsetek komórek CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub>, indukując immunosupresję [186]. Ponadto *Rhim i wsp.* zaobserwowali, że wyciszenie ekspresji białka homologa sonic hedgehog (Shh), istotnego dla generacji reaktywnej stromy bogatej w CAFs, zwiększa agresywność raka trzustki [187]. Inne obserwacje wskazują, że charakter przeciwnowotworowy CAFs we wczesnych zmianach nowotworowych ulega zmianie podczas progresji nowotworu i zwiększającego się dostępu do czynników wydzielanych przez złośliwe komórki guza [117,176,177].

## 5. Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty

Fibroblasty, obok m.in. adipocytów i makrofagów, stanowią najliczniejszą populację komórek tkanki łącznej i ich rolą jest wydzielanie składowych ECM – produkują one wszystkie jej komponenty – białka strukturalne, adhezyjne i wypełniającą przestrzeń tzw. istotę międzykomórkową złożoną z proteoglikanów i glikozaminoglikanów. Podczas postępującego uszkodzenia tkanki fibroblasty ulegają aktywacji, w wyniku której zaczynają proliferować, nabywają zdolności kurczliwe i wydzielają jeszcze większe ilości ECM. Nadmierna akumulacja macierzy zewnątrzkomórkowej może prowadzić do stałego bliznowacenia i usztywnienia tkanki – nieodwracalnego zwłóknienia, które prowadzi do dysfunkcji narządu a nawet jego pełnej niewydolności [124–126]. Witamina D<sub>3</sub> może skutecznie przeciwdziałać wspomnianej reakcji. Według piśmiennictwa kalcytriol hamuje aktywność miofibroblastów i szlaki sygnałowe związane z TGFβ1 [188–190]. TGFβ1 jest głównym aktywatorem procesów fibroproliferacyjnych tak, jak i induktorem procesów EMT i EndEMT, dzięki którym poza fibroblastami rezydualnymi, ważnym źródłem miofibroblastów są również komórki nabłonka i śródbłonka [189,191]. *Slominski i wsp.*, pracując na ludzkich pierwotnych fibroblastach pochodzących od pacjentów chorujących na twardzinę układową, zaobserwował, że kalcytriol hamuje indukowaną TGFβ1 syntezę kolagenu i kwasu hialuronowego [192]. Zaś według *Tao i wsp.* kalcytriol może obniżać ekspresję αSMA i produkcję kolagenu indukowaną TGFβ1 w miofibroblastach choroby zapalnej jelit [188]. Polipy nosa, poza nadmierną proliferacją fibroblastów i nadprodukcją składowych ECM, charakteryzuje reakcja zapalna wynikająca z akumulacji komórek zapalnych. Witamina D<sub>3</sub> działa na fibroblasty polipów nosa poprzez zahamowanie w nich produkcji cytokin prozapalnych, tj. IL-6 i IL-8 [193]. Kalcytriol może regulować przebudowę ścian układu oddechowego poprzez obniżenie poziomu kluczowej dla rozwoju astmy limfopoetyny zrębu grasicy w fibroblastach płuc, białka pośredniczącego w aktywacji ekspresji kolagenu typu 1 oraz MMP1 zależnej od sygnału Erk1/2 i STAT3 [194]. Zaś stymulacja analogiem kalcytriolu - oksykalcytolem mysich fibroblastów skóry może zapobiec indukowanej IL-4, IL-13 lub TGFβ ekspresji kolagenu 1α1 lub POSTN [195]. Ponadto różnicowanie fibroblastów i komórek śródbłonka (poprzez EndMT) do miofibroblastów może być blokowane poprzez zależne od kalcytriolu zahamowanie szlaku SMAD2 [196]. Według *Tsai i wsp.* kalcytriol może osłabiać rozwój włóknienia mięśnia sercowego *in vivo* oraz obniżać ekspresję składowych ECM [196]. Zaś według *Terao i wsp.* oksakalcytol zapobiega

rozwojowi włóknienia w mysim modelu twardziny układowej [197]. Kalcytriol, poprzez redukcję odkładania się ECM, łagodzi rozwój zwłóknienia wątroby w modelach szczurzych [198], jak i mysich *in vivo* [199]. Co więcej, zastosowanie podań kalcytriolu przed indukcją włóknienia może niemalże całkowicie zapobiec rozwojowi tej patologii [199]. Komórki gwiaździste pełnią istotną rolę we włóknieniu narządów i stanowią źródło aktywowanych fibroblastów. *Potter i wsp.* zaobserwowali, że stymulacja kalcytriolem hamuje ekspresję i produkcję kolagenu przez ludzkie komórki gwiaździste aktywowane TGFβ1 [200]. *Abramovitch i wsp.* opisał zależne od kalcytriolu zahamowanie proliferacji pierwotnych komórek gwiaździstych wątroby stymulowanych PDGF, jak i zmniejszenie ekspresji cykliny D1 istotnej dla progresji cyklu komórkowego [198]. Zaś według *Ding i wsp.* aktywacja VDR przeciwstawia się indukcji szlaku TGFβ/SMAD, hamując ekspresję wielu genów, m.in. MMPs, tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs), integryn oraz oksydazy lizylowej [199]. Witamina D<sub>3</sub> i jej analogi mają również udokumentowane działanie w rozwoju śródmiąższowego włóknienia nerek [201–203]. Według *Tan i wsp.* [201] oraz *Arfian i wsp.* [202] podania witaminy D<sub>3</sub> lub jej analogu - parykalcytolu chronią przed rozwojem włóknienia nerek *in vivo*, co zaobserwowano poprzez zmniejszenie objętości śródmiąższowej nerek, ograniczenie odkładania się kolagenu oraz zmniejszenie ekspresji fibronektyny i kolagenu typu 1 i 3 [201,202]. Podawanie myszom parykalcytolu skutkowało również zachowaniem ekspresji E-kadheryny i obniżeniem poziomu αSMA, TGFβ1, TGFR1 w kanalikach nerek oraz ekspresji SNAIL1 w nerkach. Według *Tao i wsp.* właściwa suplementacja witaminy D<sub>3</sub> może zapobiegać również rozwojowi choroby zapalnej jelit poprzez osłabienie – związanej z patogenezą tej choroby - produkcji ECM i kolagenu w jelitach oraz poprzez obniżenie aktywacji miofibroblastów (obniżenie ekspresji TGFβ1, członka 3 rodziny SMAD (SMAD3), ufosforylowanego SMAD3 (p-SMAD3), kolagenu typu 1) [188].

Wnioskując na podstawie przedstawionych publikacji, witamina D<sub>3</sub> i jej analogi hamują aktywację miofibroblastów (poprzez wpływ na różnicowanie fibroblastów, komórek nabłonka i śródbłonka) [188,196], ograniczają gromadzenie się ECM (kolagenu, fibronektyny, POSTN) [188,192,193,195,197,200], jej przebudowę (MMPs, TIMPs) [194,199] oraz blokują wydzielanie czynników prozapalnych (IL-6, IL-8) [193] prawdopodobnie poprzez zakłócenie ścieżek sygnałowych, takich jak TGFβ/SMAD, Erk1/2 i STAT3 [188,194,199].



## 6. Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom

Fibroblasty towarzyszące nowotworom według licznych doniesień naukowych pełnią istotną rolę w każdym etapie rozwoju i progresji nowotworu. Mimo to wpływ witaminy D<sub>3</sub> czy też jej aktywnej biologicznie formy, kalcytriolu, na CAFs został zbadany przez niewielu autorów. Dotychczas publikacje opisały działanie kalcytriolu lub jego analogów na CAFs raka trzustki [204–207], okrężnicy [121,208] czy gruczołu sutkowego [209–211].

Już w 1995 i 1999 roku *Lefebvre i wsp.* [210] oraz *Gache i wsp.* [211] podjęli próby zbadania wpływu kalcytriolu na aktywność CAFs promującą proliferację komórek ludzkiego raka gruczołu sutkowego. *Lefebvre i wsp.* zaobserwowali, że ko-hodowla CAFs izolowanych z biopsji guza gruczołu sutkowego z komórkami raka gruczołu sutkowego (BT-20 lub MCF-7) stymuluje wzrost komórek nowotworowych, zaś dodanie kalcytriolu obniża proliferację komórek nowotworowych nawet poniżej kontroli komórek niestymulowanych kalcytriolem [210]. *Gache i wsp.* potwierdzili zaobserwowane wcześniej zależności [211]. Zarówno kalcytriol, jak i jego analog EB 1089 zmniejszyły proliferację komórek raka gruczołu sutkowego MCF-7 stymulowaną medium kondycjonowanym (CM; zarówno z CAFs, jak i NFs), nawet poniżej kontroli komórek niestymulowanych CM. *Campos i wsp.* podjęli się zbadania wpływu kalcytriolu na CAFs i NFs pochodzących od tych samych pacjentek z naciekającym rakiem przewodowym gruczołu sutkowego [209]. Mimo że kalcytriol reguluje obszerną grupę genów wspólnych dla tych obu populacji komórek, charakteryzuje je różny profil transkrypcyjny po stymulacji kalcytriolem. W przypadku CAFs kalcytriol reguluje aż 123 geny o działaniu antyproliferacyjnym i przeciwzapalnym, między innymi zmniejsza ekspresję neureguliny 1 (*NRG1*), płytkopochodnego czynnika wzrostu C (*PDGFC*), jak i białka 5a z rodziny Wnt (*WNT5A*) stymulujących proliferację komórek oraz zwiększa ekspresję fosfatazy aktywującej kinazę białkową aktywowaną mitogenami (MAPKs) - *DUSP1* oraz inhibitora *NF-κB* - *NFκBIA* [209]. Wyniki przedstawione w pracy *Campos i wsp.* dotyczą wpływu niefizjologicznego stężenia kalcytriolu (100nM); stosując 0,5nM kalcytriol autorzy nie znaleźli podobnych zależności. Badaniu temu również brakowało testów funkcjonalnych potwierdzających różnice zaobserwowane podczas analizy ekspresji mRNA [209].

*Ferrer-Mayorga i wsp.* zaobserwowali pozytywną korelację wysokiej ekspresji VDR w komórkach CAFs ze współczynnikiem przeżycia całkowitego u pacjentów z rakiem

okrężnicy [121]. Ponadto globalna analiza transkryptomu losowo wybranych par hodowli pierwotnych CAFs i NFs stymulowanych 100nM kalcytriolem pozwoliła na odkrycie genów regulowanych odmiennie przez kalcytriol. Autorzy wykazali, że 21% genów o zmienionej ekspresji jest wspólna dla tych obu populacji: 53% występuje tylko u CAFs, zaś 26% tylko u NFs – sugerując, że kalcytriol wykazuje działanie ogólne skierowane zarówno na NFs i CAFs, jak i specyficzne dla danego typu komórek. Do genów regulowanych kalcytriolem należą głównie geny kodujące składniki ECM oraz cytokiny biorące udział w procesach adhezji, różnicowania i migracji komórek, przebudowie tkanek, odpowiedzi zapalnej oraz rozwoju naczyń krwionośnych (indukcja ekspresji *CHRDL1* (białka podobnego do chordyny), *NID2* (nidogen 2), *SEMA3B* (semaforyny 3B), *TIMP3* (tkankowego inhibitora metaloproteinaz 3), *CD82*, redukcja ekspresji *CCL11* (liganda 11 chemokiny motywu C-C), *CCL13* (liganda 13 chemokiny motywu C-C), *S100A4*, *CYTL1* (białka podobnego do cytokiny 1), *CCL2*). Dodatkowo Ferrer-Mayorga i wsp. wykazali, że kalcytriol hamuje zdolność fibroblastów (CAFs i NFs) do kontrakcji żelu kolagenowego (a zatem ich aktywacji) oraz parakrynej promocji migracji komórek nowotworowych. Przedstawione przez Ferrer-Mayorga i wsp. dane wyraźnie wskazują na supresyjne działanie kalcytriolu na fenotyp i aktywność fibroblastów pochodzących z tkanek zdrowych i guzów [121]. W swoich kolejnych badaniach Ferrer-Mayorga i wsp. potwierdzili tą obserwację w przypadku miofibroblastów jelita grubego linii CDD-18Co oraz ludzkich pierwotnych CAFs [208]. Kalcytriol hamował proliferację i migrację komórek linii CDD-18Co (miofibroblastów jelita grubego) oraz ich zdolność do kontrakcji żelu kolagenowego. Stymulacja CDD-18Co za pomocą 100nM kalcytriolu pozwoliła również na określenie szeregu genów regulowanych przez kalcytriol, między innymi *TIMP3*, *OSR1* (białko powiązane z nieparzystym pomijaniem 1), *OSR2* (białko powiązane z nieparzystym pomijaniem 1), *CPLX2* (kompleksyna 2), *NKD1* (naga kutykula 1), *NKD2* (naga kutykula 2), *WNT16* (białko 16 z rodziny Wnt), *PDG* (dehydrogenaza fosfoglukonianu), *SLCO2B1* (członek rodziny transporterów anionów organicznych 2B1 rozpuszczonego nośnika) (stymulacja) i *AMIGO2* (białko indukowane amfoteryną), *ANXA1* (aneksyna 1) (represja), uczestniczących w procesach progresji nowotworu, inwazji, proliferacji, migracji, apoptozy komórek nowotworowych czy przebudowywaniu tkanek. Zaobserwowany wpływ kalcytriolu na migrację fibroblastów i ekspresję wybranych genów został potwierdzony na pierwotnych CAFs i NFs pochodzących od pacjentów chorujących na raka okrężnicy oraz na liniach komórkowych fibroblastów różnego

pochodzenia – BJ-hTERT (ludzkie fibroblasty napletka) i IMR-90 (ludzkie fibroblasty płuc) [208].

Pracując na komórkach raka trzustki PANC-1 i SW1990, *Kong i wsp.* zaobserwowali, że stymulacja kalcytriolem obniża w CAFs sekrecję egzosomów zawierających miR-10a-5p o działaniu promującym migrację i inwazję [205]. *Gorchs i wsp.* zaobserwowali, że analog kalcytriolu, kalcyptriol, nie hamuje aktywacji CAFs raka trzustki, ale może osłabiać ich pronowotworową aktywność i regulować wpływ CAFs na limfocyty T [207]. Stymulacja kalcyptriolem wywierała inny wpływ na ekspresję markerów aktywacji (tj.  $\alpha$ SMA i PDPN) w przypadku modelu 2D (obniżenie ekspresji mRNA  $\alpha$ -aktyny 2 (*ACTA2*) kodującej  $\alpha$ SMA, wzrost  $\alpha$ SMA i PDPN na poziomie białka) i 3D (brak wpływu na ekspresję) oraz nie zmieniała zdolności CAFs do kontrakcji żelu kolagenowego. Kalcyptriol zredukował proliferację, migrację CAFs oraz sekrecję pronowotworowych czynników tj. IL-6, POSTN, prostoglandyny E2 i LIF. Ponadto analog witaminy D<sub>3</sub> zwiększył ekspresję liganda receptora programowanej śmierci 1 (PD-L1) w CAFs, a jego immunosupresyjne działanie na komórki CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> zostało pogłębione w obecności CAFs [207]. Przedstawione przez *Gorchs i wsp.* wyniki dotyczące wpływu witaminy D<sub>3</sub> na aktywację CAFs są przeciwstawne do wyników *Mukai i wsp.* [206] oraz *Sherman i wsp.* [204], pracujących na komórkach gwiazdzistych trzustki (PSCs) - znanych prekursorów CAFs w nowotworach trzustki. *Mukai i wsp.* powiązał zastosowanie przedoperacyjnej chemioradioterapii oraz niski poziom 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu pacjenta z wysoką ekspresją  $\alpha$ SMA, która z kolei korelowała z krótkim czasem wolnym od przerzutów [206]. W PSCs wyprowadzonych od pacjentów z niskim poziomem 25(OH)D<sub>3</sub> i przedoperacyjną chemioradioterapią zaobserwowano znacznie wyższą ekspresję  $\alpha$ SMA niż w PSCs pochodzących od grupy pacjentów, którzy nie przeszli leczenia lub mieli wysoki poziom witaminy D<sub>3</sub>. Stymulacja kalcytriolem *in vitro* osłabiła ekspresję  $\alpha$ SMA w aktywowanych napromieniowaniem PSCs oraz przywróciła im zdolność wytwarzania kropli tłuszczu, charakterystyczną cechę spoczynkowych komórek gwiazdzistych [206]. *Sherman i wsp.* zaobserwowali, że suplementacja myszy kalcyptriolem wiąże się ze zmniejszoną aktywacją stromy oraz zmniejszonym procesem włóknienia, stanem poprzedzającym rozwój raka trzustki [204]. Podania kalcyptriolu wywołały zmianę w ekspresji genów biorących udział w aktywacji PSCs (tj. białka wiążącego kwasy tłuszczowe 4 – *Fabp4*, markera stanu spoczynkowego tych komórek) oraz poprawiły wewnątrzguzowe stężenie gemcytabiny i unaczynienie guza, zwiększając skuteczność terapii. Stymulacja *in vitro* aktywowanych PSCs kalcyptriolem (100nM)

skutkowała obniżeniem proliferacji i aktywacji PSCs oraz zmianami w profilu ekspresji genów – zmniejszeniu uległa ekspresja mRNA inhibitora angiogenezy - trombospondyny 1 (*Thbs1*) a zwiększeniu ekspresja jej induktora (*Mmp9*). Co więcej, stymulacja kalcypotriolem CAFs wyizolowanych z ludzkich guzów skutkowała obniżeniem ekspresji  $\alpha$ SMA w 24 na 27 wyizolowanych hodowli oraz przywróceniem fenotypu spoczynkowego (zdolności do tworzenia kropli lipidów) w 19 hodowlach [204]. *Sherman i wsp.* pokazali, że kalcypotriol indukuje wiązanie VDR do rejonów promotorowych genów związanych z włóknieniem tkanek kosztem przyłączenia SMAD3 [204]. Co więcej, medium z CAFs stymulowanych kalcypotriolem znacząco zmieniło profil ekspresji genów komórek ludzkiego raka trzustki MIA PaCa-2 – obniżeniu uległa ekspresja genów odpowiedzialnych za proliferację, przeżycie, EMT i chemiooporność [204].

Podsumowując, witamina D<sub>3</sub> (a właściwie kalcypotriol lub jego analogi) może wpływać na CAFs poprzez: (1) osłabienie aktywacji CAFs/PSCs (obserwowanej jako obniżenie ekspresji  $\alpha$ SMA, zdolności do kontrakcji żelu kolagenowego albo przywrócenie spoczynkowego fenotypu PSCs) [121,204,206,208], (2) redukcję ich potencjału do proliferacji i migracji [204,207,208], (3) hamowanie ich właściwości promigracyjnych i proinwazyjnych w komórkach nowotworowych [121,205,210,211], (4) obniżenie chemiooporności [204,206], (5) modyfikację aktywacji i funkcji efektorowych limfocytów T [207,209] czy też (6) regulację ekspresji genów odpowiadających za procesy takie jak: adhezja, apoptoza, proliferacja, migracja, przebudowa ECM, odpowiedź zapalna czy rozwój naczyń krwionośnych [121,204,208,209].

## ZAŁOŻENIE I CELE PRACY

Witamina D<sub>3</sub> odgrywa istotną rolę w modulacji funkcji komórek nowotworowych w procesach wzrostu, progresji i przerzutowania raka gruczołu sutkowego. Ma ona również duże znaczenie w modulacji aktywności fibroblastów towarzyszących procesom włóknienia. Mimo to rola witaminy D<sub>3</sub> w modulacji funkcji fibroblastów towarzyszących nowotworom gruczołu sutkowego nie została do tej pory dokładnie wyjaśniona, dlatego też celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie wpływu witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego. Aby zrealizować ten cel, wykorzystano: 1) myszy zdrowe oraz obarczone dobrze scharakteryzowanymi komórkami raków gruczołu sutkowego, karmione dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i otrzymujące doustnie kalcytriol oraz 2) tkanki guzów pobrane od pacjentek o zróżnicowanym poziomie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> w osoczu.

### BADANIA Z WYKORZYSTANIEM MYSICH MODELI RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Celem pierwszego etapu badań była ocena wpływu deficytu lub suplementacji witaminy D<sub>3</sub> w diecie, a także doustnego podawania aktywnego metabolitu witaminy D<sub>3</sub> (kalcytriolu) na fibroblasty towarzyszące rakom gruczołu sutkowego. Pośrednie cele obejmowały:

1. Izolację i charakterystykę fibroblastów z guzów i płuc myszy obarczonych komórkami raka gruczołu sutkowego: 4T1, 67NR i E077 oraz z płuc myszy zdrowych.
2. Ocenę wpływu witaminy D<sub>3</sub> na proces aktywacji *ex vivo* fibroblastów pochodzących z płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c i C57BL/6.

### BADANIA NA LUDZKICH TKANKACH RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Celem drugiego etapu było określenie wpływu witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące rakom gruczołu sutkowego w zależności od poziomu witaminy D<sub>3</sub>, statusu menopauzalnego pacjentek i obecności przerzutów. Pośrednie cele obejmowały:

1. Izolację fibroblastów z guzów pacjentek i ocenę poziomu białek charakterystycznych dla CAFs w świeżo wyizolowanych komórkach.
2. Wyprowadzenie hodowli pierwotnych CAFs.
3. Ocenę wpływu stymulacji kalcytriolem *ex vivo* na CAFs pacjentek o różnym statusie menopauzalnym, poziomie witaminy D<sub>3</sub> i obecności przerzutów.
4. Ocenę wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na właściwości ludzkich komórek raka gruczołu sutkowego z wykorzystaniem komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 *in vitro*.

## MATERIAŁY I METODY

## 7. Odczynniki

Tabela 1. Odczynniki zastosowane w badaniach oraz ich pochodzenie.

Odczynniki	Pochodzenie
Przeciwciała do cytometrii (anty aSMA PE), przeciwciała do mikroskopii fluorescencyjnej (anty FAP, drugorzędowe kozie anty-królicze Alexa Fluor 488), przeciwciała do Western-Blot (anty-CYP27B1, anty-CYP24A1)	Abcam, Cambridge, UK
TaqMan™ Array Cards	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Calf Bovine Serum (CBS)	ATCC, Manassas, USA
Etanol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 10 mM TRIS, kwas octowy, metanol, paraformaldehyd	Avantor Performance Materials Poland (dawniej POCH), Gliwice, Polska
Izofluran	Baxter, Deerfield, Niemcy
Przeciwciała anty CD45 PerCp/Cy5.5,	BD Biosciences, San Jose, USA
Anty-ludzkie przeciwciała do cytometrii (anty: CD31 BV-421, CD45 FITC, EpCAM PE/Cy7, FSP1 PerCP/Cy5.5, PDGFRβ APC, Podoplanina PE/Dazzle™ 594), anty-mysie przeciwciała do cytometrii (anty: CD31 BV-421, CD90.2 PerCP/Cy5.5, EpCAM FITC, PDGFRβ APC, Podoplanin PE-Cy7), bFGF, Fixation Buffer, Human TruStain FcX, Intracellular Staining Perm Wash Buffer, TGFβ1, Mouse TruStain FcX,	BioLegend, San Diego, USA
4x Laemmli sample buffer, Quick Start Bio-Rad Protein Assay, BSA, iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
Zestawy ELISA: CXCL12, HGF	Biorbyt, Cambridge, UK
TEMED	BioShop, Burlington, Kanada
Przeciwciała anty VDR	Bioss Antibodies, Woburn, USA
Kalcytriol	Cayman Chemical, Michigan, USA
DAPI, DyLight™ 554 Phalloidin	Cell-Signaling, Danvers, USA
Ham's F12	Corning, New York, USA
DMEM, HS (Horse Serum)	Gibco, New York, USA
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, SimplyBlue™ SafeStain, SuperScript™ IV VILO Master Mix, Zestawy ELISA do oceny stężenia białek w lizatach: CCL-2, OPN, SDF-1, TGFβ1, VEGF, Zestawy ELISA do oceny stężenia białek w supernatantach: CCL2, MMP9, TGFβ1, TNC, Zymogram Developing Buffer, Zymogram Renaturing Buffer	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA
Primocin	InvivoGem, San Diego, USA
Membrany PVDF, NP-40	Merck, Darmstadt, Niemcy
Anti-Fibroblast MicroBeads	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Przeciwciała anty Tenascin C Alexa Fluor 700, przeciwciała anty vimentin	Novus Biologicals, Centennial, USA
1M roztwór TRIS-HCl o pH=8,8, PBS, PBS Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> , RPMI+HEPES, TBS, TRIS-HCl o pH=8,8, TRIS-HCl o pH=6,8 Trypsyno-wersen o pH=8, woda MiliQ	PChO IITD, Wrocław, Polska
Penicylina	Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska
I rzędowe przeciwciała poliklonalne przeciwko: OPN, IDO1, TIMP1 i TGFβ1	Proteintech, Rosemont, USA
DNase I	Roche, Basel, Szwajcaria
II rzędowe przeciwciała monoklonalne IgG-HRP, monoklonalne przeciwciała anty β-actin (C4) HRP	Santa Cruz Biotechnology., Dallas, USA
Accutase solution, akrylamid/bis-akrylamid, Aminokwasy, APS, BSA, Collagenase from Clostridium histolyticum, DMSO, EDTA, EGFh, Fetal Bovine Serum (FBS), glukoza, hydrokortyzon, inhibitory fosfataz 2 i 3, inhibitory proteaz kwas p-kumarynowy, insulina, kwas trichlorooctowy, L-glutamina, luminol, MMP2, MMP9, pirogronian sodu, Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™, RIPA, streptomycyna, Sulforodamina B, toksyna cholery, TRI Reagent, Triton X-100, trypan Blue, Tween 20, woda DEPC,	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Fetal Bovine Serum (FBS) HyClone, RPMI Medium 1640—GlutaMAX, standard mas (Page Ruler)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasza AIN67	ZooLab, Sędziszów, Polska
Direct-zol™ RNA Miniprep	ZYMO RESEARCH, Tustin, CA, USA

## 8. Linie komórkowe

Do badań *in vivo* zostały wykorzystane mysie komórki linii nowotworowych – 4T1, 67NR, E0771, do badań *in vitro*, poza wspomnianymi liniami, wykorzystano również komórki linii ludzkiego raka gruczołu sutkowego MCF-7 i MDA-MB-231 (zebrane w tabeli 2). Wszystkie te linie stanowią część kolekcji linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Tabela 2. Charakterystyka komórek raka gruczołu sutkowego zastosowanych w eksperymentach.

Nazwa linii	Charakterystyka	Pochodzenie linii
4T1	Linia komórkowa mysiego raka gruczołu sutkowego wyprowadzona z myszy szczepu BALB/c; model nowotworu przerzutującego, zwierzęcy model IV stopnia zaawansowania ludzkiego raka gruczołu sutkowego typu podstawnego, potrójnie ujemnego (negatywne barwienie na ER $\alpha$ , PR, ErbB2/neu)	ATCC, Rockville, USA
67NR	Linia komórkowa mysiego raka gruczołu sutkowego, wyprowadzone z tego samego nowotworu co linia 4T1, model nowotworu nieprzerzutującego, model ludzkiego raka gruczołu sutkowego o charakterze luminalnym B (ER $\alpha$ -dodatni, PR-ujemny, ErbB2/neu-ujemny) [212]	Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Detroit, USA
E0771	Linia komórkowa mysiego raka gruczołu sutkowego wyprowadzona z myszy szczepu C57BL/6, model nowotworu słabo przerzutującego, zwierzęcy model ludzkiego raka gruczołu sutkowego luminalnego B (ER $\alpha$ -ujemny, PR-dodatni, ErbB2-dodatni) [213]	Podarunek od Dr. Andreas Möller (School of Medicine, University of Queensland; Tumour Microenvironment Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia)
MCF-7	Linia komórkowa ludzkiego raka gruczołu sutkowego, wyprowadzona w 1970 roku od 69-letniej pacjentki rasy kaukaskiej. Model raka gruczołu sutkowego typu luminalnego A (ER $\alpha$ - dodatni, PR-dodatni, HER2-ujemny)	ECACC, Salisbury, UK
MDA-MB-231	Linia komórkowa ludzkiego raka gruczołu sutkowego, wyprowadzona od 51-letniej pacjentki rasy białej. Model potrójnie ujemnego raka gruczołu sutkowego [214]	ATCC, Rockville, USA

Komórki linii nowotworowych hodowano w mediach hodowlanych właściwych dla danej linii (zebrane w tabeli 3) na plastikowych szalkach o średnicy 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) w inkubatorze zapewniającym odpowiednie warunki - 37°C, wilgotna atmosfera i 5% CO<sub>2</sub>. Pasaże wykonywano przy pomocy roztworu Trypsynow-sensu o pH=8 (PChO IITD, Wrocław, Polska), gdy hodowle osiągały 80-90%

konfluencji powierzchni naczynia hodowlanego. Żywotność komórek określano przy użyciu kamery Bürkera i roztworu Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Tabela 3. Skład medium hodowlanych dla poszczególnych hodowli komórkowych.

Nazwa linii lub hodowli pierwotnej	Skład medium hodowlanego
<b>4T1</b>	RPMI 1640 - GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 10% FBS HyClone (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 3.5g/L glukozy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 1mM pirogrogonianu sodu (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska)
<b>67NR</b>	DMEM (Gibco, Grand Island, New York, USA) 10% CBS (ATCC, Manassas, USA) 2,0mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 1% aminokwasów (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska)
<b>E0771</b>	DMEM (Gibco, Grand Island, New York, USA) 10% FBS HyClone (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 2,0mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska)
<b>NFs</b>	DMEM (Gibco, Grand Island, New York, USA) 10% FBS HyClone (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 4,0mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 1% aminokwasów (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100 U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska)
<b>CAFs</b>	Ham's F12 (Corning, New York, USA) 5% FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 5% HS (Gibco, Grand Island, New York, USA) 10µg/ml insuliny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 0,5µg/ml hydrokortyzonu (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 0,05µg/ml toksyny cholery (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 20ng/ml EGFh (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska) 1ng/ml bFGF (BioLegend, San Diego, USA) 10µl/5ml medium Primocin (InvivoGen, San Diego, USA)
<b>MCF-7</b>	Płyn Eagle'a (PChO IITD, Wrocław, Polska) 10% FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 2,0mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 1% aminokwasów (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 8µg/ml insuliny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska)
<b>MDA-MB-231</b>	RPMI+HEPES (PChO IITD, Wrocław, Polska) 10% FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 2,0mM L-glutaminy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100µg/mL streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) 100U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska)



## **9. Zwierzęta doświadczalne**

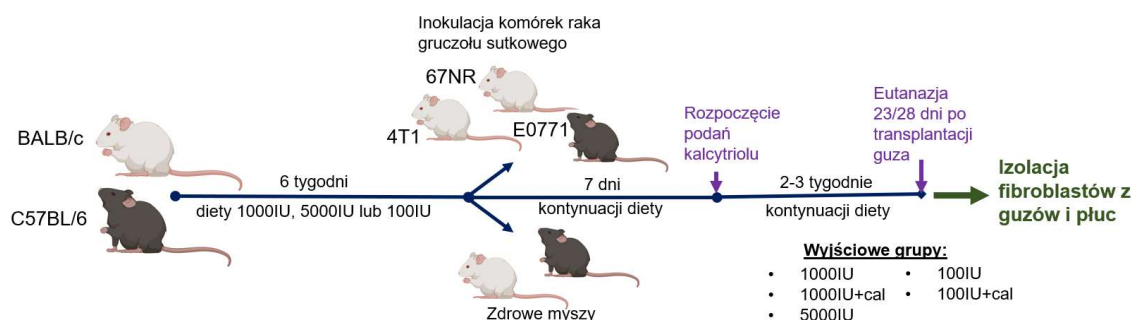
Badania *in vivo* zostały przeprowadzone na 6-8 tygodniowych samicach myszy szczepów wsobnych BALB/c oraz C57BL/6, ważących 20-25g. Myszy, zakupione od Charles River Laboratories (Sulzfeld, Niemcy), były utrzymywane w warunkach 12-godzinne go cyklu dobowego dzień/noc ze stałym dostępem do paszy i wody w Zwierzętarni Doświadczalnej IITD PAN we Wrocławiu. Wszelkie procedury i czynności pielęgnacyjne wykonywano w warunkach aseptycznych. Wszystkie eksperymenty na zwierzętach zostały przeprowadzone za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (nr uchwały 66/2018) oraz zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2010/63/EU na temat ochrony zwierząt laboratoryjnych wykorzystywanych do celów naukowych.

## 10. METODY

### 10.1. BADANIA NA MATERIALE POCHODZĄCYM OD MYSZY

#### 10.1.1. Badania *in vivo*

Badania *in vivo* zostały szczegółowo opisane w opublikowanym w 2020 roku artykule *Anisiewicz i wsp.* [77]. Podczas trwania całego eksperymentu *in vivo* myszy BALB/c oraz C57BL/6 karmiono paszą AIN67 (ZooLab, Sędziszów, Polska) o określonej zawartości witaminy D<sub>3</sub>: kontrolna ilość witaminy D<sub>3</sub> (1000IU/kg paszy), nadmiar (5000IU/kg paszy) lub niedobór witaminy D<sub>3</sub> (100IU/kg paszy). Po 6 tygodniach diety (dzień 0 eksperymentu) oraz potwierdzonej różnicy w poziomie metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy między grupami [77], część myszy zostało zaszczepione ortotopowo komórkami nowotworowymi: 4T1 (10<sup>4</sup> komórek/mysz) i 67NR (2x10<sup>5</sup> komórek/mysz) w przypadku myszy szczepu BALB/c, E0771 (5x10<sup>4</sup> komórek/mysz) w przypadku myszy C57BL/6. Siedem dni po zaszczepieniu (dzień 7 eksperymentu) część myszy otrzymujących paszę z zawartością kontrolną (1000IU) i z niedoborem witaminy D<sub>3</sub> (100IU) została poddana dodatkowemu traktowaniu kalcytriolem (1μg/kg masy ciała, bezpośrednia administracja za pomocą sondy do żołądka; Cayman Chemical, Michigan, USA), podawanie kalcytriolu kontynuowano 3 razy w tygodniu. Dnia 23 (myszy C57BL/6) lub 28 (myszy BALB/c) zakończono eksperyment *in vivo* - myszy znieczulono buprenorfiną (0,1 mg/kg masy myszy) i uśpiono za pomocą izofluranu (Baxter, Deerfield, Niemcy), w głębokim uśpieniu pobrano krew i uśmiercono przez dyslokację kręgów szyjnych. Celem dalszych analiz pobrano i zabezpieczono tkanki guza, wątroby, nerek i płuc. Schemat eksperymentu *in vivo* przedstawia Rycina 6.



Rycina 6. Schemat eksperymentu *in vivo*. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.

### 10.1.1.1. Analiza poziomu wybranych białek w lizatach z guzów za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA

#### 10.1.1.1.1. Przygotowanie lizatów z guzów

Zebrane podczas sekcji tkanki guza przeznaczono do izolacji fibroblastów (opis w kolejnych rozdziałach) i do analiz ekspresji białka za pomocą testów ELISA. Kawalek tkanki mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ . Celem przygotowania lizatów, tkanki rozmrażano na lodzie, ważono oraz przenoszono do probówek z kulką do homogenizacji, do której dodawano bufor lizujący RIPA z koktajlem inhibitorów fosfataz 2 i 3 oraz inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Próbkę dwukrotnie homogenizowano mechanicznie za pomocą homogenizatora FastPrep®-24 Instrument (MP Bio-medicals, Santa Ana, USA) według programu: 5m/s, 30 s. Próbkę inkubowano na lodzie przez 30 minut, następnie wirowano w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut ( $10\,000 \times g$ ). Supernatanty zebrano do nowych probówek typu eppendorf. Tak przygotowane lizaty przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ . Do oznaczenia stężenia białka w lizatach komórkowych wykorzystano zestaw Quick Start™ Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA), który opiera się na metodzie kolorymetrycznej Lowry'ego. Do wyznaczenia stężenia posłużono się krzywą wzorcową albuminy surowicy wołowej (BSA) (Bio-Rad, Hercules, USA). Krzywa została przygotowana poprzez szereg 2-krotnych rozcieńczeń białka o stężeniu 2mg/ml (6 punktów krzywej w zakresie stężeń 0-2 mg/ml). Do pomiaru lizaty rozcieńczano 50-krotnie w roztworze RIPA. Standard białkowy oraz próbki naniesiono w 5µl w dwóch powtórzeniach technicznych na płytkę 96-dołkową. Do każdego dołka dodano 25µl odczynnika A' (przygotowanego według reguły – na każdy 1ml odczynnika A odpowiada 20µl odczynnika S), następnie 200µl odczynnika B. Płytkę inkubowano 15 minut w ciemności, a następnie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 650nm za pomocą czytnika płytek BioTek™ Synergy™ H4 Hybrid i oprogramowania Gen5.

#### 10.1.1.1.2. Testy ELISA

Testy ELISA wykonano zgodnie z instrukcją producentów, nakładając równe ilości białka dla każdej próby. W tabeli 4 przedstawiono zastosowane testy ELISA, ich numery katalogowe i producentów.

Tabela 4. Lista zestawów ELISA wykorzystanych do analizy poziomu białek w lizatach z mysich guzów.

Analizowane białko	Nr katalogowy	Producent
<b>CCL2</b>	88-7391-88	Invitrogen, Carlsbad, USA
<b>OPN</b>	EMSPP1	Invitrogen, Carlsbad, USA
<b>SDF-1</b>	EMCXCL12	Invitrogen, Carlsbad, USA
<b>TGFβ1</b>	BMS608	Invitrogen, Carlsbad, USA
<b>VEGF</b>	EMVEGFACL	Invitrogen, Carlsbad, USA

*CCL2 – ligand chemokiny 2, OPN – osteopontyna, SDF-1 – czynnik-1 pochodzenia zrębowego, TGFβ1 - transformujący czynnik wzrostu β 1, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego*

Wartości stężeń białek w lizatach obliczono z zastosowaniem równania krzywej wyznaczonej w programie CurveExpert 1.4.

#### 10.1.1.2. Izolacja fibroblastów z tkanek

Pobrane w dniu sekcji tkanki guza i płuc przetransportowano w medium dla NFs ze Zwierzętarń do Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej. Wszystkie działania na tkankach zostały wykonane w warunkach sterylnych komory laminarnej. Tkanka została przeniesiona na 6-centymetrową plastikową szalkę (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) i rozdrobniona mechanicznie przy użyciu skalpela i pęsety chirurgicznej na fragmenty wielkości około 1mm. Tak przygotowana tkanka została zawieszona w roztworze PBS z jonami wapnia i magnezu (PBS Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>; PChO IITD, Wrocław, Polska) oraz enzymami: Kolagenaza IV (1mg/ml; Collagenase from Clostridium histolyticum; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) i DNaza I (1mg/ml; Roche, Basel, Szwajcaria), a następnie umieszczona w piecu hybrydyzacyjnym w temperaturze 37°C z lekkim wytrząsaniem na okres 1 godziny.

##### 10.1.1.2.1. CAFs

Strawione fragmenty guza zostały przepuszczone przez sitko filtracyjne o wielkości porów 70µm (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria) oraz przepłukane PBS z surowicą (2% FBS; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Zawiesina komórek została zwirowana w temp. 4°C, 350 × g przez 10 minut. Po odwirowaniu supernatant odrzucono a osad komórek został zawieszony w 1ml buforu do lizy erytrocytów (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), probówkę z zawiesiną wytrząsano przez 1 minutę, ponownie zawieszono w PBS z surowicą i odwirowano. Supernatant odrzucono, osad komórkowy zawieszono w 5ml świeżego PBS z surowicą. Zawiesiny komórek z trzech myszy z tej samej grupy połączono i określono żywotność komórek przy użyciu kamery Bürkera i roztworu Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), następnie wykorzystano do separacji CAFs.

#### 10.1.1.2.1.1. Separacja magnetyczna

CAFs zostały wyseparowane za pomocą separacji magnetycznej z wykorzystaniem przeciwciał Anti-Fibroblast MicroBeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Osad komórek po odwirowaniu (10 minut,  $300 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) zawieszono w odpowiedniej ilości buforu do separacji ( $70\mu\text{l}$  na każde  $10^7$  komórek) – PBS pH 7.2, 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) – i przeciwciała blokującego anty CD16/CD32 ( $1\mu\text{l}$  na każde  $10^6$  komórek; TruStain FcX, BioLegend, San Diego, CA, USA). Inkubowano 10 min w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  w celu zablokowania fragmentów Fc przeciwciał. Następnie do zawiesiny dodano kulki magnetyczne opłaszczone przeciwciałami (Anti-Fibroblasts Microbeads,  $20\mu\text{l}$  na każde  $10^7$  komórek) i tak przygotowane próbki pozostawiono na 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji do komórek dodano 1ml buforu do separacji, odwirowano (warunki jak wyżej), zlano supernatant zawierający nadmiar przeciwciał i zawieszono w 1ml świeżego buforu do separacji. Kolumny LS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) umieszczono na statywie separatora MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) i aktywowano przepłukując je 1ml buforu do separacji, następnie na kolumnę nałożono przygotowane zawiesiny komórek z przeciwciałami. Po przejściu całości zawiesiny przez kolumnę, kolumnę przepłukano nakładając kolejną porcję buforu do separacji (3ml). Czynność powtórzono jeszcze dwukrotnie. Następnie kolumny umieszczono w sterylnej próbówce 10ml, uzupełniono 5ml buforu do separacji i zawartość kolumny (komórki przyłączone za pomocą siły magnetycznej) wyciśnięto do próbówki. Wyseparowane komórki odwirowano (10 minut,  $300 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ), osad komórek zawieszono w 1ml buforu do separacji. CAFs zostały policzone przy użyciu kamery Bürkera i roztworu Trypan Blue i przeznaczone do dalszych analiz takich jak analiza fenotypu i czystości za pomocą cytometrii przepływowej.

#### 10.1.1.2.2. Fibroblasty płuc

Strawione zawiesiny komórek płuc kilkakrotnie przepipetowano celem rozdzielania agregatów komórek, odwirowano (7 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $540 \times g$ ) i zawieszono w medium dla mysich fibroblastów płuc (w dalszej części pracy określane jako NFs, skład przedstawiony w tabeli 3). Proces powtórzono dwukrotnie celem pozbycia się resztek enzymów wykorzystanych do trawienia tkanki. Po ostatnim wirowaniu komórki

zawieszono w surowicy (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) z 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) i zamrożono dla dalszych eksperymentów.

### **10.1.1.3. Analiza fenotypu CAFs i NFs myszy obciążonych nowotworami za pomocą cytometrii przepływowej.**

CAFs zostały poddane analizie cytometrycznej bezpośrednio po separacji. NFs myszy obciążonych nowotworami zostały rozmrożone i policzone celem analizy fenotypu NFs. Komórki w liczbie  $3 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$  zawieszono w 100  $\mu$ l PBS z przeciwciałem eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (0,1  $\mu$ l na próbkę; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) i inkubowano w temp. 4°C przez 30 minut celem odrzucenia z analizy martwych komórek. Po inkubacji komórki odwirowano (7 minut, 4°C,  $350 \times g$ ) w buforze do cytometrii (PBS z 2% FBS) i zawieszono w objętości 100  $\mu$ l tego buforu z odpowiednimi przeciwciałami, przedstawionymi w tabeli 5. Barwienie zewnątrzkomórkowe przeprowadzono w temp. 4°C przez 30 minut. Celem barwienia wewnątrzkomórkowego komórki utrwalono za pomocą Fixation Buffer (500  $\mu$ l na próbkę; BioLegend, San Diego, USA) przez 20 minut w ciemności i temperaturze pokojowej. Po inkubacji i odwirowaniu buforu zastosowano 1x Intracellular Staining Perm Wash Buffer (BioLegend, San Diego, USA) w trzykrotnym wirowaniu (500  $\mu$ l na próbkę, 7 minut, temperatura pokojowa,  $350 \times g$ ). Barwienie markerów wewnątrzkomórkowych przeprowadzono w 1 x Intracellular Staining Perm Wash Buffer. Próbkę inkubowano z przeciwciałami anty  $\alpha$ -SMA przez 30 minut w ciemności i temperaturze pokojowej. Odwirowane komórki zawieszono w 200  $\mu$ l buforu do cytometrii, odczytano za pomocą cytometru BD LSR Fortessa i oprogramowania Diva V8.0.1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Dla mysich CAFs wykonano cztery powtórzenia - zawiesiny komórek z trzech myszy z tej samej grupy połączono jeszcze przed separacją. Dla mysich NFs wykonano 6 powtórzeń – dla NFs pochodzących od 6 myszy. Dla każdego z analizowanych białek odczytano medianę fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej.

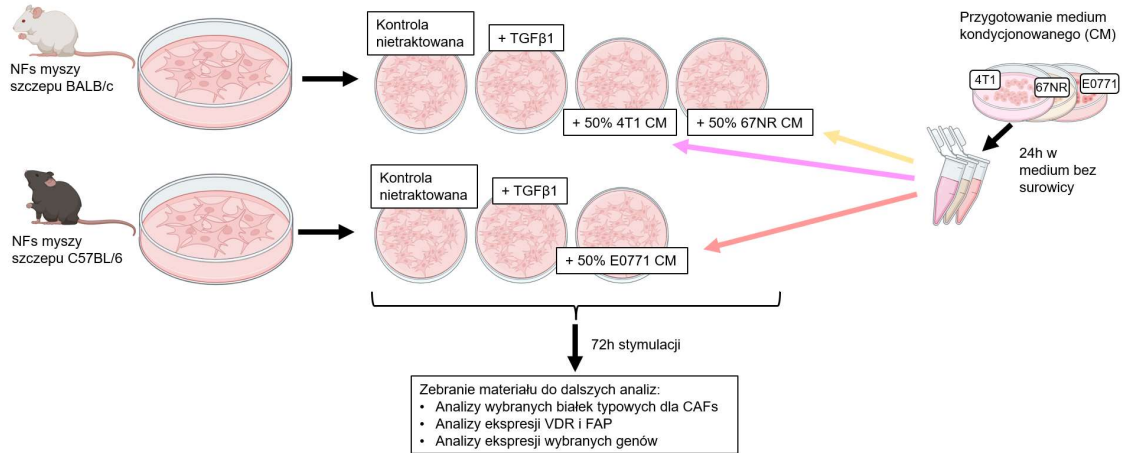
Tabela 5. Zastosowane markery do analizy fenotypu fibroblastów mysich. Wykorzystane przeciwciała, pochodzenie i producent.

<b>Przeciwciała zastosowane do barwienia mysich CAFs</b>				
<b>Białko</b>	<b>Skoniugowany barwnik</b>	<b>Lokalizacja komórkowa</b>	<b>Pochodzenie przeciwciała</b>	<b>Producent przeciwciała</b>
<b>aSMA</b>	PE	Wewnątrzkomórkowa	królicze	abcam
<b>CD31</b>	BV-421	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>CD90.2</b>	PErCP/Cy5.5	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>EpCAM</b>	FITC	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	APC	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>PDPN</b>	PE-Cy7	Zewnątrzkomórkowa	chomik syryjski	BioLegend
<b>TNC</b>	Alexa Fluor 700	Zewnątrzkomórkowa	mysie	NovusBio
<b>Przeciwciała zastosowane do barwienia mysich NFs</b>				
<b>Białko</b>	<b>Skoniugowany barwnik</b>	<b>Lokalizacja komórkowa</b>	<b>Pochodzenie przeciwciała</b>	<b>Producent przeciwciała</b>
<b>aSMA</b>	PE	Wewnątrzkomórkowa	królicze	abcam
<b>CD31</b>	BV-421	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>CD45</b>	PErCP/Cy5.5	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BD Biosciences
<b>EpCAM</b>	FITC	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	APC	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>PDPN</b>	PE-Cy7	Zewnątrzkomórkowa	chomik syryjski	BioLegend
<b>TNC</b>	Alexa Fluor 700	Zewnątrzkomórkowa	mysie	Novus Biologicals

*aSMA* –  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, *CD31* - antygen różnicowania komórkowego 31, *CD90.2* - antygen różnicowania komórkowego 90.2, *EpCAM* - cząsteczka adhezji komórek nabłonka, *PDGFR $\beta$*  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa/beta, *PDPN* – podoplanina, *TNC* – tenascyna C

### 10.1.2. Badania *ex vivo*

NFs wyizolowane z płuc myszy zdrowych (traktowanych wedle schematu na Rycinie 6) poddano po drugim pasażu stymulacji *ex vivo* przy pomocy TGF $\beta$ 1 lub mediów kondycjonowanych (CM) znad komórek raków gruczołu sutkowego 4T1, 67NR i E0771. Schemat eksperymentu *ex vivo* przedstawia Rycina 7.



Rycina 7. Schemat eksperymentu *ex vivo*. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.

#### 10.1.2.1. Stymulacja NFs za pomocą TGF $\beta$ 1 i mediów kondycjonowanych zebranych znad hodowli komórek nowotworowych

##### 10.1.2.1.1. Przygotowanie mediów kondycjonowanych

Komórki nowotworowe (4T1, 67NR, E0771) hodowano w odpowiednich dla nich mediach hodowlanych (skład opisany w tabeli 3). Po osiągnięciu konfluencji komórki delikatnie przepłukano roztworem PBS i medium właściwe zastąpiono połową objętości medium bez surowicy (media odpowiednie dla danej linii pozbawione surowicy). Po 24 godzinach medium kondycjonowane (CM) zostało zebrane, odwirowane (7 minut, 4°C, 400 × g) i nałożone na hodowlę NFs (pasaż 2) w stosunku 1:1 z medium dla NFs celem 72-godzinnej stymulacji.

##### 10.1.2.1.2. Hodowla i stymulacja NFs

Fibroblasty płuc myszy zdrowych z każdej grupy rozmrożono i wysiano w 10ml medium dla NFs na szalki o średnicy 10 cm. Hodowle utrzymywano w inkubatorze zapewniającym odpowiednie warunki - 37°C, wilgotna atmosfera i 5% CO<sub>2</sub>. Po osiągnięciu konfluencji równej lub większej niż 60% NFs przeniesiono na szalki o średnicy 15cm – medium zdjęto, szalkę z komórkami przepłukano delikatnie roztworem PBS i zalano 1ml roztworu trypsyno-wersenu o pH=8 (PChO IITD, Wrocław, Polska). Pozostawiono w temp. 37°C na czas około 15-20 minut, następnie zdjęto



komórki przy użyciu medium dla NFs. Określono żywotność komórek i wysiano całość na nowe szalki w 15ml medium (pasaż 1). W drugim pasażu komórki wysiano w liczbie  $3 \times 10^5$  komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli komórkowych i po  $2,5 \times 10^3$  na dołek płytki 96-dołkowej do immunofluorescencji (Falcon® 96-well Black/Clear Flat Bottom TC treated Imaging Microplate; Corning, New York, USA). Po 24 godzinach, kiedy komórki przykleiły się do podłoża, medium znad komórek zostało zmienione na media do stymulacji: (1) Medium kontrolne - medium dla NFs z 2 % FBS zamiast 10% FBS, (2) medium kontrolne z 10ng/ml TGFβ1 (763102, BioLegend, San Diego, CA, USA), (3) CM znad 4T1, (4) CM znad 67NR, (5) CM znad E0771. Dla stymulacji NFs pochodzących od myszy BALB/c zastosowano media (1), (2), (3) i (4), dla NFs pochodzących od myszy C57BL/6 - (1), (2), (5). Po 72-godzinnej stymulacji zbierano komórki do następujących analiz: badanie ekspresji białek FAP i VDR za pomocą immunofluorescencji, białek specyficznych dla CAFs za pomocą cytometrii przepływowej oraz badanie ekspresji wybranych genów przy pomocy real-time PCR.

#### 10.1.2.1.3. Analiza fenotypu NFs za pomocą cytometrii przepływowej

Barwienie oraz analiza wyników została przeprowadzona tak jak opisano w rozdziale 10.1.1.3.

#### 10.1.2.1.4. Analiza poziomu białek VDR i FAP metodą immunofluorescencji

Celem oceny poziomu VDR i FAP za pomocą intensywności fluorescencji białek, komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych (Falcon® 96-well Black/Clear Flat Bottom TC treated Imaging Microplate; Corning, New York, USA). Po 72-godzinnej stymulacji TGFβ1 i mediami kondycjonowanymi, komórki przepłukano roztworem PBS i utrwalono w roztworze 4% paraformaldehydu (Avantor Performance Materials Poland, Gliwice, Polska) w PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie po trzykrotnym delikatnym przepłukaniu komórek roztworem PBS komórki, tylko te przeznaczone do barwienia VDR, permeabilizowano za pomocą 0,25% roztworu Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Komórki ponownie przepłukano (3 razy po 5 minut) roztworem PBS i nałożono na wszystkie dołki roztwór 1% BSA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) w PBST (roztwór PBS z 0,1% Tween 20; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) celem zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał. Po blokowaniu nałożono przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczone w roztworze blokującym (1% BSA w PBST),

przeciwciało anti-VDR (bs-2987R, Bioss Antibodies, Woburn, MA, USA) w rozcieńczeniu 1:100 i przeciwciało anti-FAP (ab28244, 1:500, abcam, Cambridge, UK) w rozcieńczeniu 1:500 – i inkubowano przez noc w temp. 4°C. Barwienie drugorzędowe, uprzedzone płukaniem roztworem PBS (3 razy po 5 minut), przeprowadzono przy użyciu koziego anti-króliczego przeciwciała skoniugowanego z Alexa Fluor 488 (ab150077, abcam, Cambridge, UK) w rozcieńczeniu 1:300 przez okres jednej godziny. Preparat ponownie przepłukano roztworem PBS (3 razy po 5 minut) i dzięki zastosowaniu DAPI (rozcieńczenie 1:1500 w PBS; 3mM stock; Cell-Signaling, Danvers, TX, USA) i roztworu Phalloidin (rozcieńczenie 1:100 w PBS; DyLight™ 554 Phalloidin, Cell-Signaling, Danvers, MA, USA) wybarwiono jądra oraz aktynę. Po 15 minutach inkubacji z roztworem DAPI i Phalloidin komórki kilkakrotnie przepłukano roztworem PBS i wizualizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) dzięki oprogramowaniu CellSense (Olympus, Warszawa, Polska). Intensywność fluorescencji na zdjęciach została oceniona z zastosowaniem oprogramowania ImageJ według opublikowanego protokołu [215]. Dzięki pomiarom fluorescencji interesujących obiektów oraz tła obliczono intensywność fluorescencji VDR i FAP według następującej formuły:

$$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$$

#### 10.1.2.1.5. Analiza ekspresji mRNA za pomocą real-time PCR

Celem oceny ekspresji wybranych genów (tabela 6), komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych zgodnie z opisem w rozdziale 10.1.2.1.2. Po 72-godzinnej stymulacji TGFβ1 i mediami kondycjonowanymi, powierzchnię komórek przepłukano roztworem PBS i komórki zebrano w 1ml odczynnika TRI Reagent (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA). Materiał zebrano niezależnie od 4 myszy z każdej grupy. Próbkę przechowywano w temp. -80°C.

##### 10.1.2.1.5.1. Izolacja RNA

Izolacja RNA została wykonana z wykorzystaniem zestawu Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH, Tustin, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Lizaty komórkowe w TRI Reagent uzupełniono taką samą objętością 99,8% etanolu (Avantor Performance Materials Poland, Gliwice, Polska). Następnie na kolumny umieszczone w probówkach naniesiono 700µl zawiesiny, zwirowano (14 000 × g, 30 s) a objętość, która przepłynęła wyrzucono. Ponownie naniesiono zawiesinę komórek i odwirowano, proces powtórzono

do momentu związania całości materiału na kolumnie. Następnie na kolumny, przeniesione do nowych probówek, naniesiono 400µl RNA Wash Buffer i zwirowano ( $14\ 000 \times g$ , 30 s). Przygotowano roztwór DNase I (na każdą kolumnę 5µl DNase I (6U/µl) i 75µl DNA Digestion Buffer), naniesiono na kolumnę i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji naniesiono na kolumny po 400µl Direct-zol RNA PreWash i odwirowano ( $14\ 000 \times g$ , 30 s). Czynność powtórzono jeszcze raz. Następnie naniesiono na kolumny po 700µl RNA Wash Buffer, zwirowano przez 1 minutę ( $14\ 000 \times g$ ). Celem elucji RNA, kolumny przeniesiono do probówek typu eppendorf, uzupełniono 25µl DNase/RNase-Free Water i zwirowano (2 minuty,  $14\ 000 \times g$ ). Probówki z RNA przeniesiono na lód. Przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 10.1.2.1.5.2. Synteza cDNA

Stężenie RNA w próbkach mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Syntezę cDNA wykonano za pomocą iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA). Połączono: matrycę cDNA (do 1µg), wodę (do 15µl), 1µl iScript Reverse Transcriptase i 4µl 5x iScript Reaction Mix, krótko zwirowano. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono w termocyklerze Veritii 9902 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) za pomocą programu: 5 minut w  $25^{\circ}\text{C}$ , 20 minut w  $46^{\circ}\text{C}$  i 1 minut w  $95^{\circ}\text{C}$ . Zsyntetyzowane cDNA przechowywano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

#### 10.1.2.1.5.3. Real-time PCR

Mieszaninę reakcyjną przygotowano z cDNA (50ng/reakcję), 2x TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), wody DEPC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) oraz starterów dla odpowiednich genów zebranych w tabeli 6. Każdą próbkę nakładano w dwóch powtórzeniach technicznych na płytkę 96-dołkową typu fast. Reakcję przeprowadzono w aparacie ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) według programu: 40 cykli, w temp.  $95^{\circ}\text{C}$  przez 15s, w temp.  $60^{\circ}\text{C}$  przez 60s. Otrzymane wyniki opracowywano w oprogramowaniach QuantStudio™ Real-Time PCR Software oraz ExpressionSuite Software (oba Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) za pomocą metody porównawczej  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Ekspresję genów oceniano względem kontroli niestymulowanej z grupy 1000IU.

**Tabela 6. Zastosowane sondy do analizy ekspresji genów w komórkach fibroblastów płuc myszy zdrowych stymulowanych TGFβ1 oraz mediami kondycjonowanymi z nad komórek nowotworowych.**

	NAZWA GENU	NAZWA SONDY
<b>KONTROLE EDOGENNE</b>	<i>Gapdh</i>	Mm9999915_g1
	<i>Rps27a</i>	Mm01180369_g1
	<i>Spp1</i>	Mm00436767_m1
<b>GENY BADANE</b>	<i>Mmp9</i>	Mm00442991_m1
	<i>Acta2</i>	Mm01546133_m1
	<i>Vdr</i>	Mm00437297_m1

*Gapdh* - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, *RPS27a* - podjednostka 40S rybosomalnego białka S27a, *Spp1* – wydzielana fosfoproteina, *Mmp9* – metaloproteinaza 9, *Acta2* – α-aktyna 2, *Vdr* – receptor witaminy D

### 10.1.3. Badania *in vitro*

#### 10.1.3.1. Badanie wpływu NFs stymulowanych TGFβ1 na proliferację komórek nowotworowych i ich potencjał do tworzenia kolonii

##### 10.1.3.1.1. Przygotowanie medium kondycjonowanego (CM) znad fibroblastów

Hodowlę i stymulację fibroblastów płuc myszy zdrowych prowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 10.1.2.1.2. Celem przygotowania CM, fibroblasty każdej grupy niestymulowane i stymulowane TGFβ1 głodzono przez 24 godziny w medium bez surowicy. Po 72 godzinach stymulacji powierzchnię komórek delikatnie przepłukano roztworem PBS i zalano 1ml medium NFs bez surowicy (na dołek płytki 6-dołkowej). Po 24 godzinach medium zebrano do probówek, odwirowano i w mniejszych porcjach przechowano w temp. -80°C.

##### 10.1.3.1.2. Ocena wpływu medium kondycjonowanego znad NFs na proliferację komórek nowotworowych metodą SRB

Komórki nowotworowe linii 4T1, 67NR i E0771 wysiano na płytki 96-dołkowe (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) w objętości 100μl/dołek oraz liczbie 750 komórek/dołek ( $7,5 \times 10^3$ /ml, 4T1), 1500 komórek/ dołek ( $1,5 \times 10^4$ /ml, 67NR) oraz 1000 komórek/dołek ( $10^4$ /ml, E0771). Po 24 godzinach, kiedy komórki się przykleiły, nałożono po 100μl CM (znad fibroblastów wszystkich grup stymulowanych i niestymulowanych TGFβ1): znad fibroblastów myszy szczepu BALB/c na 4T1 i 67NR i szczepu C57BL/6 na E0771. Tak przygotowane hodowle utrzymywano w standardowych warunkach hodowli w inkubatorze. Po 72 godzinach wykonano test SRB celem określenia żywotności komórek. Test wykonano w minimum trzech niezależnych powtórzeniach. Test SRB opiera się na zdolności Sulforodaminy B (SRB) do wiązania białek komórkowych. Po zakończonym czasie inkubacji na komórki naniesiono po 50μl na dołek zimnego 50% roztworu kwasu trichlorooctowego (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) celem wytrącenia się białek komórkowych. Po 1 godzinie inkubacji w temp. 2-8°C, dołki przepłukano 5-krotnie wodą i nałożono po 50μl roztworu 0,1% roztworu sulforodaminy B (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) rozpuszczonej w 1% kwasie octowym (POCH, Gliwice, Polska). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej nadmiar barwnika odpłukano 5-krotnie 1% kwasem octowym. Płytki osuszono, dołki uzupełniono 150μl 10mM roztworu TRIS (POCH, Gliwice, Polska) i pozostawiono na 30 minut celem całkowitego rozpuszczenia barwnika. Absorbancję roztworów w dołkach odczytano przy

długości fali 540nm za pomocą czytnika płytek BioTek™ Synergy™ H4 Hybrid i oprogramowania Gen5 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA). Żywotność komórek obliczono za pomocą następującego wzoru:

$$\text{żywotności komórek (\%)} = \left[ \left( \frac{Ab - Am}{Ak - Am} \right) * 100 \right]$$

Gdzie:

Ab – wartość absorbancji dla komórek inkubowanych z etanolem lub kalcytriolem,

Ak – wartość absorbancji dla komórek nietraktowanych

Am – wartość absorbancji dla tła (medium hodowlanego).

#### 10.1.3.1.3. Ocena wpływu medium kondycjonowanego z nad NFs na potencjał do tworzenia kolonii przez komórki nowotworowe

W celu przeprowadzenia testu klonogenego komórki nowotworowe stymulowano medium z nad fibroblastów stymulowanych i niestymulowanych TGFβ1 przez 72 godziny. Następnie komórki raka gruczołu sutkowego 4T1, 67NR i E0771 wysiano celem obserwacji tworzenia przez nie kolonii. Komórki nowotworowe wysiano na płytce 6-dołkowej w liczbach:  $1,5 \times 10^4$  (4T1),  $5 \times 10^4$  (67NR) i  $7 \times 10^4$  (E0771) komórek na dołek w objętości 1ml medium właściwego dla linii komórkowej. Po 24 godzinach nałożono na dołki po 1ml CM. Przygotowano również kontrolę nietraktowaną – komórki danej linii nowotworowej niestymulowane żadnym CM. W taki sposób przygotowane hodowle stymulowano 72 godziny. Po tym czasie stymulowane komórki nowotworowe zdjęto z powierzchni naczynia dzięki zastosowaniu roztworu trypysno-wersenu, policzono i wysiano po 50 (4T1 i E0771) lub 100 komórek (67NR) na płytce 6-dołkowej w 4ml medium właściwego dla danej linii komórkowej. Dołki płytki 6-dołkowej przed nałożeniem komórek przepłukiwano właściwym dla danej linii medium. Po upływie 10 dni wykonano barwienie. Powierzchnię komórek przepłukano roztworem PBS, następnie zalano 0,5% fioletem krystalicznym (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) po 500μl na dołek. Po godzinie barwienia fiolet zebrano z dołków. Dołki płukano wodą wielokrotnie, do całkowitego wypłukania barwnika. Płytki pozostawiono do wyschnięcia. Klony liczono ręcznie. Zdjęcia płytek wykonano prywatnym aparatem fotograficznym. Testy wykonano za każdym razem w dwóch powtórzeniach technicznych w 3 niezależnych eksperymentach. Liczbę klonów normalizowano względem kontroli nietraktowanej – każdą wartość dzielono przez średnią liczbę klonów w kontroli nietraktowanej.

## 10.2. BADANIA NA MATERIALE POCHODZĄCYM OD PACJENTEK

Badania na materiale ludzkim zostały przeprowadzone dzięki współpracy z Centrum Chorób Piersi Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii (DCOPiH). Eksperymenty na pozyskanych tkankach zostały przeprowadzane za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr uchwały 603/2018 oraz 855/2019). Pacjenci przed przystąpieniem do badania zostali zapoznani z jego założeniami i przebiegiem oraz podpisali formularz świadomej zgody pacjenta. W badaniu wzięli udział pacjenci z rozpoznaniem raka gruczołu sutkowego, którzy nie byli poddani systemowej terapii przedoperacyjnej. Zebrano następujące dane kliniczne: wiek/rok urodzenia, status menopauzalny, ciążę (ilość, data ostatniej ciąży), waga i wzrost (do oceny BMI), suplementacja witaminy D<sub>3</sub> (lub jej brak), antykoncepcja hormonalna (lub jej brak), choroby towarzyszące (cukrzyca, choroby tarczycy), przyjmowane leki, stosowane używki (alkohol, papierosy), obecne mutacje genów zwiększające ryzyko zachorowania na raka gruczołu sutkowego. Tkanki nowotworowe zostały pobrane podczas zabiegu operacyjnego przez chirurga i patologa po zabezpieczeniu materiału do rutynowego badania histopatologicznego preparatu pooperacyjnego. Krew od zakwalifikowanych do badania pacjentek pobierano do probówek S-Monovette EDTA (Sigmed, Cisek, Polska) w przeddzień operacji. Pacjentki zostały rozdzielone na grupy w oparciu o ich cechy kliniczne, tj. status menopauzalny, poziom metabolitu witaminy D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) oraz obecność przerzutów. Status menopauzalny pacjentek został określony na podstawie analizy poziomu hormonu folikulotropowego (FSH) – poziom FSH wyższy niż 25,8 mIU/ml pozwalał na przyporządkowanie pacjentki do kategorii „po menopauzie”. Dla ułatwienia analizy pacjentki zostały podzielone w oparciu o stężenie 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu wyłącznie na dwie grupy: poziom  $\geq 30$  ng/ml - optimum,  $< 30$  ng/ml - deficyt. Do oceny obecności przerzutów brano pod uwagę obecność przerzutów w węzłach chłonnych regionalnych (parametr N 1, 2, 3 w skali TNM), obecność przerzutów odległych (parametr M skali TMN). Sumaryczny wynik tych parametrów kategoryzował pacjentki na dwie grupy: brak przerzutów i przerzuty obecne.

### 10.2.1. Analiza poziomu wybranych białek w lizatach z guzów za pomocą techniki Western-blot

#### 10.2.1.1. Przygotowanie lizatów z guzów

Fragmenty tkanki nowotworowej (około 1g tkanki) umieszczono w probówce z medium dla CAFs (bez bFGF) i przetransportowano do Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej. Niewielki fragment tkanki guza zabezpieczano, mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ . Przygotowanie lizatów oraz oznaczenie stężenia białka wykonano zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 10.1.1.1.1.

#### 10.2.1.2. Western-blot

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono w warunkach denaturujących na samodzielnie przygotowanych 10% żelach poliakryloamidowych. Żele (zagęszczający i rozdzielający) zostały przygotowane poprzez zmieszanie odczynników przedstawionych w tabeli 7. Jako ostatnie do roztworu zostały dodane APS oraz TEMED. Przygotowaną mieszaninę roztworu żelu rozdzielającego ostrożnie naniesiono między szkiełka umocowane w kasecie do przygotowywania żeli. Niezwłocznie na roztwór żelu nawarstwiono wodę MiliQ celem wyrównania żelu oraz odcięcia dostępu powietrza.

Tabela 7. Spis odczynników i ich objętości niezbędnych do przygotowania 10% żelu poliakryloamidowego.

Nazwa odczynnika	Objętość		Producent
	Żel rozdzielający	Żel zagęszczający	
bufor TRIS-HCl o pH=8,8 (45,5g TRIS, 1g SDS)	3,75ml	-	PChO IITD, Wrocław, Polska
bufor TRIS-HCl o pH=6,8 (15,1 g TRIS, 1 g SDS)	-	1,25ml	PChO IITD, Wrocław, Polska
30% roztwór mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (37,5:1)	2,5ml	0,325ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Woda MiliQ	1,25ml	0,9ml	PChO IITD, Wrocław, Polska
10% APS	37,5 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TEMED	7,5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	BioShop, Burlington, Kanada

Gdy żel spolimeryzował, po około 30 minutach, wodę zlano i na żel rozdzielający nawarstwiono mieszaninę żelu zagęszczającego. Natychmiast w żelu umieszczono 15-dołkowy grzebyk celem utworzenia studzienek. Po spolimeryzowaniu szkiełka z żelami umieszczono w aparacie do elektroforezy, zalano 1x buforem do elektroforezy (10x stężony bufor o składzie: 144g glicyny, 30g TRIS, 10g SDS na 1000ml wody MiliQ) i wyciągnięto grzebyki. Zawiesiny białka (po 50 $\mu\text{g}$  białka na studzienkę) mieszano z 4x Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, USA) w stosunku 1:3, uzupełniano



roztworem RIPA do równej objętości i gotowano przez 5 minut w temp. 99°C. Schłodzone próbki oraz 4µl standardu mas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nanoszono na studzienki na żelach. Elektroforezę przeprowadzono przy stałym napięciu prądu (100V przez 20 minut, 120V do końca) oraz zmiennym natężeniu (ustawionym na wartość 0,6A) do momentu sięgnięcia przez barwnik dolnego końca żelu. Elektroforeza została przeprowadzona dzięki zastosowaniu aparatu do elektroforezy Mini Protean® Tetra Cell i zasilacza PowerPac™ HC High-Current Power Supply (oba Bio-Rad, Hercules, USA). Celem przeprowadzenia transferu żele uwolniono z szybek, wycięto i płukano w buforze do transferu (o składzie: 7,2g glicyny, 1,51g TRIS, 100ml metanolu (Avantor, Gliwice, Polska) oraz 400ml wody MiliQ) przez 15 minut. Membrany PVDF o wielkości porów 0,45µm (Merck, Darmstadt, Niemcy) aktywowano poprzez płukanie kolejno w metanolu, wodzie MiliQ i buforze do transferu. Bibuły płukano przynajmniej 15 minut w buforze do transferu. W aparacie do transferu (Trans-blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, USA) złożono „kanapkę” według następującej kolejności (zaczynając od anody): bibuła, membrana PVDF, żel, bibuła. Przyłożono katodę, zapewniono chłodzenie poprzez umieszczenie lodu oraz przeprowadzono pólsuchy transfer w następujących warunkach: 60 minut, 25V, stałe natężenie 0,3A. Po zakończonym transferze membrany naładowane białkiem blokowano przez okres godziny w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w 0,1% TBST (tzw. bufor blokujący, TBS + Tween 20 (PChO IITD, Wrocław, Polska i Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)) z lekkim kołysaniem. Następnie membrany trzy-krotnie przepłukano w roztworze 0,1% TBST przez około 5 minut. Na membrany naniesiono po 5ml króliczych anti-ludzkich/mysich przeciwciał rozcieńczonych w 0,5% roztworze buforu blokującego. Inkubowano w temp. 4°C przez noc. Wykaz zastosowanych przeciwciał, ich rozcieńczeń i producentów przedstawiono w tabeli 8.

*Tabela 8. Spis przeciwciał zastosowanych w analizie poziomu białka w lizatach guzów pacjentek metodą Western-blot, ich producentów i zastosowane rozcieńczenia.*

Celowane białko	Rozcieńczenie	Producent
<b>OPN</b>	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA
<b>TGFβ1</b>	1:500	Proteintech, Rosemont, USA

*OPN – osteopontyna, TGFβ1 – transformujący czynnik wzrostu β 1*

Następnego dnia membrany wyjęto z lodówki aby osiągnęły temperaturę pokojową, następnie 3-krotnie płukano po 5 minut w roztworze 0,1% TBST. Inkubowano przez 1 godzinę z anti-króliczym monoklonalnym przeciwciałem drugorzędowym IgG-HRP rozcieńczonym 1:10 000 w 0,5% roztworze blokera (Santa Cruz Biotechnology, Dallas,

USA). Ponownie płukano 3-krotnie. Do odczytu zastosowano metodę ECL. Na każdą membranę bezpośrednio przed odczytem nakładano mieszaninę składającą się z 2,25ml wody MiliQ, 250 $\mu$ l 1M roztworu TRIS-HCl o pH=8,8 (PChO IITD, Wrocław, Polska), 12,5 $\mu$ l luminolu, 5 $\mu$ l kwasu p-kumarynowego (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) oraz 2,5 $\mu$ l 30% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Avantor, Gliwice, Polska). Odczytu chemiluminescencji dokonywano przy pomocy aparatu ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, USA). Po odczycie membrany ponownie płukano w 0,1% TBST według wcześniej opisanego schematu oraz inkubowano 1 godzinę z monoklonalnym przeciwciałem przeciw  $\beta$ -aktynie (anty- $\beta$ -actin (C4) HRP, 1:5 000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), stanowiącej kontrolę załadowania. Membrany odpłukiwano i odczytywano metodą ECL. Analizę densytometryczną wykonano w oprogramowaniu ImageJ. Wyniki normalizowano względem poziomu  $\beta$ -aktyny.

### **10.2.2. Izolacja CAFs z tkanki guza**

Fragmenty tkanki nowotworowej (około 1g tkanki) umieszczono w probówce z medium dla CAFs (bez bFGF) i przetransportowano do Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej. Następnie tkanka została przeniesiona na szalkę 6-centymetrową z medium do trawienia (RPMI, 5% FBS, 5% HS, 4mM L-glutaminy, 2,5g/l glukozy, 1mM pirogronianiu, 1% aminokwasów, 0,1mg/ml streptomycyny i 100U/ml penicyliny) i mechanicznie rozdrobniona przy użyciu skalpela i pęsety chirurgicznej na fragmenty wielkości około 1mm. Rozdrobnioną tkankę przeniesiono do probówki 10ml i zawieszono w 4ml medium z enzymami: kolagenaza IV (1mg/ml) i DNaza I (1mg/ml), następnie probówkę umieszczono w piecu hybrydyzacyjnym w temperaturze 37°C z lekkim wytrząsaniem na okres kilkunastu godzin (trawienie przez noc). Strawiona tkanka została przefiltrowana przez sitko filtracyjne o wielkości porów 70 $\mu$ m i przepłukana roztworem PBS z surowicą. Zawiesinę komórek zwirowano (4°C, 350  $\times$  g, 7 minut), osad komórek zawieszono w 5ml roztworu PBS z surowicą i obliczono liczbę komórek w zawiesinie przy pomocy Trypan Blue.

#### **10.2.2.1. Separacja magnetyczna**

Całą zawiesinę komórek ponownie zwirowano i przeprowadzono separację magnetyczną komórek nowotworowych zgodnie z instrukcją producenta (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Komórki zawieszono w odpowiedniej ilości buforu do separacji (300 $\mu$ l na każde 5 $\times$ 10<sup>7</sup> komórek) i przeciwciała blokującego anty CD16/CD32 (1 $\mu$ l na każde 10<sup>6</sup>

komórek, Human TruStain FcX, BioLegend, San Diego, USA). Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, do zawiesiny dodano kulki magnetyczne opłaszczone przeciwciałami anti-CD326 (EpCAM; 100 $\mu$ l na każde  $5 \times 10^7$  komórek) i pozostawiono na 30 minut w temperaturze 2-8°C. Zawiesinę przeciwciał uzupełniono 1ml buforu do separacji, całość zwirowano (10 minut,  $300 \times g$ , 4°C) i osad komórek zawieszono w 1ml świeżego buforu do separacji. Kolumny MS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) umieszczono na statywie separatora MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) i aktywowano przepłukując je 1ml buforu do separacji, następnie na kolumnę nałożono przygotowane zawiesiny komórek z przeciwciałami. Po przejściu całości zawiesiny przez kolumnę, kolumnę przepłukano nakładając kolejną porcję buforu do separacji (500 $\mu$ l). Czynność powtórzono jeszcze dwukrotnie. Następnie kolumny umieszczono w sterylnej probówce 10ml, uzupełniono 1ml buforu do separacji i zawartość kolumny (komórki przyłączone za pomocą siły magnetycznej) wyciśnięto do probówki. Wyseparowane komórki nowotworowe zawieszono w 500 $\mu$ l medium hodowlanego o składzie: Ham's F12 (Corning, New York, USA), 5% HS (Gibco, Grand Island, New York, USA), 5% FBS, 10 $\mu$ g/ml insuliny, 0,5 $\mu$ g/ml hydrokortyzonu, 0,05 $\mu$ g/ml toksyny cholery, 20ng/ml EGFh, 100 $\mu$ g/mL streptomycyny (wszystko Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) i 100 U/mL penicyliny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa, Polska). Komórki wysiano na płytkę 24-dołkową do hodowli komórkowych. Komórki te zostały poddane dalszym analizom, które nie wchodzą w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej. Z frakcji negatywnej wyseparowano CAFs. Komórki zawieszono w odpowiedniej ilości buforu do separacji (80 $\mu$ l na każde  $10^7$  komórek), dodano kulki magnetyczne opłaszczone przeciwciałami (Anti-Fibroblasts Microbeads, 20 $\mu$ l na każde  $10^7$  komórek) i tak przygotowane próbki pozostawiono na 30 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, do komórek dodano 1ml buforu do separacji, odwirowano (10 minut,  $300 \times g$ , 4°C), zlano supernatant zawierający nadmiar przeciwciał i zawieszono w 1ml świeżego buforu do separacji. Separację przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym dla komórek nowotworowych. Komórki policzono,  $3-5 \times 10^4$  komórek na próbkę przeznaczono na ocenę czystości separacji, resztę komórek wysiano na płytkę 24-dołkową w 500 $\mu$ l medium dla CAFs (skład przedstawiony w tabeli 3).

### 10.2.2.2. Ocena czystości separacji za pomocą cytometrii przepływowej

Barwienie zostało przeprowadzone zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 10.1.1.3. Zastosowane przeciwciała zebrano w tabeli 9.

*Tabela 9. Zastosowane markery do analizy fenotypu ludzkich CAFs. Wykorzystane przeciwciała, pochodzenie i producent.*

Przeciwciała zastosowane do barwienia ludzkich CAFs				
Białko	Skoniugowany barwnik	Lokalizacja komórkowa	Pochodzenie przeciwciała	Producent przeciwciała
<b>aSMA</b>	PE	Wewnątrzkomórkowa	królicze	abcam
<b>CD31</b>	BV-421	Zewnątrzkomórkowa	mysie	BioLegend
<b>CD45</b>	FITC	Zewnątrzkomórkowa	mysie	BioLegend
<b>EpCAM</b>	PE/Cy7	Zewnątrzkomórkowa	mysie	BioLegend
<b>FSP1</b>	PerCP/Cy5.5	Zewnątrzkomórkowa	mysie	BioLegend
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	APC	Zewnątrzkomórkowa	mysie	BioLegend
<b>PDPN</b>	PE/Dazzle™ 594	Zewnątrzkomórkowa	szczurze	BioLegend
<b>TNC</b>	Alexa Fluor 700	Zewnątrzkomórkowa	mysie	NovusBio

*aSMA –  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, CD31 - antygen różnicowania komórkowego 31, CD45 - antygen różnicowania komórkowego 45, EpCAM - cząsteczka adhezji komórek nabłonka, FSP1 – białko specyficzne dla fibroblastów, PDGFR $\beta$  – receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa/beta, PDPN – podoplanina, TNC – tenascyna C*

### 10.2.3. Badania *ex vivo*

#### 10.2.3.1. Pasażowanie CAFs

Po osiągnięciu 80-90% konfluencji CAFs przeniesiono na butelkę hodowlaną Cell+ (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy). Pasaż wykonano przy pomocy roztworu trypsyno-wersenu o pH=8. Powierzchnię komórek przepłukano roztworem PBS, następnie roztworem trypsyny i inkubowano kilka minut w inkubatorze w temp. 37°C. Komórki zdjęto w medium dla CAFs. Żywotność komórek policzono przy pomocy roztworu Trypan Blue i kamery Bürkera. Komórki zawracano na hodowlę w liczbach  $0,5-1 \times 10^6$  komórek oraz wysiewano do testów zgodnie z opisem przedstawionym w kolejnych rozdziałach. Testy na komórkach prowadzono w medium dla CAFs pozbawionym Primocin. Ze względu na pojawiające się w hodowlach CAFs komórki nowotworowe podjęto próby oczyszczania zanieczyszczonych hodowli zgodnie z protokołem tzw. zróżnicowanej trypsynizacji zwykle stosowanej w celu odrzucenia fibroblastów z hodowli komórek nowotworowych [216]. Protokół zróżnicowanej trypsynizacji wykorzystuje różnicę w czasie odklejania się komórek od powierzchni naczynia w obecności roztworu trypsyno-wersenu. CAFs potrzebują w tym celu zaledwie 1-2 minut, natomiast komórki nowotworowe niekiedy ponad 10 minut inkubacji w roztworze trypsyno-wersenu.

#### 10.2.3.2. Ocena ekspresji wimentyny w CAFs za pomocą metody immunofluorescencji

Celem oceny ekspresji wimentyny w cytoplazmie CAFs za pomocą pomiaru intensywności fluorescencji białek znakowanych przeciwciałami, komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych (Falcon® 96-well Black/Clear Flat Bottom TC treated Imaging Microplate; Corning, New York, USA) w liczbie  $0,5-2,5 \times 10^3$  komórek w objętości 200µl na dołek. Po 72 godzinach przeprowadzono barwienia z zastosowaniem procedury opisanej w rozdziale 10.1.2.1.4. Komórki permeabilizowano. Do barwienia wykorzystano królicze przeciwciało przeciw wimentynie w rozcieńczeniu 1:500 (NBP1-31327, Novus Biologicals, Centennial, USA). Zastosowano to samo przeciwciało drugorzędowe co w przypadku analiz NFs pochodzących z puc myszy.

#### 10.2.3.3. Badanie wrażliwości CAFs na kalcytriol metodą SRB

Komórki wysiano na płytkę 96-dołkową (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) w objętości 100µl i liczbie  $2 \times 10^3$ /dołek. Po 24 godzinach na komórki naniesiono kolejne 100µl

medium z badanym związkiem – kalcytriolem do uzyskania końcowego stężenia w zakresie 1000 - 1nM. Ponadto wykonano także kontrolę rozpuszczalnika – etanolu w zakresie stężeń odpowiadających ich zawartości w naniesionym na komórki kalcytriolu. Każde rozcieńczenie kalcytriolu oraz kontroli rozpuszczalnika naniesiono w trzech powtórzeniach. Tak przygotowane hodowle utrzymywano w standardowych warunkach hodowli w inkubatorze. Po 72 godzinach wykonano test SRB, celem określenia zahamowania proliferacji, zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 10.1.3.1.2. Wykonano 3-4 powtórzenia dla każdej hodowli CAFs.

#### **10.2.3.4. Krótkoterminowe hodowle CAFs z kalcytriolem**

Krótkoterminowe hodowle z kalcytriolem (1nM i 10nM) prowadzono celem zebrania materiału do dalszych analiz, tj. oceny ekspresji mRNA, analizy wydzielanych do medium cytokin oraz oceny fenotypu CAFs stymulowanych kalcytriolem. CAFs zostały wysiane na szalki o średnicy 10cm w liczbie  $3 \times 10^5$  komórek na szalkę w 4ml medium. Po 24 godzinach na szalki nałożono kolejne 4ml medium: kontrolne bez kalcytriolu oraz z kalcytriolem tak aby końcowe stężenie na szalce wynosiło 1nM i 10nM. Tak przygotowane hodowle utrzymywano w standardowych warunkach - w inkubatorze. Po 72 godzinach zebrano materiał do kolejnych analiz: medium z komórek do oceny wydzielanych czynników za pomocą testów ELISA, lizaty komórkowe w roztworze RIPA (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) do oceny ekspresji białek za pomocą Western-blot, lizaty komórkowe w odczynniku TRI-Reagent (trizolu, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) do analizy ekspresji genów. Materiał do badań zebrano w trzech powtórzeniach z kolejnych pasażów komórek.

#### **10.2.3.5. Analiza fenotypu CAFs stymulowanych kalcytriolem**

Powierzchnię komórek stymulowanych kalcytriolem przepłukano delikatnie roztworem PBS, następnie nałożono 1ml roztworu akutazy (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA). Po kilku minutach inkubacji w temp. 37°C komórki zdjęto w roztworze PBS z surowicą. Komórki policzono za pomocą odczynnika Trypan Blue.  $3-5 \times 10^4$  komórek na próbkę wykorzystano do barwienia, resztę zebrano w TRI Reagent (do analizy PCR). Barwienie zostało przeprowadzone zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 10.1.1.3. Zastosowane przeciwciała zebrano w tabeli 9.

### **10.2.3.6. Analiza poziomu białek VDR i FAP w CAFs za pomocą metody immunofluorescencji**

Celem analizy intensywności fluorescencji białek VDR i FAP fibroblastów towarzyszących nowotworom komórki wysiano na płytce 96-dołkowe (Falcon® 96-well Black/Clear Flat Bottom TC treated Imaging Microplate) w liczbie  $0,5-2,5 \times 10^3$  komórek w objętości 100µl na dołek. Po 24 godzinach nałożono kalcytriol w objętości 100µl tak aby końcowe stężenie wynosiło 1nM i 10nM. Po 72 godzinach inkubacji przeprowadzono barwienia z zastosowaniem tych samych przeciwciał i tej samej procedury co w przypadku materiału mysiego, opisanego w rozdziale 10.1.2.1.4.

### **10.2.3.7. Analiza ekspresji mRNA za pomocą real-time PCR**

Celem zebrania materiału do analiz ekspresji genów powierzchnię komórek stymulowanych 72 godziny odpowiednim stężeniem kalcytriolu przepłukano roztworem PBS i komórki zebrano w 1ml odczynnika TRI Reagent. Lizaty komórkowe zebrane z trzech niezależnych pasaży przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **10.2.3.7.1. Izolacja RNA**

Izolację RNA wykonano za pomocą Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH, Tustin, CA, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Lizaty komórkowe w trizolu uzupełniono taką samą objętością 99,8% etanolu (Avantor Performance Materials Poland, Gliwice, Polska). Następnie na kolumny umieszczone w probówkach odbierających naniesiono 700µl zawiesiny, zwirowano ( $10\,000 \times g$ , 30 s) a objętość, która przepłynęła, wyrzucono. Ponownie naniesiono zawiesinę komórek i odwirowano, proces powtarzano do momentu związania całości materiału na kolumnie. Na jednej kolumnie związano materiał z trzech powtórzeń dla tej samej hodowli. Następnie kolumny przeniesiono do nowych probówek, naniesiono na nie 400µl RNA Wash Buffer i zwirowano ( $10\,000 \times g$ , 30 s). Przygotowano roztwór DNase I (na każdą kolumnę 5µl DNase I (6U/µl) i 75 µl DNA Digestion Buffer) i naniesiono na kolumnę. Tak przygotowane kolumny inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji naniesiono na kolumny po 400µl Direct-zol RNA PreWash i odwirowano ( $10\,000 \times g$ , 30 s), czynność powtórzono jeszcze raz. Następnie naniesiono na kolumny po 700µl RNA Wash Buffer, zwirowano przez 1 minutę ( $10\,000 \times g$ ). Celem elucji RNA kolumny przeniesiono do probówek typu eppendorf, uzupełniono 25-50ul DNase/RNase-Free Water i zwirowano (1min,  $10\,000 \times g$ ). Probówki z RNA

przeniesiono na lód. Stężenie RNA w próbkach mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

#### 10.2.3.7.2. Synteza cDNA

Syntezę cDNA wykonano na matrycy świeżo oczyszczonego RNA za pomocą SuperScript™ IV VILO Master Mix (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Maksymalną ilość matrycy (do 2,5µg) uzupełniono do 20µl Nuclease-free Water i dodano 4µl Master Mix (wszystkie odczynniki stanowią zestaw, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Odwrotną transkrypcję przeprowadzono w termocyklerze Veritii 9902 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) za pomocą programu: 10 minut w temp. 25°C, 10 minut w temp. 50°C i 5 minut w temp. 85°C. Zsyntetyzowane cDNA przechowywano w temp. -20°C do dalszych analiz.

#### 10.2.3.7.3. Przesiewowy real-time PCR na płytkach mikrofluidowych

W pierwszej kolejności wykonano przesiewowy real-time PCR celem wyboru najistotniejszych genów, na których ekspresję wpływa kalcytriol. W tym celu wykorzystano cDNA pochodzące z krótkoterminowych hodowli CAFs (niestymulowanych kalcytriolem i stymulowanych 10nM kalcytriolu) od 19 pacjentek (14 pacjentek przed menopauzą, 5 pacjentek po menopauzie). Zastosowana macierz, Human CAFs TaqMan™ Array Cards (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), została wykonana na zamówienie i zawierała zestawy starterów dla 62 genów (w tym 4 kontrole endogenne) zebranych w tabeli 10. Reakcję przygotowano zgodnie z instrukcją producenta (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), na każdy port: 110ng matrycy uzupełniono do 55µl nuclease-free water i połączono z 55µl Master Mix (2x). Port uzupełniono 100µl przygotowanej mieszaniny. Płytkę zwirowano w odpowiednich warunkach (dwukrotne wirowanie po 1 minucie, 1500 × g), sprasowano i usunięto przy pomocy nożyczek niepotrzebną jej część. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w aparacie ViiA™ 7 Real-Time PCR System zgodnie z programem – 40 cykli po 15s w temp. 95°C i 60s w temp. 60°C. Otrzymane wyniki opracowywano w oprogramowaniu QuantStudio™ Real-Time PCR Software oraz ExpressionSuite Software za pomocą metody porównawczej  $\Delta\Delta C_t$  względem kalibratora – kontroli niestymulowanej kalcytriolem.



Tabela 10. Spis genów i odpowiadającym im sond wykorzystanych do przesiewowej analizy ekspresji mRNA CAFs za pomocą macierzy PCR.

	NAZWA GENU	NAZWA SONDY	NAZWA GENU	NAZWA SONDY
<b>KONTROLE ENDOGENNE</b>	<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1	<i>MMP11</i>	Hs00171829_m1
	<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	<i>MMP1</i>	Hs00899658_m1
	<i>RPLP0</i>	Hs99999902_m1	<i>MMP2</i>	Hs00234422_m1
	<i>SDHA</i>	Hs00188166_m1	<i>MMP3</i>	Hs00968308_m1
	<i>ACTA2</i>	Hs05005341_m1	<i>MMP9</i>	Hs00234579_m1
	<i>CAV1</i>	Hs00971716_m1	<i>NFKB1</i>	Hs00765730_m1
	<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1	<i>PDGFA</i>	Hs00234994_m1
	<i>CDH1</i>	Hs00170423_m1	<i>PDGFB</i>	Hs00234042_m1
	<i>CDKN1A</i>	Hs00355782_m1	<i>PDPN</i>	Hs00366766_m1
	<i>CDKN2A</i>	Hs00923894_m1	<i>PECAMI</i>	Hs00169777_m1
<b>GENY BADANE</b>	<i>CSF1</i>	Hs00174164_m1	<i>PLAU</i>	Hs00170182_m1
	<i>CTGF</i>	Hs00170014_m1	<i>PTEN</i>	Hs02621230_s1
	<i>CXCL12</i>	Hs00171022_m1	<i>PTGES2</i>	Hs00228159_m1
	<i>CXCL1</i>	Hs00236937_m1	<i>PTGS2</i>	Hs00153133_m1
	<i>CXCL2</i>	Hs00601975_m1	<i>RARA</i>	Hs00940446_m1
	<i>CXCL8</i>	Hs00174103_m1	<i>RXRA</i>	Hs01067640_m1
	<i>CYP24A1</i>	Hs00167999_m1	<i>S100A4</i>	Hs00243202_m1
	<i>CYP27B1</i>	Hs00168017_m1	<i>SHH</i>	Hs00179843_m1
	<i>CYR61</i>	Hs00155479_m1	<i>SPARC</i>	Hs00277762_m1
	<i>DES</i>	Hs00157258_m1	<i>SPP1</i>	Hs00959010_m1
	<i>FAP</i>	Hs00990806_m1	<i>TGFB1</i>	Hs00998133_m1
	<i>FGF2</i>	Hs00960934_m1	<i>TGFBR2</i>	Hs00234253_m1
	<i>FGF7</i>	Hs00940253_m1	<i>THBS1</i>	Hs00962914_m1
	<i>FNI</i>	Hs00415008_m1	<i>THEM4</i>	Hs00940012_g1
	<i>HAS2</i>	Hs00193435_m1	<i>THY1</i>	Hs00174816_m1
	<i>HGF</i>	Hs00900066_m1	<i>TIMP1</i>	Hs00171558_m1
	<i>IDO1</i>	Hs00158032_m1	<i>TNC</i>	Hs01115664_m1
	<i>IGF2</i>	Hs04188276_m1	<i>TP53</i>	Hs00153349_m1
	<i>IL1B</i>	Hs01555413_m1	<i>TSLP</i>	Hs00263639_m1
	<i>IL6</i>	Hs99999032_m1	<i>VDR</i>	Hs01045840_m1
<i>LAMA1</i>	Hs01074480_m1	<i>VEGFA</i>	Hs00900055_m1	
<i>LOX</i>	Hs00942483_m1			

*ACTB* - aktyna  $\beta$ , *GAPDH* - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, *RPLP0* - 60S kwaśne białko rybosomalne P0, *SDHA* - podjednostka A kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej, *ACTA2* -  $\alpha$ -aktyna 2, *CAV1* - kaweolina 1, *CCL2* - ligand chemokiny motywu C-C 2, *CDH1* - kadheryna 1, *CDKN1A* - inhibitor kinaz zależnych od cyklin 1A, *CDKN2A* - inhibitor kinaz zależnych od cyklin 2A, *CSF1* - czynnik stymulujący tworzenie kolonii 1, *CTGF* - czynnik wzrostu tkanki łącznej, *CXCL12* - ligand chemokiny motywu C-X-C 12, *CXCL1* - ligand chemokiny motywu C-X-C 1, *CXCL2* - ligand chemokiny motywu C-X-C 2, *CXCL8* - ligand chemokiny motywu C-X-C 8, *CYP24A1* - polipeptyd 1 podrodziny A rodziny 24 cytochromu P450, *CYP27B1* - polipeptyd 1 podrodziny B rodziny 27 cytochromu P450, *CYR61* - angiogeny induktor bogaty w cysteine 61, *DES* - desmina, *FAP* - białko aktywacji fibroblastów, *FGF2* - czynnik wzrostu fibroblastów 2, *FGF7* - czynnik wzrostu fibroblastów 7, *FNI* - fibronektyna 1, *HAS2* - syntaza hialuronianu 2, *HGF* - czynnik wzrostu hepatocytów, *IDO1* - idolamina 1, *IGF2* - insulinopodobny czynnik wzrostu 2, *IL1B* - interleukina 1B, *IL6* - interleukina 6, *LAMA1* - podjednostka lamininy  $\alpha$ -1, *LOX* - oksydaza lizozylowa, *MMP11* - metaloproteinaza 11, *MMP1* - metaloproteinaza 1, *MMP2* - metaloproteinaza 2, *MMP3* - metaloproteinaza 3, *MMP9* - metaloproteinaza 9, *NFKB1* - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B 1, *PDGFA* - płytkopochodny czynnik wzrostu A, *PDGFB* - płytkopochodny czynnik wzrostu B, *PDPN* - podoplanina, *PECAMI* - cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna 1, *PLAU* - aktywator plazminogenu typu urokinazy, *PTEN* - homolog fosfatazy i tensyny, *PTGES2* - syntaza 2 prostoglandyny E, *PTGS2* - syntaza 2 endoperoksydazy prostaglandyny, *RARA* - receptor kwasu retinoidowego  $\alpha$ , *RXRA* - receptor retinoidów X  $\alpha$ , *S100A4* - białko wiążące wapń A4, *SHH* - homolog sonic hedgehog, *SPARC* - kwasowe białko wydzielnicze bogate w cysteine, *SPP1* - wydzielana fosfoproteina, *TGFB1* - transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ 1, *TGFBR2* - receptor II transformującego czynnika wzrostu beta, *THBS1* - trombospodny 1, *THEM4* - członek nadrodziny tioesteraz 4, *THY1* - antigen tymocytów Thy-1, *TIMP1* - ikankowy inhibitor metaloproteinaz 1, *TNC* - tenascyna C, *TP53* - białko nowotworów p53, *TSLP* - limfopoetyna zębą grasicy, *VDR* - receptpr witaminy D, *VEGFA* - czynnik wzrostu śródbłonna naczyńnowego A.

## 10.2.3.7.4. Real-time PCR dla wybranych genów

Na podstawie przesiewowego testu real-time PCR na płytkach mikrofluidowych wybrano geny do zbadania na wszystkich zebranych próbkach z hodowli CAFs stymulowanych kalcytriolem. W tym celu przygotowywano mieszaniny reakcyjne według następującego przepisu: 50ng cDNA/reakcję, 2x TaqMan™ Gene Expression Master Mix, woda DEPC oraz startery dla odpowiednich genów, zebranych w tabeli 11. Każdą próbkę nakładano w dwóch powtórzeniach technicznych na płytkę 96-dołkową typu fast. Reakcję przeprowadzono w aparacie ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) według programu: 40 cykli, w temp. 95°C przez 15s, w temp. 60°C przez 60s. Otrzymane wyniki opracowywano w oprogramowaniu QuantStudio™ Real-Time PCR Software oraz ExpressionSuite Software (oba Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) za pomocą metody porównawczej  $\Delta\Delta C_t$ . Ekspresję genów dla każdej hodowli oceniano względem własnej kontroli niestymulowanej kalcytriolem.

Tabela 11. Lista genów i odpowiadających im sond zastosowanych celem analizy ekspresji mRNA w CAFs stymulowanych kalcytriolem metodą Real-time PCR.

	NAZWA GENU	NAZWA SONDY
<b>KONTROLE EDOGENNE</b>	<i>GAPDH</i>	Hs99999905 m1
	<i>RPLP0</i>	Hs99999902 m1
	<i>CCL2</i>	Hs00234140 m1
	<i>MMP9</i>	Hs00234579 m1
<b>GENY BADANE</b>	<i>PDPN</i>	Hs00366766 m1
	<i>SPP1</i>	Hs00959010 m1
	<i>TIMP1</i>	Hs00171558 m1
	<i>TNC</i>	Hs01115664 m1
	<i>VDR</i>	Hs01045840 m1

*GAPDH* - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, *RPLP0* - 60S kwaśne białko rybosomalne P0, *CCL2* - ligand chomokiny motywu C-C 2, *MMP9* - metaloproteinaza 9, *PDPN* - podoplanina, *SPP1* - wydzielana fosfoproteina 1, *TIMP1* - tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1, *TNC* - tenascyna C, *VDR* - receptor witaminy D

#### 10.2.3.8. Analiza poziomu produkowanych białek w supernatantach znad hodowli za pomocą testów ELISA

Po 72 godzinach hodowli z kalcytriolem zebrano medium znad komórek, zwirowano i poporcjowano do probówek typu eppendorf. Supernatanty przechowywano w temp. -80°C. Testy ELISA wykonano zgodnie z instrukcją producentów. Zastosowane testy zebrano w tabeli 12. Wartości stężeń białek w supernatantach obliczono z zastosowaniem równania krzywej wyznaczonej w programie CurveExpert 1.4.

Tabela 12. Lista zestawów ELISA wykorzystanych do analizy poziomu białek wydzielanych przez CAFs.

Analizowane białko	Nr katalogowy	Producent
CCL2	BMS281	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA
CXCL12	orb397041	Biorbyt, Cambridge, UK
HGF	orb774897	Biorbyt, Cambridge, UK
MMP9	BMS2016-2	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA
OPN	EHSP1	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA
TNC	EH446RB	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA

*CCL2* – ligand chemokiny motywu C-C 2, *CXCL12* – ligand chemokiny motywu C-X-C 12, *HGF* – czynnik wzrostu hepatocytów, *MMP9* – metaloproteinaza 9, *OPN* – osteopontyna, *TNC* – tenascyna C

### 10.2.3.9. Analiza poziomu wybranych białek w lizatach komórkowych za pomocą techniki Western-blot

#### 10.2.3.9.1. Przygotowanie lizatów

Po 72-godzinnej inkubacji z kalcytriolem powierzchnię komórek przepłukano roztworem PBS, który dokładnie zebrano i na powierzchnię komórek nakropiono 100 µl roztworu RIPA z koktajlem inhibitorów fosfataz 2 i 3 oraz inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Komórki zdjęto za pomocą skrobaków (Corning, New York, USA), inkubowano 30 minut na lodzie i przeniesiono do probówek typu eppendorf. Lizaty mrożono w ciekłym azocie, następnie wirowano w temp. 4°C przez 10 minut (10 000 × g). Supernatanty zebrano do nowych probówek typu eppendorf. Tak przygotowane lizaty przechowywano w temp. -80°C. W zebranych próbkach (rozcieńczonych 10-krotnie) oznaczono stężenie białka zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 10.1.1.1.1.

#### 10.2.3.9.2. Western-blot

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono w warunkach denaturujących na samodzielnie przygotowanych 10% żelach poliakrylamidowych zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 10.2.1.2. Białko (po 25µg białka na studzienkę) oraz standard mas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nanoszono na studzienki w żelu. Elektroforezę, transfer oraz dalsze etapy analiz western-blot przeprowadzono zgodnie z opisem w rozdziale 10.2.1.2. Analizie poddano ekspresję idolaminy 1 (IDO1), OPN, TGFβ1, tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 (TIMP1), dla których wykaz zastosowanych przeciwciał, ich rozcieńczeń i producentów przedstawiono w tabeli 13.

*Tabela 13. Spis przeciwciał zastosowanych w analizie poziomu białka w lizatach CAFs metodą Western-blot, ich producenci i zastosowane rozcieńczenia.*

<b>Celowane białko</b>	<b>Rozcieńczenie</b>	<b>Producent</b>
<b>IDO1</b>	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA
<b>OPN</b>	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA
<b>TGFβ1</b>	1:500	Proteintech, Rosemont, USA
<b>TIMP1</b>	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA

*IDO1 – idolamina 1, OPN – osteopontyna, TGFβ1 – transformujący czynnik wzrostu β1, TIMP1 – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1*

Analizę densytometryczną wykonano w oprogramowaniu ImageJ. Wyniki normalizowano podwójnie względem ekspresji β-aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem.

### **10.2.3.10. Analiza aktywności żelatynaz metodą zymografii żelatynowej**

#### **10.2.3.10.1. Przygotowanie lizatów i zebranie supernatantów**

Celem zebrania materiału do oceny aktywności żelatynaz, MMP2 i MMP9, w lizatach CAFs komórki hodowano na szalkach o średnicy 10cm w liczbie  $4 \times 10^5$  według opisu w rozdziale 10.2.3.4. Po 72-godzinnej inkubacji powierzchnię komórek dwukrotnie przepłukano schłodzonym przez 20 minut na lodzie roztworem PBS, który dokładnie zebrano i na powierzchnię komórek nakropiono po 100μl schłodzonego na lodzie 1% roztworu lizującego z NP-40 (50mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl; PChO IITD, Wrocław, Polska; Merck, Darmstadt, Niemcy). Komórki zdjęto za pomocą skrobaczek (Corning, New York, USA), przeniesiono do probówek typu eppendorf i inkubowano 15 minut na lodzie. Następnie lizaty wirowano w temp. 4°C przez 20 minut ( $16\ 000 \times g$ ). Supernatanty lizatów z nad osadu zebrano do świeżych probówek typu eppendorf. Tak przygotowane lizaty przechowywano w temp. -80°C. W zebranych próbkach (rozcieńczonych 10-krotnie) oznaczono białko zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 10.1.1.1.1.

#### **10.2.3.11. Zymografia żelatynowa**

Rozdział elektroforetyczny białek został przeprowadzony w warunkach niedenaturujących na samodzielnie przygotowanych 10% żelach poliakrylamidowych z 0,1% żelatyny (1mg/ml, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Żele zostały przygotowane zgodnie z instrukcją przedstawioną w rozdziale 10.2.1.2 z niewielką modyfikacją - 750μl wody MiliQ zostało zastąpione 10mg/ml roztworem żelatyny (objętość podana na 1 żel). Zawiesiny lizatów białkowych (po 25μg białka na studzienkę) i rozpuszczonych w wodzie standardów MMP2 i MMP9 (po 25ng na studzienkę, Sigma-Aldrich, Saint

Louis, USA) mieszano z 4x Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, USA) w stosunku 1:3 i uzupełniano roztworem 1% buforu lizującego NP-40 do równej objętości (14µl dla lizatów). Próbek nie gotowano. Próbki, standard mas oraz standardy MMP2 i MMP9 nanoszono na studzienki w żelu. Elektroforezę przeprowadzono przy stałym napięciu prądu (100V przez pierwsze 20 minut, następnie 120V) oraz zmiennym natężeniu (ustawionym na wartość 0,6A) do momentu sięgnięcia przez barwnik dolnego końca żelu (około 90 minut). Żele uwolniono z szybek, umieszczono w pojemniczkach pozwalających na zmieszczenie się całego żelu, krótko płukano wodą MiliQ. Następnie żele zalano 1x Zymogram Renaturing Buffer (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA), inkubowano przez 30 minut z lekkim kołysaniem w temperaturze pokojowej. Jednokrotnie płukano wodą i zalano 50ml 1x Developing Buffer (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) na 30 minut. Bufor zlano znad żelu, dodano 100ml 1x Developing Buffer i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C (w inkubatorze), pojemnik zabezpieczono parafilmem. Po nocnej inkubacji żel 3-krotnie płukano wodą MiliQ po 5 minut przy lekkim kołysaniu. Żel zalano barwnikiem SimplyBlue™ SafeStain w objętości 30ml (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) i inkubowano godzinę z lekkim kołysaniem w temperaturze pokojowej. Barwnik zlano, żel płukano dwukrotnie wodą MiliQ po 60 minut. Zdjęcie żelu wykonano przy pomocy aparatu ChemiDoc Imaging System. Analizę densytometryczną wykonano w oprogramowaniu ImageJ. Wyniki normalizowano względem kontroli niestymulowanej kalcytriolem.

#### 10.2.4. Badania *in vitro*

##### 10.2.4.1. Badanie wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na właściwości komórek raka gruczołu sutkowego

###### 10.2.4.1.1. Przygotowanie medium kondycjonowanego znad CAFs stymulowanych kalcytriolem

W celu zebrania CM znad CAFs komórki w dniu pasażu wysiewano na szalki o średnicy 10 cm w liczbie  $400 \times 10^5$  komórek na szalkę w 4ml medium dla CAFs – po 3 szalki na każdą hodowlę. Następnego dnia (po 24h) na komórki nakładano kolejne 4ml medium: 1) bez dodatków, 2) zawierające 2nM kalcytriolu (końcowe stężenie 1nM) oraz 3) zawierające 20nM kalcytriolu (końcowe stężenie 10nM). Po upłygnięciu 72 godzin medium znad komórek wyrzucano, powierzchnię komórek delikatnie płukano roztworem PBS i nakładano 4ml medium dla CAFs pozbawione surowicy. Po 24 godzinach medium zebrano do probówek, zwirowano (7 minut,  $350 \times g$ ) celem odrzucenia komórek które mogły się odkleić, supernatanty znad osadów podzielono na mniejsze porcje i zamrożono w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ , celem dalszych analiz. Przed zastosowaniem medium powoli rozmrażano na lodzie i łączono 1:1 z medium właściwym dla danych komórek.

###### 10.2.4.1.2. Test migracji komórek nowotworowych w obecności medium kondycjonowanego znad CAFs

Test migracji wykonano za pomocą techniki zwanej *scratch assay* lub *wound healing assay*. Komórki nowotworowe linii MCF-7 i MDA-MB-231 w dniu pasażu wysiano na płytki 24-dołkowe po 500 tysięcy komórek na dołek. Po 24 godzinach za pomocą końcówki na 1000 $\mu\text{l}$  wykonano rysę biegnącą przez środek dołka. Dołek przepłukano delikatnie obecnym w nim medium celem wygładzenia krawędzi rysy i pozbycia się odklejonych komórek. Następnie nakładano po 500 $\mu\text{l}$  CM (1:1 - 2% FBS medium dla danej linii z CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych 1nM oraz 10nM kalcytriolem) lub dla kontroli niestymulowanej samo medium zawierające 2% FBS. Dla każdego dołka wykonano po 3 zdjęcia w czasie 0h, 3h i 6h. Celem zwiększenia powtarzalności wykonywanych zdjęć w różnych odstępach czasowych, przed wysianiem komórek na spodzie płytki narysowano linię biegnącą przez środek dołka z kilkoma poprzecznymi punktami. Szerokość rany mierzono w 5 punktach z każdego zdjęcia za pomocą oprogramowania Stream Start 1.6.1. Wyniki przedstawiano jako zmiana dystansu migracji liczonego za pomocą formuły:

$$Dystans = \frac{\text{szerokość rysy w godzinie 0} - \text{szerokość rysy w 3 lub 6 godzinie}}{2}$$

#### 10.2.4.1.3. Stymulacja komórek linii MDA-MB-231 i MCF-7 medium kondycjonowanym znad CAFs

Komórki nowotworowe linii MCF-7 i MDA-MB-231 w dniu pasażu wysiano na płytki 6-dołkowe w liczbie 170 tysięcy (MDA-MB-231) lub 150 tysięcy (MCF-7) komórek na dołek. Po 24 godzinach nałożono CM znad CAFs w stosunku 1:1 do obecnego w dołkach medium lub w przypadku kontroli niestymulowanej dodano medium właściwe dla linii. Komórki stymulowano przez 72 godziny.

#### 10.2.4.1.4. Analiza poziomu ekspresji wybranych białek techniką Western-blot w lizatach komórkowych

##### 10.2.4.1.4.1. Przygotowanie lizatów

Po 72-godzinnej inkubacji medium znad komórek odrzucono, powierzchnię komórek dwukrotnie przepłukano schłodzonym przez 20 minut na lodzie roztworem PBS, który dokładnie zebrano i na powierzchnię komórek nakropiono po 50µl schłodzonego na lodzie 1% roztworu lizującego z NP-40. Komórki zdjęto za pomocą skrobaków (Corning, New York, USA), przeniesiono do probówek typu eppendorf i inkubowano 15 minut na lodzie. Następnie lizaty wirowano w temp. 4°C przez 20 minut (16 000 × g). Supernatanty znad osadu zebrano do świeżych probówek typu eppendorf. Tak przygotowane próbki przechowywano w temp. -80°C. W zebranych lizatach (rozcieńczonych 10-krotnie) oznaczono białko zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 10.1.1.1.1.

##### 10.2.4.1.4.2. Western-blot

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono w warunkach denaturujących na samodzielnie przygotowanych 10% (dla OPN i E-kadheryny) lub 7% (dla ZEB1) żelach poliakrylamidowych zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 10.2.1.2. Objętości odczynników użytych do przygotowania 7% żelu przedstawiono w tabeli 14. Białko (po 20µg białka na studzienkę) oraz standard mas nanoszono na studzienki na żelach. Elektroforezę, transfer oraz dalsze etapy analiz western-blot przeprowadzono zgodnie z opisem w rozdziale 10.2.1.2. Analizie poddano ekspresję E-kadheryny, OPN i ZEB1, dla których wykaz zastosowanych przeciwciał, ich rozcieńczeń i producentów przedstawiono w tabeli 15. Analizę densytometryczną wykonano w oprogramowaniu

ImageJ. Wyniki normalizowano podwójnie względem ekspresji  $\beta$ -aktyny i kontroli niestymulowanej CM.

Tabela 14. Spis odczynników i ich objętości niezbędnych do przygotowania 7% żelu poliakryloamidowego.

Nazwa odczynnika	Objętość		Producent
	Żel rozdzielający	Żel zagęszczający	
bufor TRIS-HCl o pH=8,8 (45,5g TRIS, 1g SDS)	3,75ml	-	PChO IITD, Wrocław, Polska
bufor TRIS-HCl o pH=6,8 (15,1 g TRIS, 1 g SDS)	-	1,25ml	PChO IITD, Wrocław, Polska
30% roztwór mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (37,5:1)	1,9ml	0,325ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Woda MiliQ	1,9ml	0,9ml	PChO IITD, Wrocław, Polska
10% APS	37,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TEMED	7,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	BioShop, Burlington, Kanada

Tabela 15. Spis przeciwciał zastosowanych w analizie poziomu białka w lizatach MDA-MB-231 oraz MCF-7 metodą Western-blot, ich producenci i zastosowane rozcieńczenia.

Celowane białko	Rozcieńczenie	Producent
<b>E-kadheryna</b>	1:5000	Proteintech, Rosemont, USA
<b>OPN</b>	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA
<b>ZEB1</b>	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA

OPN – osteopontyna, ZEB1 – homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym

## 11. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software Inc., USA). Normalność rozkładu sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilk'a. Analizy dwóch grup spełniające założenia rozkładu normalnego analizowano za pomocą testu t-studenta, nie spełniające założeń rozkładu normalnego testem U Mann-Whitney'a. Przy analizach dla większej liczby grup wykorzystano jednoparametryczny test ANOVA (dla rozkładu normalnego) lub Kruskal-Wallis'a (dla rozkładu odstającego od normalnego). W obu wypadkach stosowano zalecane poprawki dla wielokrotnych porównań. Wyniki przedstawiano w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) lub błąd standardowy średniej (SEM) zgodnie ze wskazaniem w opisie pod wykresem. Istotność statystyczną oznaczano za pomocą gwiazdek: \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



## WYNIKI

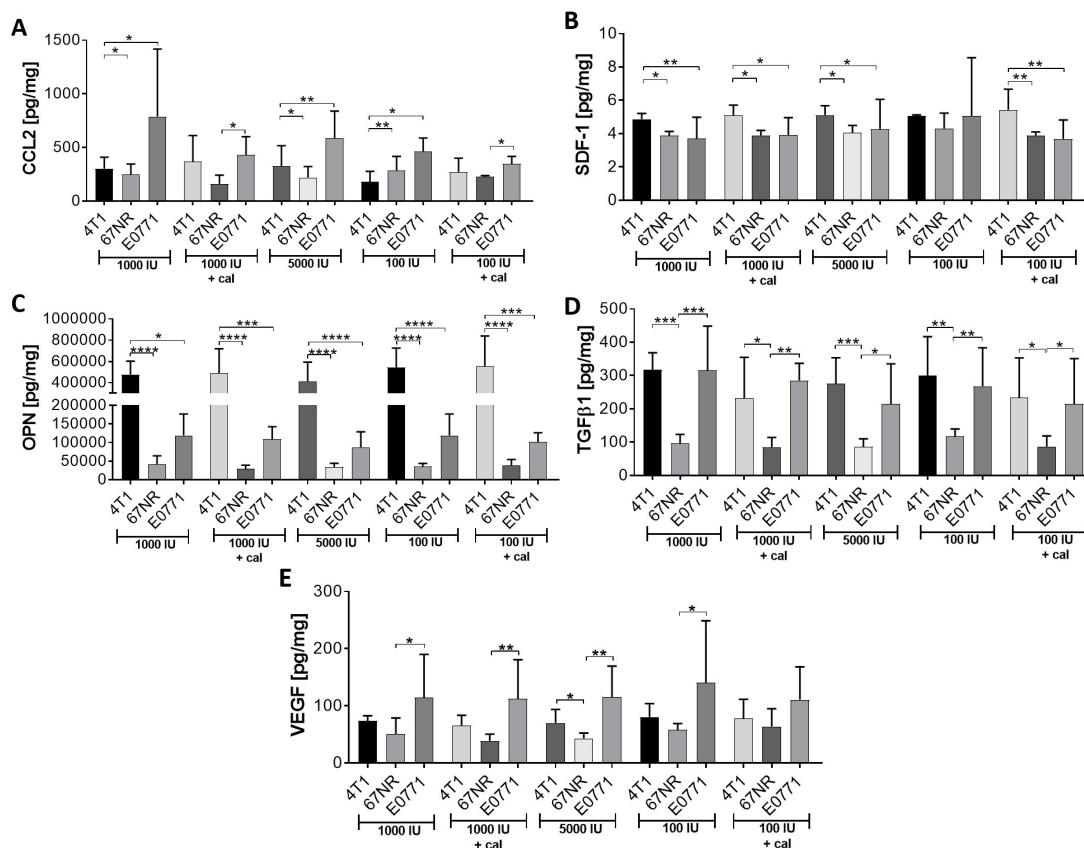
**12. Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na mysie CAFs i NFs****12.1. Badania *in vivo***

Dopiero po pięciu tygodniach podawania karmy o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> udało się zaobserwować różnice w poziomie metabolitów witaminy D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>) w osoczu myszy pochodzących z różnych grup, dlatego w szóstym tygodniu wszczepiono myszom komórki nowotworowe. U zdrowych myszy i u myszy obarczonych różnymi rakami gruczołu sutkowego wysoka podaż witaminy D<sub>3</sub> (5000IU) skutkowałą zwiększeniem poziomu wszystkich analizowanych metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu. Z kolei podania kalcytriolu (od 7 dnia po wszczepieniu nowotworu) zarówno myszom karmionym dietą z normalną, jak i z deficytową zawartością witaminy D<sub>3</sub> skutkowałą obniżeniem poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub>. Dieta ze zróżnicowaną zawartością witaminy D<sub>3</sub> oraz podania kalcytriolu nie wpłynęły na kinetykę wzrostu guzów mysich raków gruczołu sutkowego 4T1 i E0771. W przypadku komórek 67NR przejściowe zahamowanie wzrostu guza zaobserwowano 23 dnia eksperymentu u myszy z grupy 1000IU+cal. Zarówno dieta bogata w witaminę D<sub>3</sub>, jak i kalcytriol zwiększyły liczbę przerzutów do płuc (ocenionych makroskopowo) u myszy obarczonych komórkami 4T1. Nie zaobserwowano istotnych zmian w przypadku drugiego przerzutującego raka gruczołu sutkowego - E0771. Niską ekspresję VDR w tkance guza 4T1 zaobserwowano w grupach 5000IU i 100IU+cal. Podobną tendencję zaobserwowano również w guzach myszy z deficytem witaminy D<sub>3</sub>. W tych grupach (5000IU, 100IU, 100IU+cal) również ekspresja CYP2R1 była istotnie niższa niż w guzach myszy otrzymujących dietę z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> (1000IU, 1000IU+cal). W przypadku guzów E0771 najwyższa ekspresja CYP2R1 obecna była w guzach myszy z deficytem witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych kalcytriolem. Zarówno w guzach 67NR, jak i E0771 ekspresja CYP27B1 była istotnie wyższa w guzach myszy z deficytem witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych kalcytriolem (67NR: 100IU+cal vs 1000IU+cal, 5000IU; E0771: 100IU+cal vs 1000IU). Wpływ zastosowanej diety i doustnego podawania kalcytriolu na kinetykę wzrostu guza, powstawanie przerzutów, poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy oraz ekspresję receptora dla witaminy D<sub>3</sub> i enzymów uczestniczących w metabolizmie witaminy D<sub>3</sub> zostały szczegółowo opisane w publikacji naszego zespołu [77]. Artur Anisiewicz oraz Joanna Banach prowadzili eksperymenty na myszach ze wsparciem moim i Martyny Stachowicz-

Suhs (podania kalcytriolu, pomiary masy ciała, wielkości guza, pobrania krwi z żyły jarzmowej celem oceny poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu). Mój udział polegał na ważeniu myszy, zmianie paszy oraz podawaniu myszom podskórnice buprenorfiny w dniu sekcji i przeprowadzaniu sekcji myszy nieobarczonych rakami gruczołu sutkowego. Analizy metabolitów witaminy D<sub>3</sub> zostały wykonane przez Konrada Kowalskiego w Masdiag Sp. z o.o.. Ocenę makroskopową przerzutów raków gruczołu sutkowego w płucach wykonali Artur Anisiewicz i Joanna Banach. Poziom VDR, CYP2R1, CYP24A1 i CYP27B1 w tkankach guzów metodą western-blot został zbadany przeze mnie i Martynę Stachowicz-Suhs.

### 12.1.1. Porównanie poziomu wybranych białek w tkankach guzów pochodzących od myszy obciążonych mysimi rakami gruczolu sutkowego

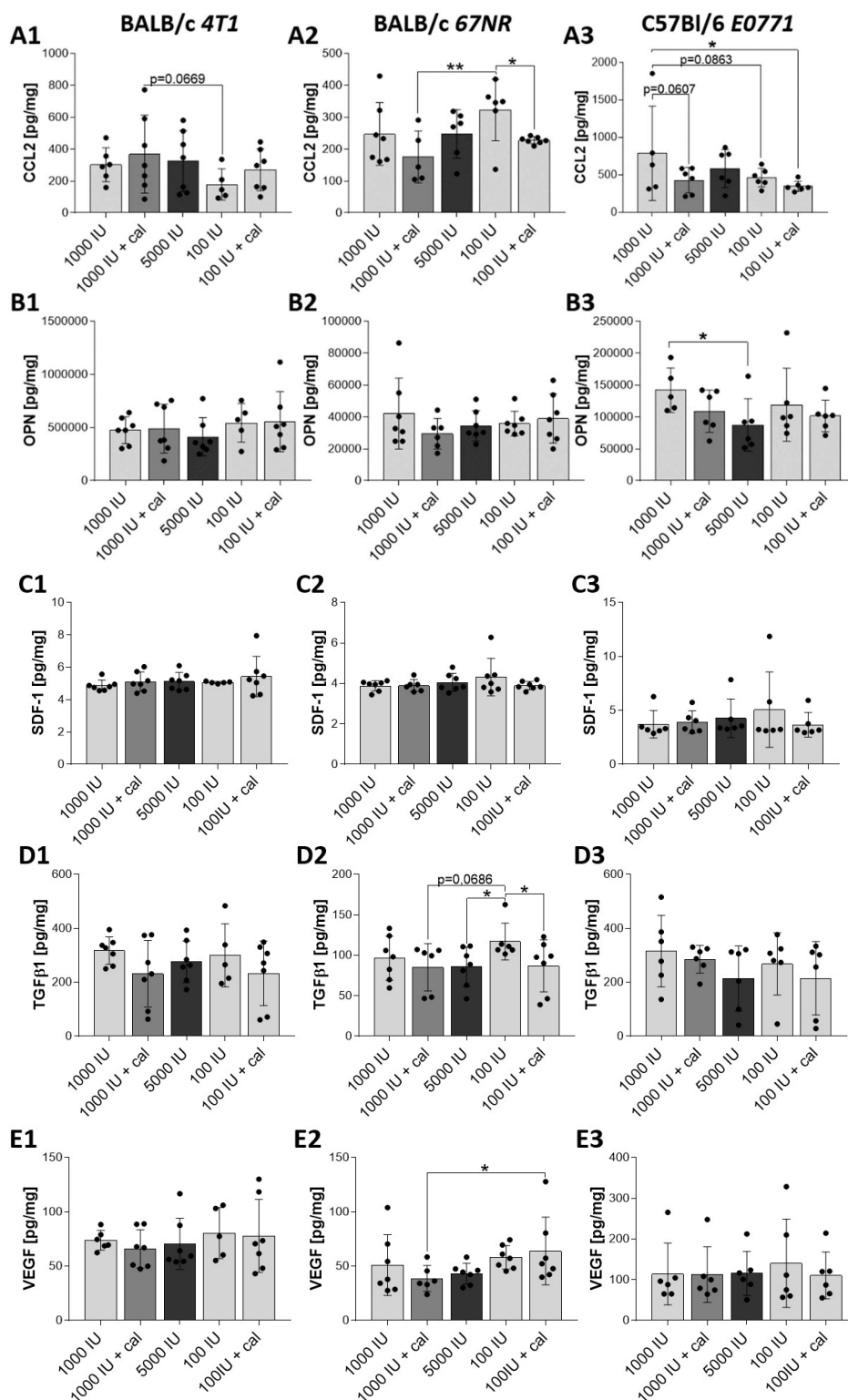
Przy pomocy testów ELISA ocenie zostały poddane następujące białka: CCL2, OPN, SDF-1, TGFβ1 oraz VEGF (Rycina 8). Guzy E0771 charakteryzuje największy poziom CCL2 i VEGF (Rycina 8A i 8E) w porównaniu do pozostałych (67NR i/lub 4T1) niezależnie od grupy, do której należały myszy. Komórki guzów 4T1 wyróżnia najwyższy poziom SDF-1 i OPN (Rycina 8B i 8C), zaś 67NR najniższy TGFβ1 (Rycina 8D).



**Rycina 8. Porównanie poziomu wybranych białek w mysich guzach za pomocą testów ELISA.** A - CCL2 (ligand chemokiny motywu C-C 2), B - SDF-1 (czynnik pochodzenia zrębowego 1), C - OPN (osteopontyna), D - TGFβ1 (transformujący czynnik wzrostu β 1) i E - VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń). 4T1 - guzy od myszy szczepu BALB/c obciążonych komórkami 4T1, 67NR - obciążonych komórkami 67NR, E0771 - guzy od myszy szczepu C57BL/6 obciążonych komórkami E0771. n=6-7. Stężenie białek obliczono w oparciu o krzywą z pomocą oprogramowania CurveExpert 1.4. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 12.1.2. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy i doustnych podań kalcytriolu na poziom wybranych białek w mysich guzach

U myszy obarczonych komórkami 4T1 najwyższy poziom **CCL2** zaobserwowano w grupie 1000IU+cal, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p=0,0669$ ) oraz nie zaobserwowano wzrostu poziomu tej cytokiny w drugiej grupie z dodatkowymi podaniami kalcytriolu (100IU+cal) (Rycina 9A1). Model 67NR charakteryzuje najwyższy poziom CCL2 w grupie myszy karmionych dietą z deficytem witaminy D<sub>3</sub>, podawanie kalcytriolu istotnie obniżyło jej poziom (Rycina 9A2). Zaś w modelu E0771 największe stężenie CCL2 obserwuje się w guzach myszy karmionych dietą kontrolną (1000IU) w porównaniu do 1000IU+cal ( $p=0,0607$ ), 100IU ( $p=0,0863$ ) oraz 100IU+cal (Rycina 9A3). Zróżnicowana dieta i podania kalcytriolu nie wpłynęły na stężenie **OPN** w tkance guza myszy obarczonych komórkami 4T1 oraz 67NR (Rycina 9B1-2). W przypadku E0771 obserwuje się istotny spadek jej poziomu w grupie 5000IU w porównaniu do kontroli (Rycina 9B3). Poziom **SDF-1** (CXCL12) w tkance guza nie różnił się między grupami w żadnym z badanych modeli (Rycina 9C1-3), natomiast **TGFβ1** nie różnił się między grupami w modelach 4T1 i E0771 (Rycina 9D1 i D3). W przypadku guzów 67NR zaobserwowano znacznie większy poziom **TGFβ1** w grupie 100IU w porównaniu do 1000IU+cal ( $p=0,0686$ ), 5000IU oraz 100IU+cal (Rycina 9D2). Stężenie **VEGF** w tkance guza nie różniło się istotnie między grupami z wyjątkiem modelu 67NR, gdzie zaobserwowano różnicę w poziomie VEGF między grupami myszy, którym podawano kalcytriol – stężenie VEGF było znacznie wyższe w guzach myszy z grupy 100IU+cal w porównaniu do 1000IU+cal (Rycina 9E2).



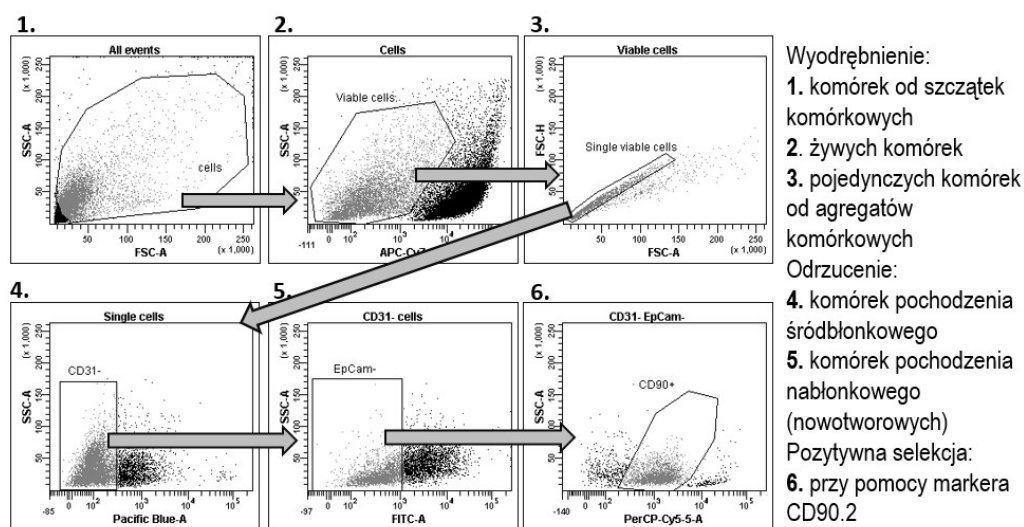
**Rycina 9. Ocena wpływu diety o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> oraz podań kalcytriolu na stężenie wybranych białek w mysich guzach za pomocą testów ELISA:** A1-3 - CCL2 (ligand chemokiny motywu C-C 2), B1-3 - OPN (osteopontyna), C1-3 - SDF-1 (czynniki pochodzenia zrębowego 1), D1-3 - TGFβ1 (transformujący czynnik wzrostu β 1) i E1-3 - VEGF (czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego). 1 - guzy od myszy szczepu BALB/c obciążonych komórkami 4T1, 2 - obciążonych komórkami 67NR, 3 - guzy od myszy szczepu C57BL/6 obciążonych komórkami E0771. n=6-7. Stężenie białek obliczono w oparciu o krzywą z pomocą oprogramowania CurveExpert 1.4. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 12.1.3. Charakterystyka CAFs i NFs pochodzących od myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu sutkowego – porównanie zastosowanych modeli badawczych

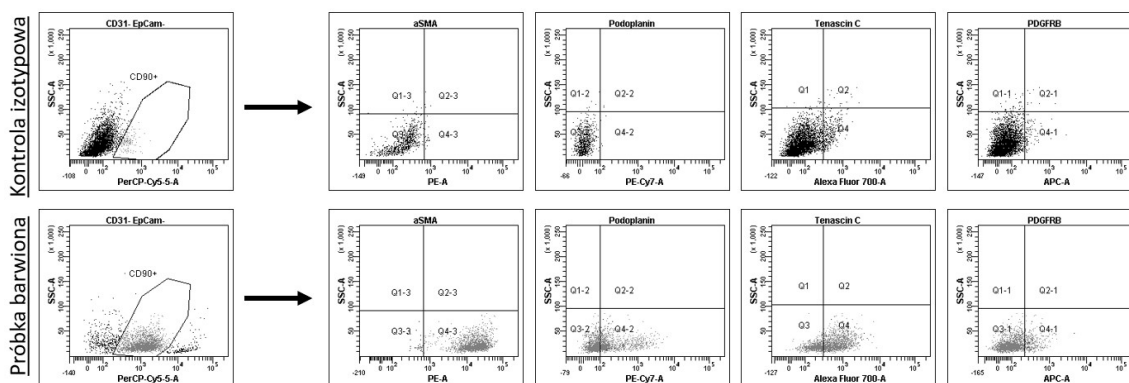
Analizie poddano CAFs pochodzące z guzów oraz NFs pochodzące z płuc myszy obarczonych rakami gruczołu sutkowego. Porównaniu poddano fibroblasty pochodzące z guzów lub płuc myszy z grup kontrolnych 1000IU.

#### 12.1.3.1. Charakterystyka CAFs w guzach mysich raków gruczołu sutkowego

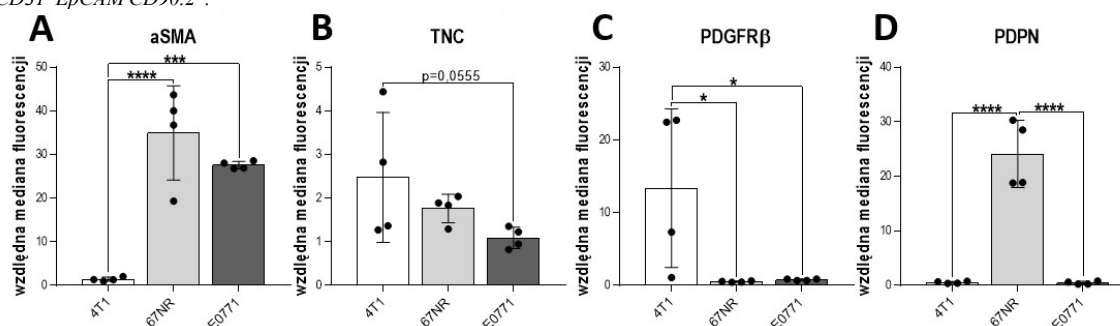
Populacja CAFs została wybrana zgodnie ze schematem zaprezentowanym na rycinie 10. Poziom białek typowych dla CAFs ( $\alpha$ SMA, PDPN, TNC i PDGFR $\beta$ ) został wyznaczony jako względna mediana fluorescencji dla komórek o fenotypie CD31<sup>-</sup> EpCAM<sup>-</sup>CD90.2<sup>+</sup> (Rycina 11). Ekspresja CD90.2 jest charakterystyczna dla fibroblastów stromy. Bramkowanie komórek CD90.2<sup>+</sup> pozwalało na wyłączenie z analizy NFs okolicznych tkanek [217]. CAFs z guzów 4T1 charakteryzował najmniejszy poziom  $\alpha$ SMA (Rycina 12A), największy TNC (Rycina 12B) i receptora dla PDGF $\beta$  (w porównaniu do 67NR i E0771; Rycina 12C), zaś największy poziom PDPN zaobserwowano na CAFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c obarczonych komórkami 67NR (Rycina 12D).



Rycina 10. Strategia bramkowania podczas analizy cytometrycznej mysich CAFs.



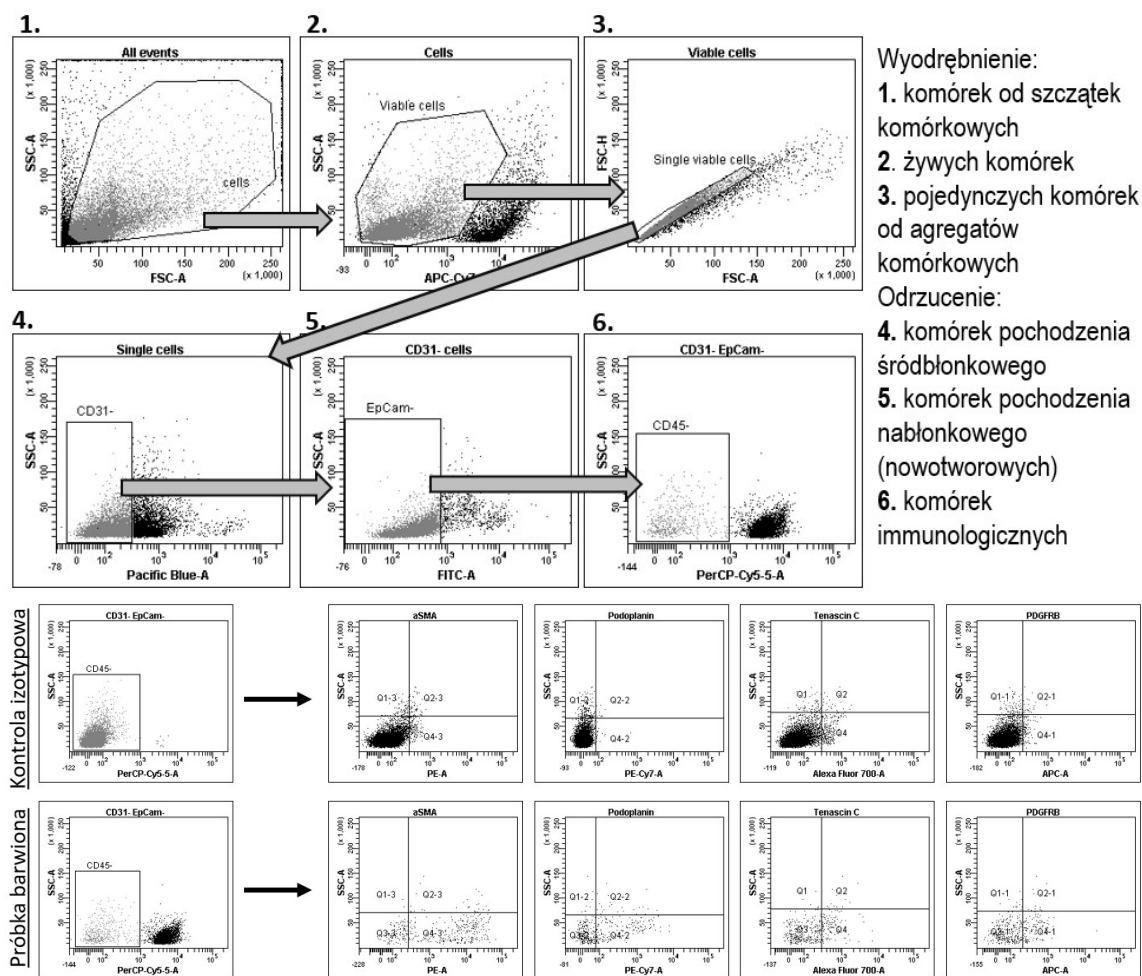
Rycina 11. Przykładowe wykresy poziomu analizowanych białek typowych dla mysich CAFs. Analizie poddano komórki o fenotypie  $CD31^+ EpCAM^+ CD90.2^+$ .



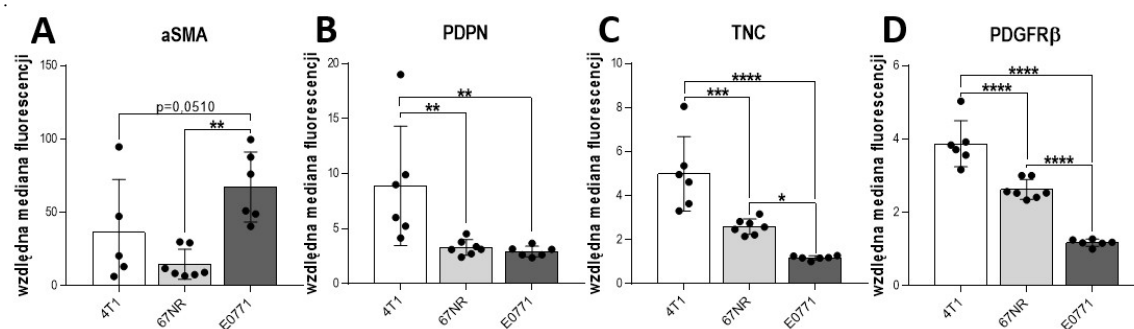
Rycina 12. Porównanie poziomu wybranych białek między CAFs pochodzącymi z guzów myszy obciążonych komórkami różnych mysich raków gruczołu sutkowego: A –  $\alpha$ SMA ( $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich), B – TNC (tenascyna C), C – PDGFR $\beta$  (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ ), D – PDPN (podoplanina). Analizie poddano komórki  $EpCAM^+ CD31^+ CD90.2^+$ . Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. 4T1 - CAFs pochodzące z guzów myszy szczepu BALB/c obciążonych 4T1, 67NR - obciążonych 67NR, E0771 - myszy szczepu C57BL/6 obciążonych E0771. Porównanie dotyczy myszy z grupy kontrolnej (1000IU).  $n=4$ . Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

### 12.1.3.2. Charakterystyka NFs w płucach myszy obciążonych rakami gruczołu sutkowego

Populacja NFs do analizy została wyselekcjonowana zgodnie ze schematem bramkowania przedstawionym na rycinie 13. Poziom białek typowych dla CAFs ( $\alpha$ SMA, PDPN, TNC i PDGFR $\beta$ ) został wyznaczony jako względna mediana fluorescencji dla komórek o fenotypie  $CD31^+ EpCAM^+ CD45^-$  (Rycina 13). Największy poziom  $\alpha$ SMA obserwuje się w NFs płuc myszy obciążonych E0771 (Rycina 14A). Sprzecznie do wyników dla CAFs, największy poziom PDPN obserwuje się na NFs w modelu 4T1 (a nie 67NR) (Rycina 14B). Podobnie jak w przypadku CAFs największym poziomem TNC i PDGFR $\beta$  charakteryzowały się NFs płuc myszy obciążonych komórkami 4T1 (Rycina 14C i 14D). Dodatkowo NFs płuc myszy obciążonych komórkami 67NR cechował również wyższy poziom tych białek w porównaniu do E0771.



Rycina 13. Górny panel: Strategia bramkowania podczas analizy cytometrycznej NFs płuc myszy obciążonych nowotworem. Dolny panel: przykładowe wykresy poziomu wybranych białek dla NFs myszy obciążonych nowotworem. Analizie poddano komórki o fenotypie CD31<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>.

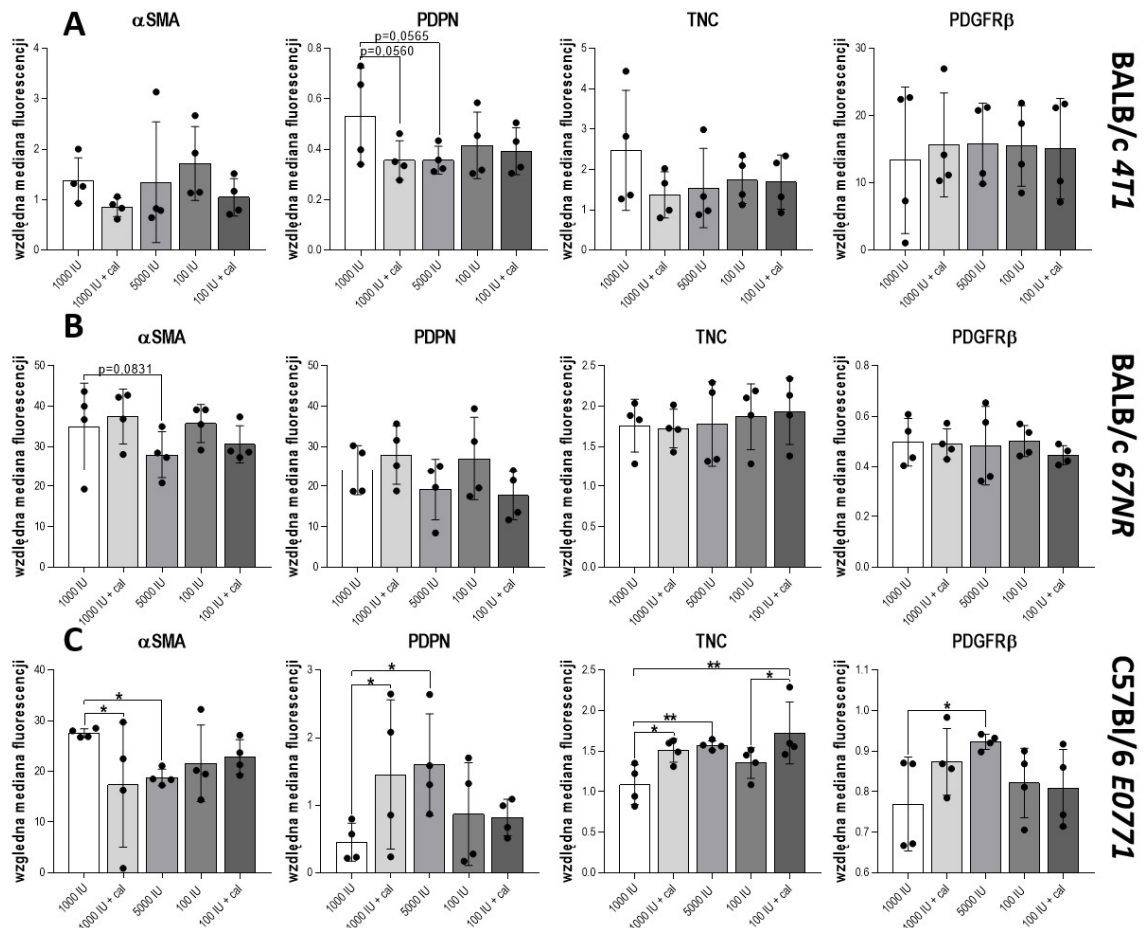


Rycina 14. Porównanie poziomu wybranych białek między NFs płuc myszy obciążonych rakami gruczołu sutkowego: A – αSMA (α-aktyna mięśni gładkich), B – PDPN (podoplanina), C – TNC (tenascyna C), D – PDGFRβ (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β). Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>. 4T1 - NFs pochodzące z płuc myszy szczepu BALB/c obciążonych komórkami 4T1, 67NR – obciążonych komórkami 67NR, E0771 - od myszy szczepu C57BL/6 obciążonych komórkami E0771. Porównanie dotyczy myszy z grupy kontrolnej (1000IU). n=6. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.



#### 12.1.4. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na poziom białek specyficznych dla CAFs raka gruczołu sutkowego

Zróżnicowana dieta oraz podawanie kalcytriolu nie wpłynęły istotnie na poziom białek typowych dla CAFs pochodzących z guzów myszy obarczonych guzami 4T1 i 67NR (Rycina 15A i 15B). Poziom **PDPN** w modelu E0771 był istotnie większy w grupach 1000+cal i 5000IU (vs 1000IU) (Rycina 15C). Przeciwną tendencję zaobserwowano w modelu 4T1 - dodatkowe podania kalcytriolu lub dieta bogata w witaminę D<sub>3</sub> przełożyły się na spadek poziomu PDPN na CAFs (1000IU vs 1000IU+cal p=0,0560, 5000IU p=0,0565) (Rycina 15A). W modelu E0771 poziom **αSMA** znacząco spadł w CAFs myszy z grup 1000IU+cal oraz 5000IU w porównaniu do fibroblastów myszy karmionych dietą kontrolną (1000IU) (Rycina 15C). W modelu 67NR zaobserwowano podobną tendencję – obniżenie poziomu αSMA u myszy w grupie z dietą z nadmiarem witaminy D<sub>3</sub> (5000IU vs 1000IU, p=0,0831) (Rycina 15B). Podawanie kalcytriolu myszom z diety niedoborowej przełożyło się na zwiększony poziom **TNC** na CAFs E0771 (100IU+cal vs 100IU), ponadto największy poziom tego białka zaobserwowano właśnie w grupie 100IU+cal (vs 1000IU) (Rycina 15C). Podniesiony w stosunku do grupy kontrolnej poziom TNC zaobserwowano również w grupach 100IU+cal i 5000IU. Poziom **PDGFRβ** na CAFs E0771 był znacząco większy w grupie 5000IU w porównaniu do kontroli (1000IU) (Rycina 15C).

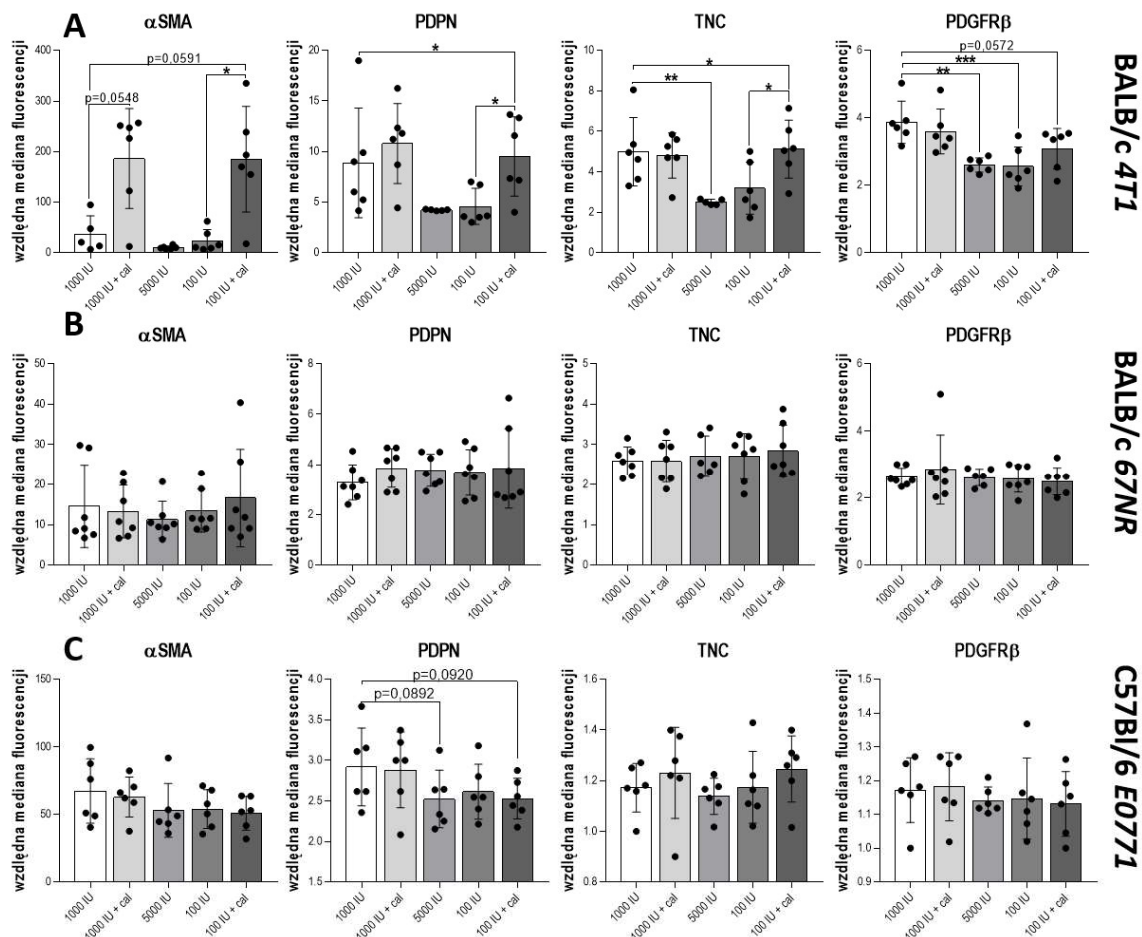


**Rycina 15.** Wpływ karmienia dietą z różną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w CAFs izolowanych z guzów raków gruczołu sutkowego: A – CAFs pochodzące od myszy szczepu BALB/c obarczonej komórkami 4T1, B – od myszy szczepu BALB/c obarczonej komórkami 67NR i C – od myszy szczepu C57BL/6 obarczonej komórkami E0771. Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> CD90.2<sup>+</sup>. αSMA (α-aktyna mięśni gładkich), PDPN (podoplanina), TNC (tenascyna C), PDGFRβ (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β). n=4. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średnich ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 12.1.5. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w NFs płuc myszy obarczonej komórkami mysich raków gruczołu sutkowego

W modelu 4T1 (Rycina 16A) doustne podawanie kalcytriolu myszom z dietą niedoborową przełożyło się na istotny wzrost poziomu αSMA, markera aktywacji fibroblastów, w NFs płuc (100IU+cal vs 100IU). Ponadto poziom αSMA jest większy w NFs płuc od myszy z grupy 1000IU+cal w porównaniu do myszy z dietą kontrolną (1000IU+cal vs 1000IU; p=0,0548). Podawanie kalcytriolu myszom obarczonym 4T1 z grupy 100IU przyczyniło się również do wzrostu poziomu PDPN i TNC w NFs (100IU+cal vs 100IU) (Rycina 16A). Ponadto zaobserwowano zmniejszony poziom TNC w grupie 5000IU (vs 1000IU) (Rycina 16A). Poziom PDGFRβ (w porównaniu z 5000IU, 100IU p<0,05 i 100IU+cal – p=0,0572) był największy w NFs pochodzących z płuc

myszyc obarczonych komórkami 4T1 z grupy kontrolnej (1000IU) (Rycina 16A). Dieta ze zróżnicowaną zawartością witaminy D<sub>3</sub> oraz doustne podawanie kalcytriolu nie wpłynęły istotnie na poziom wybranych białek na NFs płuc w modelach 67NR i E0771 (Rycina 16B i C).



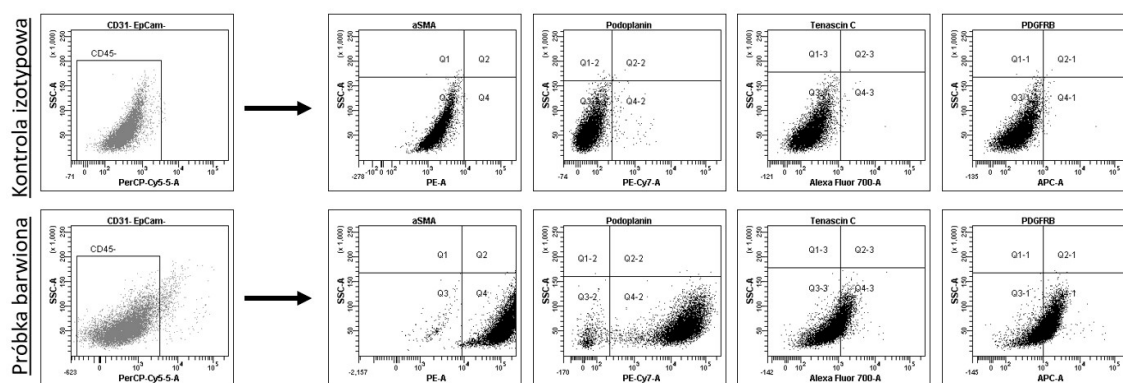
**Rycina 16.** Wpływ karmienia dietą z różną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w NFs izolowanych z płuc myszy obarczonych rakami gruczołu sutkowego. A – porównanie dla NFs pochodzących od myszy obarczonych guzami 4T1, B – obarczonych guzami 67NR i C – obarczonych guzami E0771. Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>.  $\alpha$ SMA ( $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich), PDPN (podoplanina), TNC (tenascyna C), PDGFR $\beta$  (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ ). n=6. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średnich  $\pm$  odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ .

## 12.2. Badania *ex vivo*

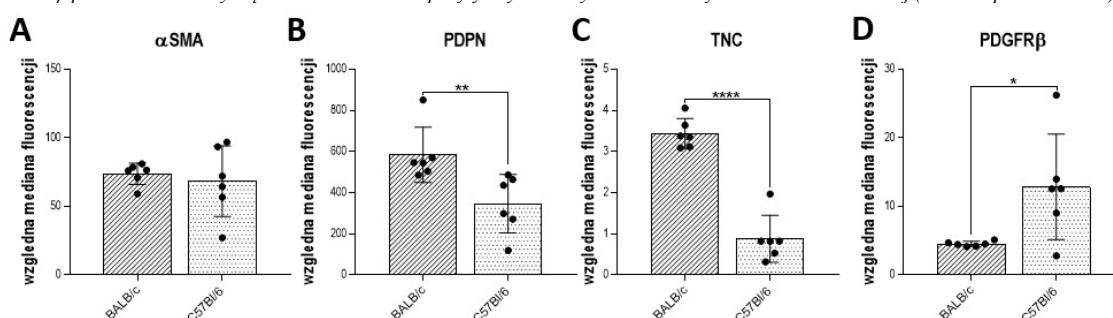
W celu dalszego zbadania wpływu witaminy D<sub>3</sub> na proces aktywacji fibroblastów z płuc myszy zdrowych, poddanych takiemu samemu traktowaniu (dieta i podania kalcytriolu) jak myszy obciążone nowotworami, wyprowadzono hodowle pierwotne NFs płuc. Fibroblasty w ich drugim pasażu zostały poddane stymulacji 10ng/ml TGFβ1 oraz mediami kondycjonowanymi z komórek nowotworowych (linie 4T1 i 67NR dla fibroblastów z myszy BALB/c i E0771 dla fibroblastów z myszy C57BL/6). Po 72 godzinach stymulacji ocenie poddano: (1) poziom wybranych białek typowych dla CAFs (αSMA, PDPN, TNC, PDGFRβ) za pomocą cytometrii przepływowej, (2) poziom VDR i FAP metodą immunofluorescencji oraz (3) ekspresję wybranych mRNA (*Acta2*, *Mmp9*, *Spp1* (wydzielanej fosfoproteiny 1) oraz *Vdr*) za pomocą real-time PCR. TGFβ1 został wybrany do stymulacji, ponieważ stanowi on główny czynnik pobudzający proces włóknienia w tkankach – a właściwie aktywację fibroblastów i innych komórek do miofibroblastów [189,218]. Został on również rozpoznany jako jeden z czynników rekrutujących i aktywujących CAFs w TME [219–221].

### 12.2.1. Porównanie poziomu wybranych białek NFs płuc między szczepami zdrowych myszy C57BL/6 i BALB/c

Populacja NFs do analizy została wyselekcjonowana zgodnie ze schematem bramkowania przedstawionym na rycinie 13. Poziom wybranych białek (αSMA, PDPN, TNC i PDGFRβ) został wyznaczony jako względna mediana fluorescencji dla komórek o fenotypie CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> (Rycina 17). Porównaniu między szczepami poddano NFs pochodzące z płuc z grupy kontrolnej (1000IU) (Rycina 18). Nie zaobserwowano różnic w poziomie αSMA między NFs płuc różnych szczepów myszy (Rycina 18A). W porównaniu do NFs płuc myszy BALB/c, NFs myszy szczepu C57BL/6 charakteryzowały się znacznie niższym poziomem PDPN, TNC (Rycina 18B i C) oraz istotnie większym poziomem PDGFRβ (Rycina 18D).



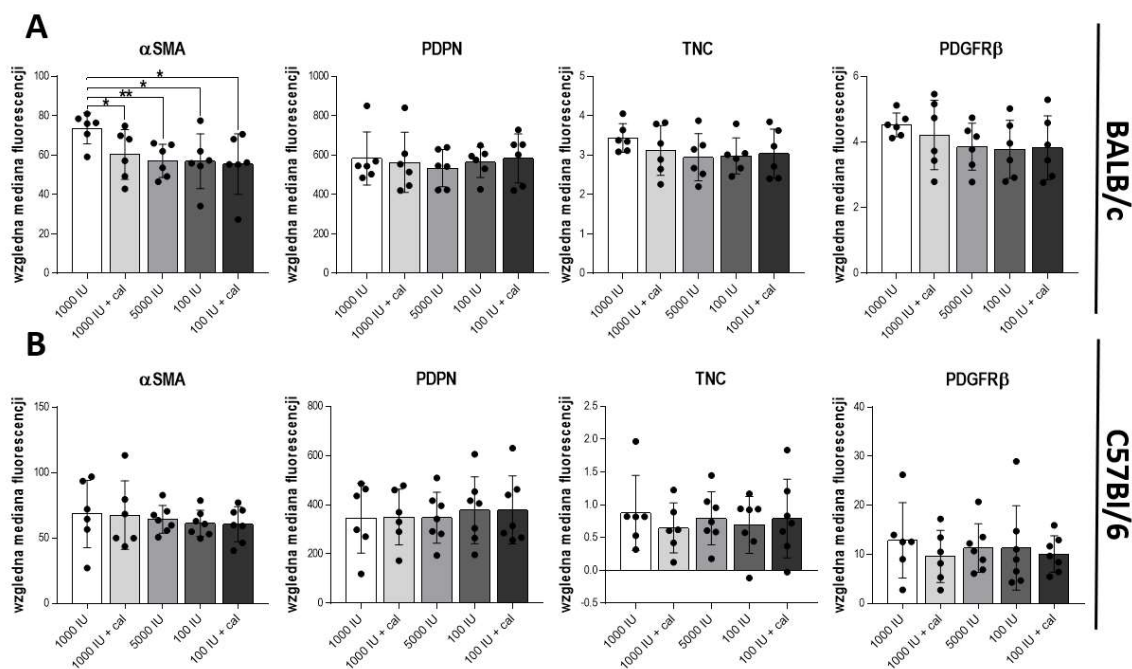
Rycina 17. Przykładowe wykresy obrazujące poziom analizowanych białek na NFs płuc myszy zdrowych. A - Z bramki CD31<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> pobierano dane dotyczące mediany fluorescencji analizowanych markerów. B - z bramek αSMA, PDPN, TNC i PDGFRβ pobrano dane dotyczące odsetka komórek pozytywnych na wybrane markery z bramki rodzicielskiej (CD31<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>).



Rycina 18. Porównanie poziomu wybranych białek między NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c i C57BL/6. A - αSMA (α-aktyna mięśni gładkich), B - PDPN (podoplanina), C - TNC (tenascyna C), D - PDGFRβ (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β). Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>. Porównanie dotyczy myszy z grupy kontrolnej (1000IU), n=6-7. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów: T-studenta i Mann-Whitney. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 12.2.2. Ocena wpływu zróżnicowanego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w NFs płuc zdrowych myszy szczepów C57BL/6 i BALB/c

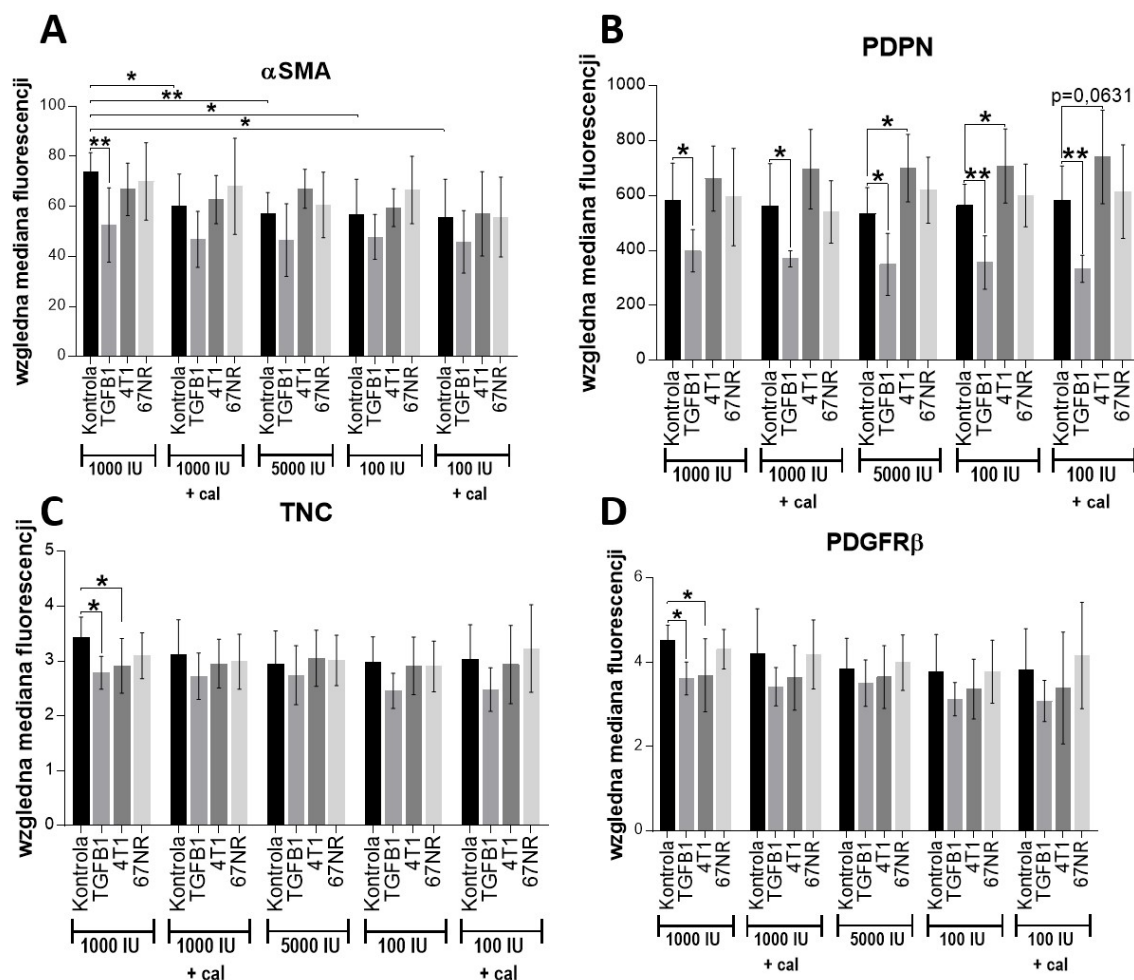
Zróżnicowany poziom witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy i podania kalcytriolu skutkowały obniżeniem poziomu αSMA w NFs myszy szczepu BALB/c (vs 1000IU, Rycina 19A). Nie zaobserwowano zmian w poziomie białek w NFs płuc myszy C57BL/6 (Rycina 19B).



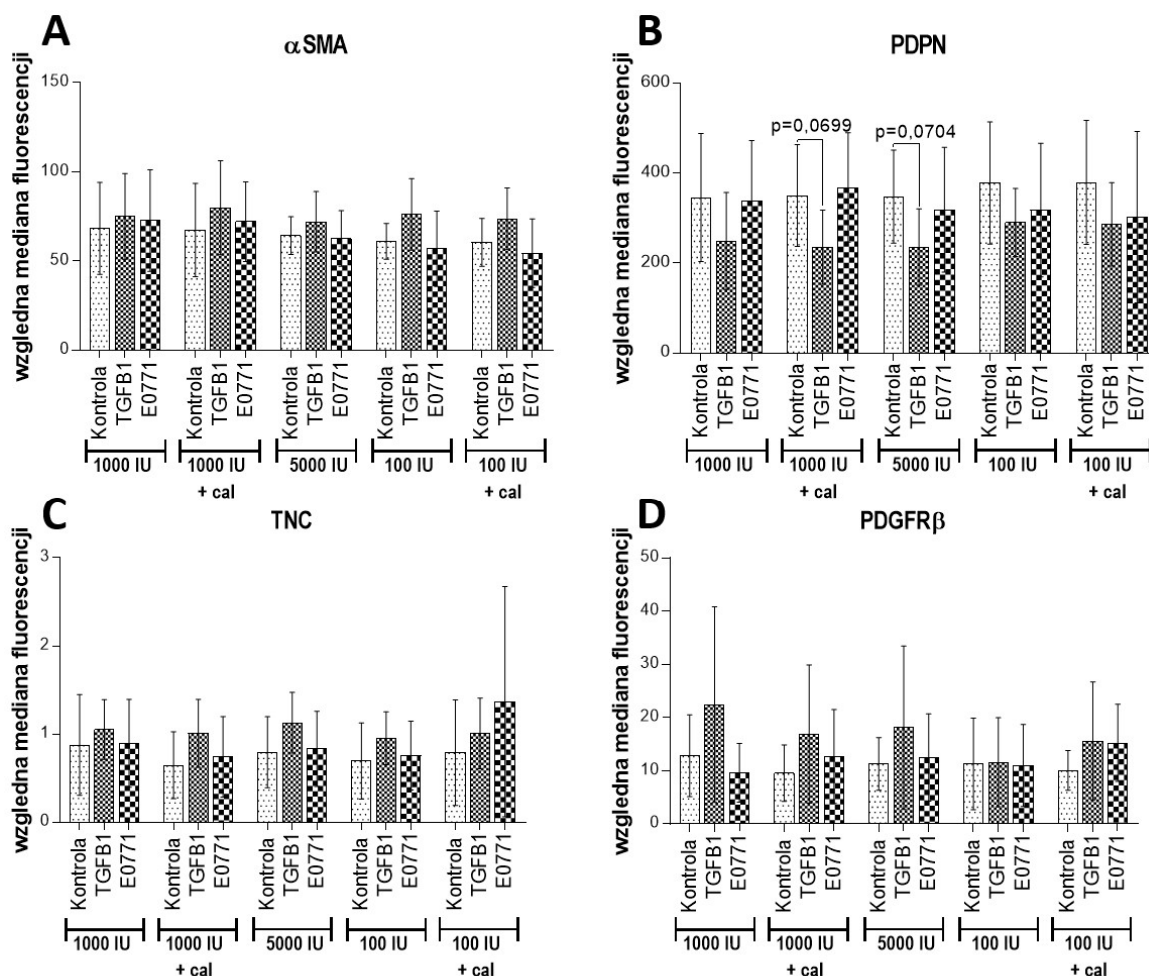
**Rycina 19. Porównanie poziomu wybranych białek między NFs pochodzącymi z płuc myszy zdrowych karmionych dietą z różną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i lub traktowanych kalcytriolem: A – porównanie dla NFs myszy szczepu BALB/c, B – szczepu C57BL/6. Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowana względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>.  $\alpha$ SMA ( $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich), PDPN (podoplanina), TNC (tenascyna C), PDGFR $\beta$  (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ ). n=6-7. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średnich  $\pm$  odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .**

### 12.2.3. Wpływ zróżnicowanego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy i doustnego podawania kalcytriolu na proces aktywacji NFs – ocena poziomu wybranych białek

Stymulacja TGF $\beta$ 1 istotnie zmniejszyła poziom  $\alpha$ SMA w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU (Rycina 20A). Stymulacja TGF $\beta$ 1 prowadziła także do obniżenia poziomu PDPN w NFs pochodzących od myszy ze wszystkich grup (Rycina 20B i Z8B w Załączniku). Natomiast, poziom TNC i PDGFR $\beta$  uległ znaczącemu obniżeniu po stymulacji zarówno TGF $\beta$ 1, jak i medium znad komórek 4T1, efekt ten zaobserwowano wyłącznie na NFs pochodzących od myszy z grupy kontrolnej (1000IU) (Rycina 20C i D). Ponadto w grupach 5000IU, 100IU i 100IU+cal stymulacja medium znad komórek 4T1 istotnie zwiększyła poziom PDPN. W przypadku modelu C57BL/6 zaobserwowano wyłącznie obniżenie poziomu PDPN po stymulacji TGF $\beta$ 1 w grupach 1000IU+cal (p=0,0699) i 5000IU (p=0,0704). Stymulacja komórek nie wpłynęła na poziom pozostałych białek na komórkach (Rycina 21A-D).



**Rycina 20. Porównanie poziomu wybranych białek na aktywowanych NFs plus myszy zdrowych szczepu BALB/c karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem:** A- αSMA (α-aktyna mięśni gładkich), B- PDPN (podoplanina), C - TNC (tenascyna C), D - PDGFRβ (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β). Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>. NFs stymulowano 10ng/ml TGFβ1 lub 50% medium kondycjonowanego z nad komórek linii 4T1 lub 67NR. n=6-7. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.



Rycina 21. Porównanie poziomu wybranych białek na aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu C57BL/6 karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem: A-  $\alpha$ SMA (*a*-aktyna mięśni gładkich), B- PDPN (podoplanina), C - TNC (tenascyna C), D - PDGFR $\beta$  (receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ ). Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>. NFs stymulowano 10ng/ml TGF $\beta$ 1 lub 50% medium kondycjonowanego znad komórek linii E0771. n=6-7. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

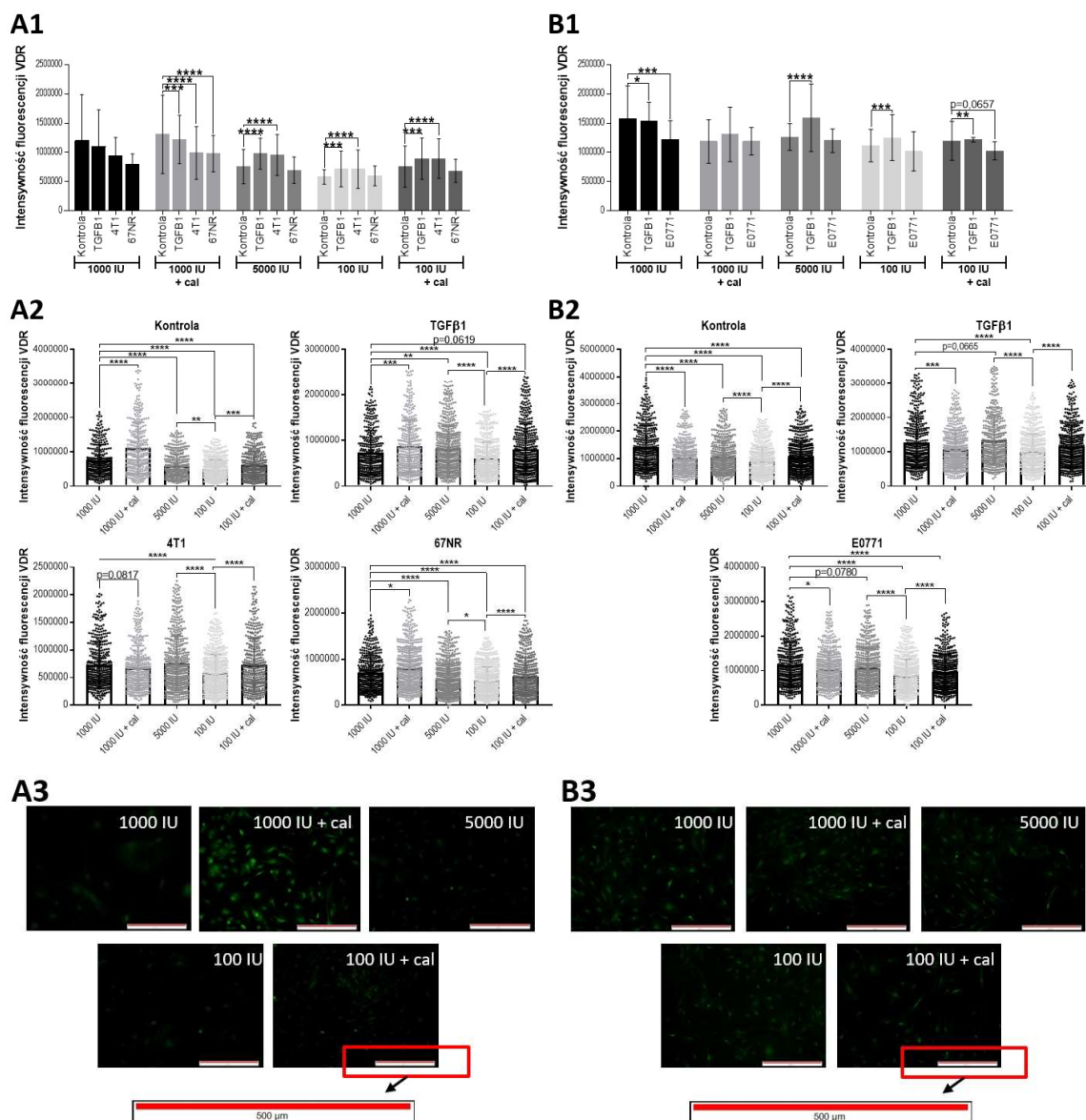
#### 12.2.4. Ocena wpływu zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy oraz doustnego podawania kalcytriolu na poziom VDR i FAP w NFs stymulowanych TGF $\beta$ 1 i mediami znad komórek nowotworowych

Wszystkie barwione NFs posiadały ekspresję VDR i FAP (Rycina 22 i 23). W przypadku komórek pochodzących od myszy szczepu BALB/c, stymulacja NFs za pomocą TGF $\beta$ 1 i CM znad komórek nowotworowych nie wpłynęła istotnie na ekspresję VDR w komórkach pochodzących od myszy z grupy kontrolnej (1000IU) (Rycina 22A1). Wszystkie zastosowane warunki stymulacji NFs (TGF $\beta$ 1 i CM) skutkowały obniżeniem poziomu VDR w grupie 1000IU+cal. W przypadku NFs pochodzących od myszy z grup 5000IU, 100IU i 100IU+cal, TGF $\beta$ 1 i medium znad 4T1 indukowały ekspresję VDR. W NFs pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 z grup 5000IU, 100IU i 100IU+cal



poziom VDR zwiększył się po stymulacji TGF $\beta$ 1 (Rycina 22B1). Zarówno stymulacja NFs za pomocą TGF $\beta$ 1, jak i CM znad E0771 prowadziły do obniżenia poziomu VDR w NFs pochodzących od myszy C57BL/6 z grupy 1000IU (Rycina 22B1).

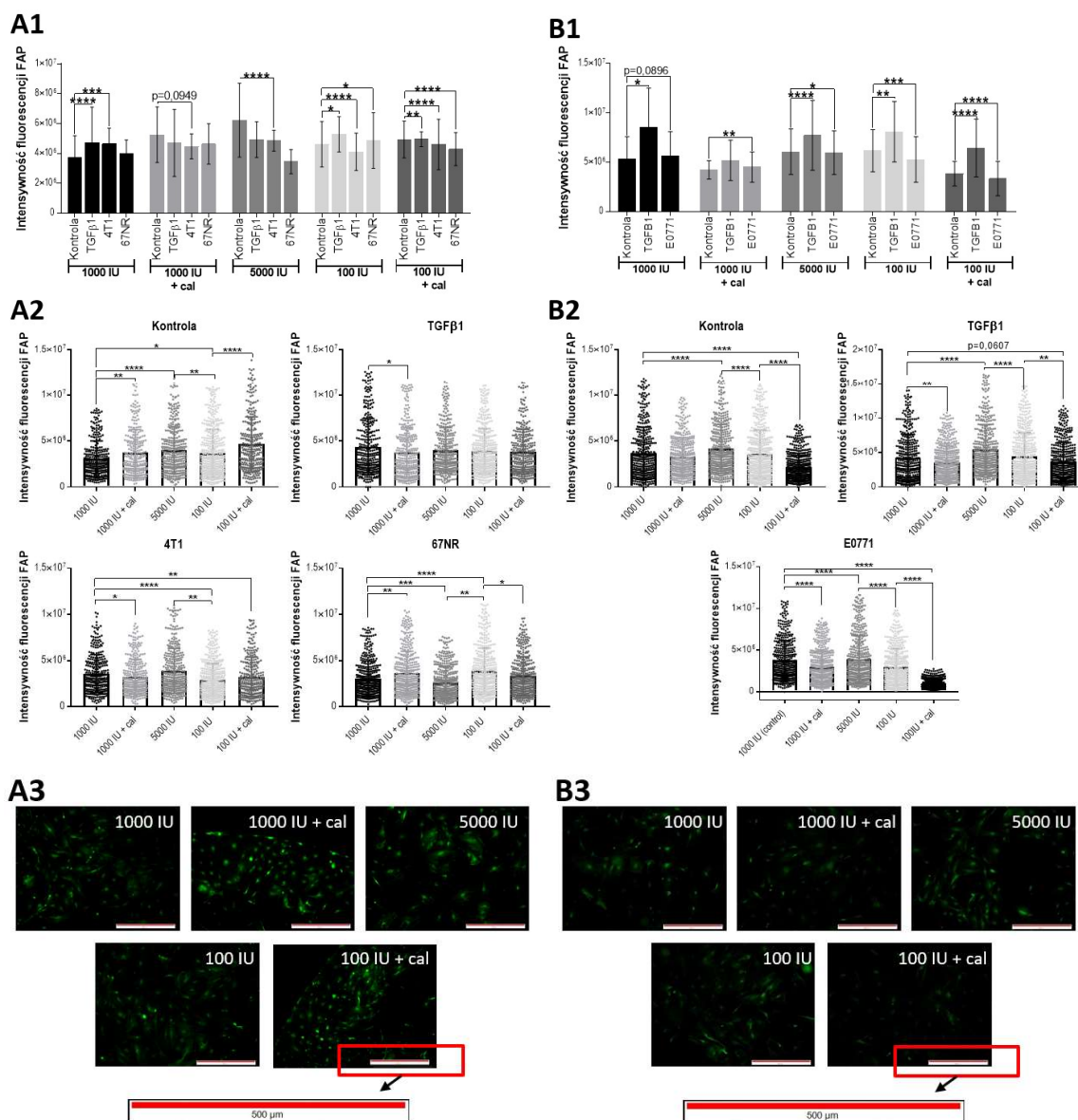
W modelu BALB/c zaobserwowano, że podania kalcytriolu myszom z grup 1000IU przekładały się na wzrost ekspresji VDR w NFs niestymulowanych i poddanych stymulacji za pomocą TGF $\beta$ 1 oraz CM znad 67NR. Gdy NFs stymulowano CM znad 4T1, poziom VDR był mniejszy w NFs z grupy 1000IU+cal niż w 1000IU ( $p=0,0817$ , Rycina 22A2). Ponadto dla NFs od myszy BALB/c, niezależnie od nich stymulacji, zaobserwowano większy poziom VDR w NFs myszy z grup 100IU+cal w porównaniu do NFs myszy z grupy 100IU. Dla NFs niestymulowanych i poddanych stymulacji CM znad 67NR poziom VDR obniżył się w grupach 5000IU, 100IU oraz 100IU+cal w porównaniu do NFs z grupy 1000IU (Rycina 22A2). Zaś po stymulacji TGF $\beta$ 1 i CM znad 4T1 poziom VDR był istotnie niższy wyłącznie dla NFs od myszy z grupy 100IU (Rycina 22A2). W przypadku zarówno myszy BALB/c, jak i C57BL/6 poziom VDR w NFs od myszy z grupy 100IU był niższy niż w NFs od myszy z grupy 5000IU niezależnie od stymulacji NFs. W modelu C57BL/6 (Rycina 22B2), podobnie jak w BALB/c, zaobserwowano, że podawanie kalcytriolu myszom z grupy deficytowej przekłada się na wzrost poziomu VDR (100IU+cal vs 100IU), aczkolwiek - przeciwnie do modelu BALB/c - w przypadku myszy z grupy ze standardową paszą podania kalcytriolu prowadzi do spadku poziomu VDR w NFs (1000IU+cal vs 1000IU) (Rycina 22B2). Tendencje te zostały zachowane przy każdym zastosowanym sposobie stymulacji NFs. Podobnie jak w modelu BALB/c - niezależnie od stymulacji - niższy poziom VDR zaobserwowano w NFs pochodzących od myszy z grupy 100IU w porównaniu do NFs od myszy z grupy kontrolnej (1000IU, Rycina 22B2).



**Rycina 22. Porównanie poziomu receptora witaminy D<sub>3</sub> (VDR) metodą immunofluorescencji w aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c (A) i C57BL/6 (B) karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem. A1 – porównanie poziomu VDR w zależności od stymulacji (TGFβ1, medium znad 4T1 i 67NR), A2 – porównanie poziomu VDR w NFs płuc pomiędzy poszczególnymi grupami myszy. B1 – porównanie poziomu VDR w zależności od stymulacji (TGFβ1, medium znad E0771), B2 – porównanie poziomu VDR w NFs płuc pomiędzy poszczególnymi grupami myszy. A3, B3 – przykłady zdjęć wykonanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) i oprogramowaniu CellSense (Olympus, Warszawa, Polska). NFs stymulowano 10ng/ml TGFβ1 lub 50% medium kondycjonowanego znad komórek linii 4T1 lub 67NR. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001**

W komórkach pochodzących od myszy obu szczepów (BALB/c i C57BL/6) stymulacja komórek TGFβ1 zwiększyła poziom FAP w fibroblastach pochodzących z grup 1000IU, 100IU i 100IU+cal (Rycina 23A1 i 23B1). W modelu C57BL/6 taki kierunek zmian został również zaobserwowany w NFs grupy 5000IU (Rycina 23B1). Ponadto na poziom FAP w NFs pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 wpływ miało również CM znad E0771. W NFs pochodzących od myszy z grup 1000IU i 1000IU+cal zaobserwowano wzrost poziomu FAP, zaś w NFs pochodzących od myszy z grup 5000IU, 100IU oraz 100IU+cal

- obniżenie poziomu FAP (Rycina 23B1). Analogicznie CM znad komórek nowotworowych wpłynęły na poziom FAP w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c (Rycina 23A1) – CM znad 4T1 zwiększyło poziom FAP w NFs od myszy z grupy 1000IU, zmniejszyło w NFs od myszy z grupy 5000IU i 100IU. Stymulacje za pomocą CM znad 4T1 i 67NR zmniejszyły poziom FAP w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU + cal (Rycina 23A1). CM znad 67NR zwiększyło poziom FAP w NFs od myszy z grupy 100IU (Rycina 23A1). W przypadku NFs niestymulowanych pochodzących od myszy szczepu BALB/c (Rycina 23A2) większą ekspresję **FAP** obserwowano w NFs od myszy z grup, gdzie myszom podawano kalcytriol w porównaniu do myszy nieotrzymujących kalcytriolu (1000IU+cal vs 1000IU oraz 100IU+cal vs 100IU, Rycina 23A2). Ponadto poziom FAP był najniższy w niestymulowanych NFs pochodzących od myszy BALB/c z grupy 1000IU. W NFs stymulowanych CM znad 67NR również zanotowano wyższy poziom FAP w NFs od myszy z grupy 1000IU+cal w porównaniu do NFs od myszy z grupy 1000IU, aczkolwiek poziom FAP w NFs od myszy z grupy 100IU+cal był mniejszy niż w NFs od myszy z grupy 100IU (Rycina 23A2). W NFs stymulowanych TGFβ1 i CM znad 4T1 od myszy z grupy 1000IU+cal obserwowano mniejszy poziom FAP niż w NFs od myszy z grupy 1000IU. NFs stymulowane CM znad 4T1 pochodzące od myszy szczepu BALB/c z grup 100IU i 100IU+cal miały również wyższy poziom FAP niż NFs od myszy otrzymujących standardową dietę (1000IU, Rycina 23A2). Poziom FAP w NFs myszy z grupy 100IU był znacznie niższy niż w NFs od myszy z grupy 5000IU w przypadku NFs niestymulowanych i stymulowanych CM znad 4T1. Gdy komórki stymulowano CM znad 67NR, poziom FAP był znacznie wyższy w NFs od myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU w porównaniu do 5000IU (Rycina 23A2). W modelu C57BL/6 (Rycina 23B2) NFs niestymulowane pochodzące od myszy z grupy 5000IU wykazywały największy poziom FAP (vs 1000IU), zaś NFs myszy z grupy 100IU+cal najniższy poziom tego białka (vs 1000IU oraz 100IU) (Rycina 23B2). Tendencje te zostały zachowane po stymulacji NFs za pomocą TGFβ1 i CM znad E0771 (Rycina 23B2). Ponadto po stymulacji TGFβ1 i medium znad E0771 zaobserwowano mniejszy poziom FAP w NFs od myszy szczepu C57BL/6, które otrzymywały podania kalcytriolu w porównaniu do NFs pochodzących od myszy z grupy kontrolnej (1000IU+cal vs 1000IU, Rycina 23B2). Niezależnie od stymulacji poziom FAP w NFs od myszy C57BL/6 z grupy 100IU był niższy niż w NFs od myszy z grupy 5000IU (Rycina 23B2).

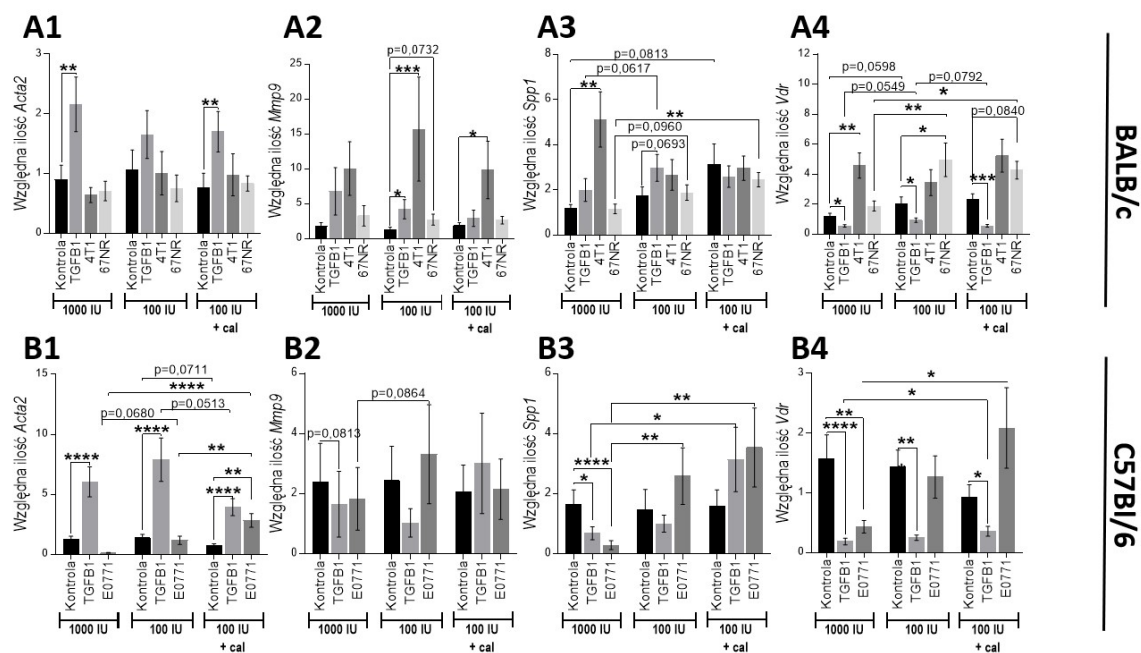


**Rycina 23.** Porównanie poziomu białka aktywacji fibroblastów (FAP) metodą immunofluorescencji w aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c (A) i C57BL/6 (B) karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem. A1 – porównanie poziomu VDR w zależności od stymulacji (TGFβ1, medium znad 4T1 i 67NR), A2 – porównanie poziomu FAP w NFs płuc pomiędzy poszczególnymi grupami myszy. B1 – porównanie poziomu FAP w zależności od stymulacji (TGFβ1, medium znad E0771), B2 – porównanie poziomu FAP w NFs płuc pomiędzy poszczególnymi grupami myszy. A3, B3 – przykłady zdjęć wykonanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) i oprogramowaniu CellSense (Olympus, Warszawa, Polska). NFs stymulowano 10ng/ml TGFβ1 lub 50% medium kondycjonowanego znad komórek linii 4T1 lub 67NR. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 12.2.5. Ocena wpływu zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy oraz doustnego podawania kalcytriolu na ekspresję wybranych mRNA w NFs stymulowanych TGFβ1 i mediami znad komórek nowotworowych

Do dalszych analiz – oceny ekspresji mRNA *Acta2* (α-aktyny 2), *Mmp9* (metaloproteinazy 9), *Spp1* (wydzielanej fosfoproteiny 1), *Vdr* (receptora witaminy D<sub>3</sub>) – wybrane zostały fibroblasty z grup 1000IU oraz 100IU i 100IU+cal. Stymulacja

fibroblastów TGFβ1 skutkowało wzrostem ekspresji mRNA *Acta2* (kodującego αSMA) w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grup: 1000IU i 100IU+cal (Rycina 24A1) oraz NFs od myszy szczepu C57BL/6 z grup: 1000IU, 100IU i 100IU+cal (Rycina 24B1). Stymulowanie NFs z grupy 100IU+cal przy pomocy CM znad komórek E0771 również zwiększyło ekspresję *Acta2* (Rycina 24B1). Stymulacja NFs TGFβ1 skutkowało zwiększeniem ekspresji *Mmp9* w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU (Rycina 24A2). CM znad komórek 4T1 wzmocniło ekspresję *Mmp9* w NFs od myszy z grupy 100IU oraz 100IU+cal (Rycina 24A2). Stymulacja NFs medium znad 4T1 prowadziła do wzrostu ekspresji *Spp1* (kodującego OPN) w NFs od myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU (Rycina 24A3). W przypadku NFs od myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU stymulacja komórek TGFβ1 i CM znad E0771 zmniejszyła ekspresję *Spp1* (Rycina 22B3). Ponadto NFs stymulowane przy pomocy CM znad komórek 67NR pochodzące od myszy z szczepu BALB/c z grupy 100IU+cal miały znacznie większą ekspresję *Spp1* niż NFs od myszy z grupy 1000IU (Rycina 22A3). Zaś NFs pochodzące od myszy szczepu C57BL/6 z grupy 100IU i 100IU+cal stymulowane CM znad komórek E0771 miały znacznie wyższą ekspresję *Spp1* niż NFs pochodzące od myszy z grupy 1000IU (Rycina 24B3). NFs stymulowane TGFβ1 od myszy z grupy 100IU+cal miały wyższą ekspresję niż NFs od myszy z grupy 1000IU (Rycina 24B3). Stymulacja NFs pochodzących od myszy obu szczepów z grup 1000IU, 100IU i 100IU+cal za pomocą TGFβ1 skutkowało obniżeniem ekspresji *Vdr*. CM znad komórek 4T1 zwiększyło ekspresję *Vdr* w NFs od myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU, zaś CM znad komórek 67NR w NFs od myszy tego samego szczepu z grupy 100IU (Rycina 24A4). CM znad komórek E0771 obniżyło ekspresję *Vdr* w NFs pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU (Rycina 24B4). Ekspresja *Vdr* była znacznie większa w NFs stymulowanych CM znad komórek 67NR od myszy z grup 100IU oraz 100IU+cal w porównaniu do NFs stymulowanych CM znad 67NR od myszy z grupy 1000IU (Rycina 24A4). W NFs myszy szczepu C57BL/6 stymulowanych CM znad komórek E0771 z grupy 100IU+cal zaobserwowano większą ekspresję *Vdr* w porównaniu do NFs (również stymulowanych CM znad komórek E0771) od myszy z grupy 1000IU (Rycina 24B4).



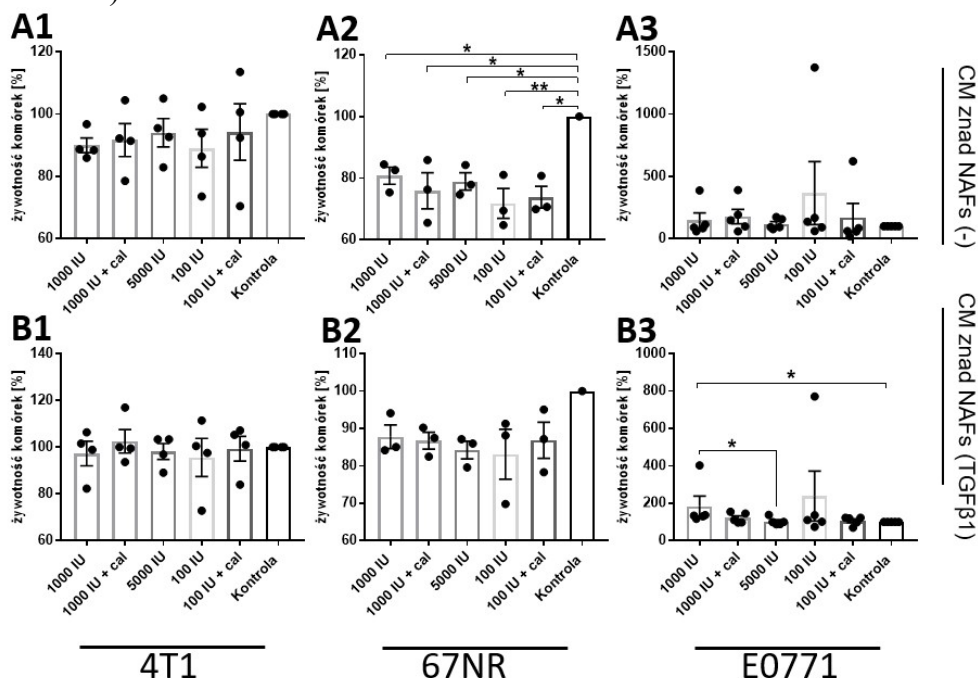
**Rycina 24. Porównanie ekspresji mRNA wybranych genów w aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem: 1 - Acta2 ( $\alpha$ -aktyna 2), 2 - Mmp9 (metaloproteinaza 9), 3 - Spp1 (wydzielana fosfoproteina 1), 4 - Vdr (receptor witaminy D). A – NFs pochodzące od myszy szczepu BALB/c, B - szczepu C57BL/6. Fibroblasty stymulowano 10ng/ml TGF $\beta$ 1 lub 50% medium kondycjonowanego znad komórek linii 4T1 i 67NR (BALB/c) lub E0771 (C57BL/6). Ekspresja mRNA badanych genów została przedstawiona jako względna ilość mRNA – wyniki analizowano metodą porównawczą  $\Delta\Delta Ct$  i normalizowano względem kilku kalibratorów - kontroli z każdego powtórzenia. n=4. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .**

### 12.3. Badania *in vitro*

W celu zbadania wpływu NFs na komórki nowotworowe, CM znad NFs pochodzących z płuc myszy zdrowych niestymulowanych i stymulowanych TGFβ1, wykorzystano do przeprowadzenia testów proliferacji i testów klonogennych na komórkach nowotworowych: 4T1, 67NR i E0771.

#### 12.3.1. Ocena wpływu NFs stymulowanych TGFβ1 na proliferację komórek nowotworowych

CM znad NFs, zarówno niestymulowanych jak i stymulowanych TGFβ1, pochodzących od myszy szczepu BALB/c nie wpłynęło na proliferację komórek 4T1 (Rycina 25A1 i B1). Inkubacja komórek linii 67NR z CM znad NFs niestymulowanych TGFβ1, niezależnie od grupy myszy, istotnie obniżyło żywotność komórek 67NR (Rycina 25A2), aczkolwiek efekt ten został wyciszony gdy zastosowano CM znad NFs stymulowanych TGFβ1 (Rycina 25B2). CM znad NFs stymulowanych TGFβ1 pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU zwiększyło proliferację komórek E0771 (w porównaniu do kontroli nietraktowanej). Ponadto CM znad NFs z grupy 5000IU istotnie zmniejszyło proliferację komórek w porównaniu do CM znad 1000IU (Rycina 25B3).

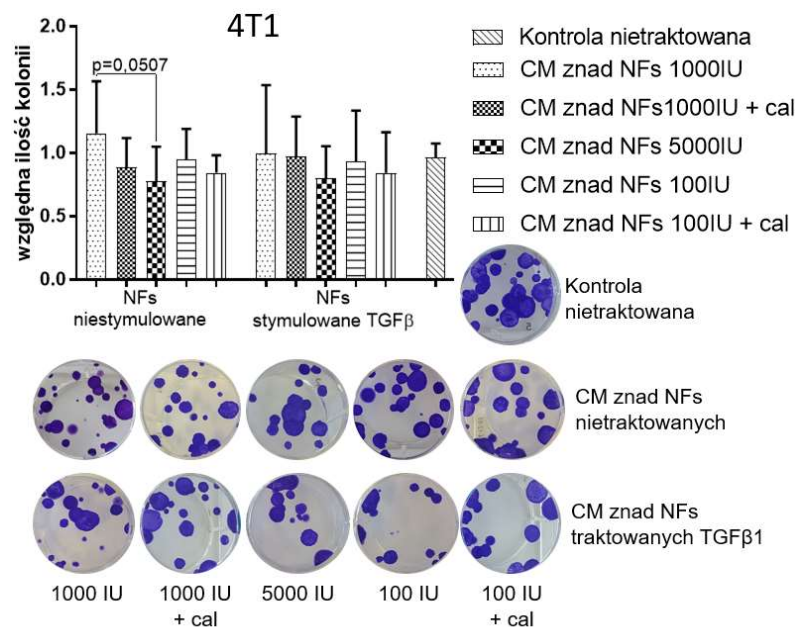


Rycina 25. Porównanie żywotności komórek linii 4T1, 67NR i E0771 stymulowanych medium kondycjonowanym (CM) znad NFs płuc myszy zdrowych karmionych dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem. A – ocena żywotności komórek inkubowanych z CM znad fibroblastów niestymulowanych. B – komórek inkubowanych z CM znad fibroblastów stymulowanych 10ng/ml TGFβ1. 1 – linii 4T1, 2 – 67NR oraz 3 – E0771. Dla komórek linii 4T1 i 67NR nałożono CM pochodzące od fibroblastów myszy szczepu BALB/c, dla E0771 szczepu C57Bl/6. n=3-4. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.



### 12.3.2. Ocena wpływu NFs stymulowanych TGFβ1 na tworzenie kolonii przez komórki nowotworowe

Medium znad NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grupy 5000IU i stymulowanych *ex vivo* TGFβ1 nieznacznie ( $p=0,0507$ ) obniżyło zdolność komórek linii 4T1 do tworzenia kolonii (w porównaniu do CM znad NFs od myszy z grupy 1000IU, Rycina 26). CM znad NFs pochodzących od myszy z pozostałych grup nie wykazały żadnego wpływu. W przypadku komórek linii 67NR (Rycina 27) zaobserwowano znaczne obniżenie tworzenia kolonii, gdy komórki stymulowano CM znad NFs z grupy 100IU+cal stymulowanych TGFβ1 zarówno w porównaniu do kontroli niestymulowanej, jak i do CM znad NFs z grupy 1000IU+cal (Rycina 27). W przypadku komórek linii E0771 (Rycina 28) CM zebrane znad NFs niestymulowanych TGFβ1 pochodzących od myszy z prawie każdej grupy (poza 100IU) istotnie obniżyły zdolność komórek do tworzenia kolonii. Taki sam efekt zaobserwowano również dla medium znad NFs od myszy z grupy 100IU ale dopiero po stymulacji TGFβ1 (Rycina 28). Ponadto CM znad NFs stymulowanych TGFβ1 pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 z deficytem witaminy D<sub>3</sub> traktowanych kalcytriolem zwiększyło zdolność E0771 do tworzenia kolonii w porównaniu do CM znad NFs niestymulowanych ( $p=0,0593$ , Rycina 28).



**Rycina 26.** Porównanie zdolności komórek 4T1 do tworzenia kolonii po stymulacji medium kondycjonowanym (CM) znad aktywowanych TGFβ1 NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c karmionych dietą o różnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych kalcytriolem doustnie. Fibroblasty stymulowano 10ng/ml TGFβ1. Komórki nowotworowe inkubowano przez 72h z 50% CM znad fibroblastów. Tak przygotowane komórki nowotworowe wysiano w ilości 50 komórek na dołek płytki 6-dółkowej. Po 10 dniach wykonano barwienie. Liczbę kolonii liczono ręcznie. Normalizowano względem początkowej liczby komórek oraz kontroli nietraktowanej.  $n=3$ . Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testów dla wielokrotnych porównań: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .





### 13. Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na ludzkie CAFs – pochodzące z guzów pacjentek

Zgodę na udział w badaniu wyraziło 127 pacjentek hospitalizowanych w Centrum Chorób Piersi Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii (DCOPiH). Od 102 pacjentek została pobrana tkanka guza celem izolacji komórek. Spośród tej grupy z otrzymanego materiału udało się wyizolować 91 razy CAFs. Za pomocą cytometrii przepływowej scharakteryzowano fibroblasty pochodzące od 71 pacjentek, ponieważ z materiału od pozostałych chorych nie udało się pozyskać wystarczającej liczby komórek. Z uzyskanego materiału udało się wyprowadzić 59 hodowli pierwotnych CAFs, które posłużyły dalszym analizom – charakterystyce wpływu kalcytriolu na ich fenotyp, ekspresję mRNA i białek, aktywność żelatynaz oraz sekrecję wybranych czynników. Liczbę hodowli CAFs wykorzystanych w poszczególnych analizach oraz charakterystykę kliniczną pacjentek, z których guzów pochodziły te hodowle prezentuje tabela 16.

**Tabela 16. Charakterystyka kliniczna pacjentek włączonych do poszczególnych eksperymentów.**

		Podział pacjentek pod względem wybranych parametrów klinicznych					
		Status menopauzalny		Poziom witaminy D <sub>3</sub>		Obecność przerzutów	
		Przed menopauzą	Po menopauzie	Deficyt	Norma	Brak	Obecne
<b>Wszystkie pacjentki</b>	n=127	n=38	n=89	n=89	n=38	n=96	n=31
Wiek	60,6±12,4	47,5±8,6	66,3±9,1*	61,8±12,5	57,8±11,9	60,4±12,9	61,5±11,01
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	25,6±12,4	27,6±9,6	24,7±13,4 <sup>a</sup>	19,0±6,3	41,0±9,1 <sup>#</sup>	25,6±12,7	25,6±11,9
Poziom FSH [mIU/ml]	52,8±35,0	14±16,4	69,5±26,6*	53,7±32,6	50,8±40,5	53,3±37,1	51,1±27,8
<b>Analiza ekspresji białek w tkance guza</b>	n=80	n=28	n=52	n=57	n=23	n=53	n=27
Wiek	60,2±13,0	46,5±6,6	67,6±8,8*	60,4±13,2	59,7±12,7	59,6±13,8	61,3±11,4
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	24,4±11,4	26,5±9,4	23,3±12,2	18,5±6,1	39,0±7,3 <sup>#</sup>	24,2±11,0	24,7±12,3
Poziom FSH [mIU/ml]	46,0±33,2	12,6±12,3	64,4±25,8*	47,1±31,3	43,5±38,1	45,9±36,2	46,3±26,7
<b>Ocena fenotypu CAFs</b>	n=71	n=28	n=43	n=51	n=20	n=52	n=19
Wiek	58,9±13,4	45,4±7,4	67,7±7,9*	60,4±13,5	55,1±12,7	58,1±14,0	61,1±11,5
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	25,5±12,9	27,8±9,9	24,1±14,5 <sup>b</sup>	18,9±6,2	42,4±9,8 <sup>#</sup>	27,1±13,9	21,0±8,4
Poziom FSH [mIU/ml]	48,9±36,5	12,6±12,3	73,0±25,3*	47,3±31,0	52,8±48,2	50,2±39,7	45,0±25,5
<b>Ocena żywotności CAFs w obecności kalcytriolu</b>	n=36	n=15	n=21	n=24	n=12	n=23	n=13
Wiek	58,2±12,6	46,6±7,0	66,5±8,3*	60,4±12,4	53,8±12,1	59,5±14,2	55,9±8,9
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	26,4±11,4	28,4±11,6	25±11,3	19,6±5,8	40,2±5,6 <sup>#</sup>	27,2±12,7	25,1±8,9
Poziom FSH [mIU/ml]	47,6±32,8	15,1±14,1	71,9±18,2*	52,4±31,0	38,3±35,7	47,2±34,7	48,4±30,5
<b>Ocena fenotypu w CAFs stymulowanych kalcytriolem</b>	n=51	n=18	n=33	n=34	n=17	n=35	n=16
Wiek	59,9±13,6	45,2±7,4	67,9±8,5*	61,4±14,1	56,9±12,5	60,6±15,0	59,5±10,4
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	27,1±13,2	27,8±10,7	26,7±14,5	19,5±6,5	42,3±9,3 <sup>#</sup>	49,3±34,5	51,2±27,6
Poziom FSH [mIU/ml]	49,9±32,3	13,7±13,3	70,3±19,0*	49,2±30,1	51,3±37,1	28,1±14,8	24,9±8,7

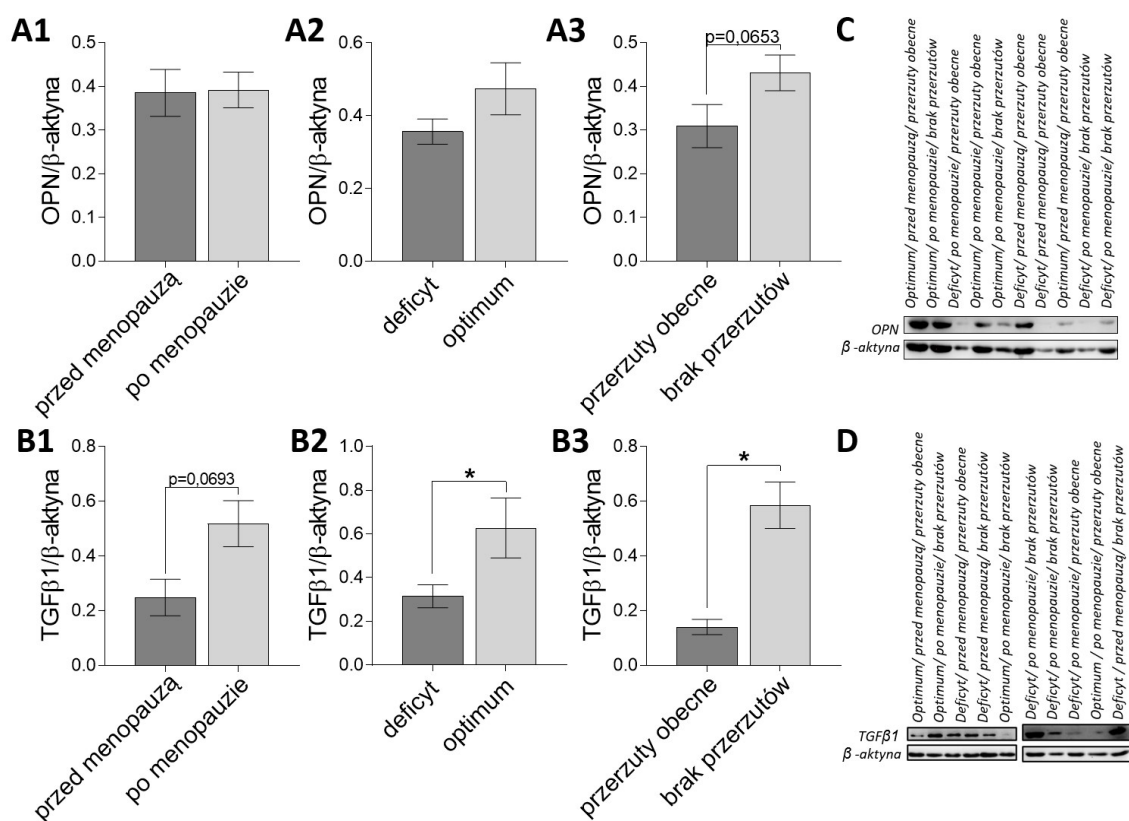
Ciąg dalszy tabeli 16. Charakterystyka kliniczna pacjentek włączonych do poszczególnych eksperymentów.

	Liczba (n) pacjentek w grupie	Status menopauzalny		Poziom witaminy D <sub>3</sub>		Obecność przerzutów	
		Przed menopauzą	Po menopauzie	Deficyt	Norma	Brak	Obecne
<b>Ocena ekspresji VDR i FAP w CAFs stymulowanych kalcytriolem</b>	n=51	n=19	n=32	n=34	n=17	n=34	n=17
Wiek	59,5±13,6	45,5±7,3	67,8±8,7*	60,8±14,1	56,9±12,5 <sup>c</sup>	59,4±14,8	59,5±11,1
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	27,1±13,2	27,6±10,4	26,8±14,8	19,4±6,5	42,3±9,3 <sup>#</sup>	28,1±14,9	24,9±8,8
Poziom FSH [mIU/ml]	48,4±32,6	13,3±13,0	70,0±19,2*	47,0±30,5	51,3±37,1	49,9±34,6	45,4±28,6
<b>Ocena ekspresji wybranych mRNA w CAFs stymulowanych kalcytriolem</b>	n=44	n=15	n=29	n=29	n=15	n=29	n=15
Wiek	59,8±12,6	46,3±6,9	66,8±8,5*	62,4±12,4	54,8±11,7 <sup>c</sup>	60,4±13,8	58,7±10,2
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	27,6±13,6	29,3±11,0	26,7±14,9	19,3±5,9	43,6±9,1 <sup>#</sup>	29,3±15,5	24,2±8,7
Poziom FSH [mIU/ml]	52,9±31,9	15,4±13,9	73,0±16,8*	53,5±28,3	51,7±38,7	54,4±33,9	49,8±28,1
<b>Ocena ekspresji wybranych białek w CAFs stymulowanych kalcytriolem</b>	n=35	n=12	n=23	n=21	n=14	n=21	n=14
Wiek	59,7±13,1	45,4±7,3	67,2±8,4*	62,4±12,9	55,7±12,9	59,4±14,3	60,3±11,1
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	28,4±12,7	29,3±12,3	27,9±13,2	19,5±6,1	41,9±6,5 <sup>#</sup>	30,0±14,2	25,5±9,3
Poziom FSH [mIU/ml]	53,4±32,9	14,2±15,5	74,8±14,9*	53,8±29,2	52,8±38,8	53,8±34,6	52,6±26,7
<b>Ocena poziomu produkowanych białek przez CAFs stymulowane kalcytriolem</b>	n=51	n=18	n=33	n=34	n=17	n=35	n=16
Wiek	59,9±13,6	45,2±7,4	67,9±8,5*	61,4±14,1	59,6±12,5	60,1±15,0	59,5±10,4
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	27,1±13,2	27,8±10,7	26,7±14,5	19,5±6,5	42,3±9,3 <sup>#</sup>	28,1±14,8	24,9±8,7
Poziom FSH [mIU/ml]	49,9±32,3	13,7±13,3	70,3±19,0*	49,2±30,1	51,3±37,1	49,3±34,5	51,2±28,6
<b>Ocena aktywności żelatynaz w lizatach CAFs stymulowanych kalcytriolem</b>	n=16	n=10	n=6	n=9	n=7	n=10	n=6
Wiek	54,8±12,7	46,6±6,9	68,3±6,6*	58,11±9,6	50,4±15,6	50,7±13,6	61,5±8,1
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	29,3±12,2	31,3±12,8	26,0±11,5	20,0±6,9	41,2±3,8 <sup>#</sup>	31,1±13,1	26,3±11,2
Poziom FSH [mIU/ml]	34,2±32,4	14,9±15,6	72,7±18,4*	41,3±27,2	26,0±38,0	28,8±34,7	42,2±29,7
<b>Ocena wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na migrację oraz ekspresję wybranych białek w MCF-7 i MDA-MB-231</b>	n=16	n=7	n=9	n=10	n=6	n=9	n=7
Wiek	60,7±11,7	49,1±5,0	69,7±5,6*	59,5±10,1	62,7±14,9	59,9±14,0	63,0±8,4
Poziom 25(OH)D <sub>3</sub> [ng/ml]	26,9±10,4	26,4±12,3	27,2±9,5	20,4±6,6	37,6±5,1 <sup>#</sup>	26,6±11,0	27,3±10,5
Poziom FSH [mIU/ml]	45,4±32,2	19,1±17,1	68,4±22,9*	46,5±29,9	43,8±38,4	40,5±36,6	52,7±25,7

Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, FSH < 25,8 mIU/ml do „przed menopauzą”; w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml - „deficyt”, ≥ 30ng/ml - „norma”; w oparciu o występowanie przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): występowanie przynajmniej jednego – „obecność przerzutów”. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów: t-Studenta i Mann-Whitney: \* - p < 0,05, <sup>a</sup> - p < 0,06, <sup>b</sup> - p < 0,07 dla przed menopauzą vs po menopauzie, <sup>#</sup> - p < 0,05 i <sup>c</sup> - p < 0,06 dla „norma” – prawidłowy poziom witaminy D<sub>3</sub> vs deficyt witaminy D<sub>3</sub>.

### 13.1. Porównanie poziomu wybranych białek w tkankach guzów pochodzących od pacjentek z różnych grup klinicznych

W celu oceny poziomu OPN i TGFβ1 w całych guzach udało się zebrać fragmenty tkanki od 80 pacjentek. Ekspresja OPN i TGFβ1 (Rycina 27) została porównana między pacjentkami różniącymi się obecnością przerzutów, poziomem 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu i statusem menopauzalnym. Nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie OPN i TGFβ1 między pacjentkami przed i po menopauzie (Rycina 27A1 i B1). Poziom TGFβ1 był wyższy u pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> w osoczu (Rycina 27B2). Wśród pacjentek, u których nie wykazano żadnych przerzutów, zaobserwowano wyższy poziom OPN (p=0,0653) i TGFβ1 w porównaniu do chorych z przerzutami (Rycina 27A3 i B3).



**Rycina 29.** Porównanie poziomu OPN i TGFβ1 w guzach pacjentek o różnym statusie menopauzalnym, poziomie 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu, obecności przerzutów. A – OPN (osteopontyna), B – TGFβ1 (transformujący czynnik wzrostu β 1). Przykładowe zdjęcia prążków: C – OPN, D – TGFβ1. Analizowano prążki na następującej wysokości: OPN: 40kDa, TGFβ1: 35 kDa. Pacjentki zostały podzielone na grupy w oparciu o: (1) stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie” (n=27), ≤ 25,8 mIU/ml – „przed menopauzą” (n=53), (2) stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt” (n=57), ≥ 30ng/ml do grupy „optimum” (n=22) lub (3) występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” (n=27), „brak przerzutów” (n=53). Wyniki normalizowano względem poziomu β-aktyny. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów: T-studenta i Mann-Whitney. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 13.2. Ocena czystości izolacji CAFs

Z otrzymanych z DCOPiH fragmentów tkanki guza, udało się wyizolować fibroblasty od 91 pacjentek. Spośród nich, komórki świeżo wyseparowane od 71 pacjentek poddano analizie ekspresji białek przy pomocy cytometrii przepływowej. Celem analizy było sprawdzenie, czy podczas separacji magnetycznej przez kolumny nie przedostały się komórki pochodzenia nabłonkowego – nowotworowe (EpCAM<sup>+</sup>), śródbłonkowego (CD31<sup>+</sup>) lub immunologicznego (CD45<sup>+</sup>). Spośród wyizolowanych, żywych, pojedynczych komórek (strategia bramkowania przedstawiona na rycinie 31) średnio 14,6% komórek (od 0 do 76,5%, mediana 10,6%) wykazywało pochodzenie immunologiczne, 4,12% pochodzenie śródbłonkowe (od 0 do 32,4%, mediana 1,85%) zaś 19,31% pochodzenie nabłonkowe (od 0 do 59,7%, mediana 15,85%). Zanieczyszczenie części hodowli komórkami innego pochodzenia możliwe było również do zaobserwowania po kilku dniach hodowli przy pomocy mikroskopu optycznego – wyraźnie od fibroblastów odróżniały się komórki nowotworowe. Te dwie populacje komórek jako jedyne przeżywały w warunkach hodowli *ex vivo*. CAFs i komórki nowotworowe rozdzielano dzięki wykorzystaniu tzw. zróżnicowanej trypsynizacji. Dzięki zastosowaniu tego procesu po jednym lub dwóch przeprowadzonych w ten sposób pasażach otrzymywano jednolitą hodowlę fibroblastów.

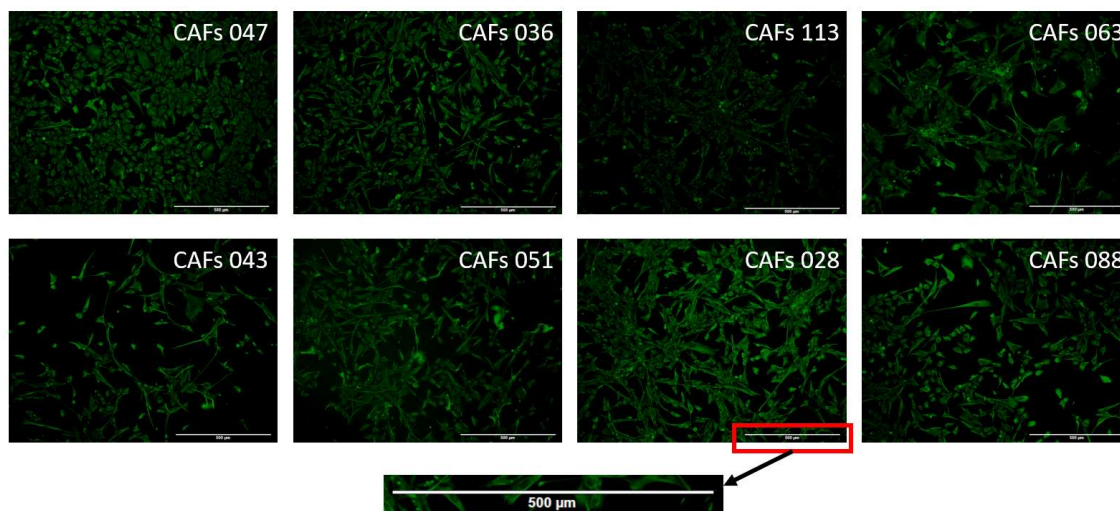
### 13.3. Ocena ekspresji wimentyny w CAFs

Celem potwierdzenia fenotypu mezenchymalnego CAFs w komórkach wybarwiono metodą immunofluorescencji białko wimentynę, będącą jednym z najczęściej stosowanych markerów fibroblastów. Oceny ekspresji dokonano na 24 hodowlach. Wszystkie obrazowane komórki wykazały ekspresję wimentyny. Rycina 30 przedstawia przykłady zdjęć.

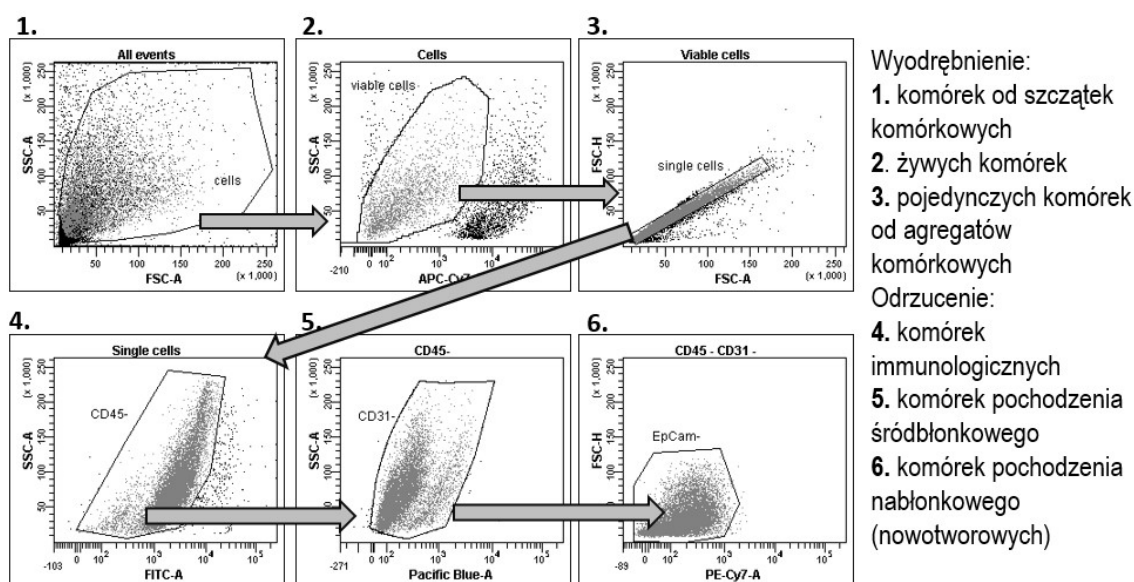
### 13.4. Ocena fenotypu świeżo wyizolowanych CAFs

Świeżo wyizolowane CAFs poddano analizie fenotypu za pomocą cytometrii przepływowej. Strategię bramkowania przedstawia rycina 31. Poziom białek typowych dla CAFs ( $\alpha$ SMA, PDPN, TNC, PDGFR $\beta$  i FSP1) został wyznaczony jako względna mediana fluorescencji dla komórek o fenotypie EpCAM<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> (Rycina 31 i 32).

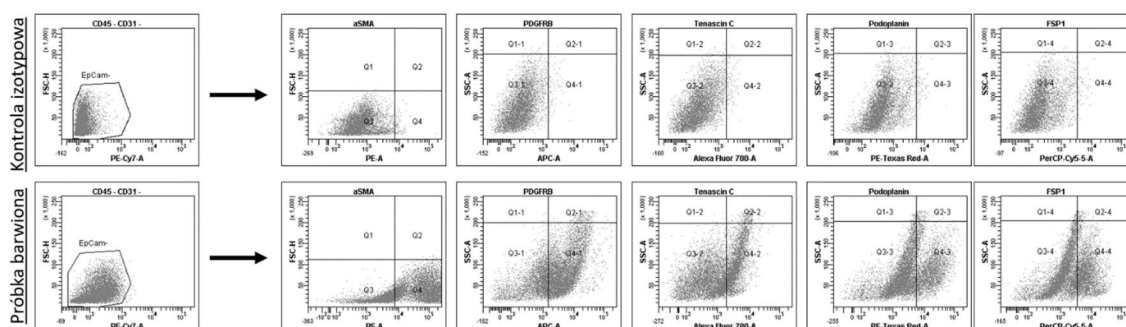




**Rycina 30.** Ekspresja wimentyny w cytoplazmie CAFs (n=24). Niestymulowane kalcytriolem komórki oceniono pod kątem ekspresji wimentyny przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) i oprogramowania CellSense (Olympus, Warszawa, Polska).

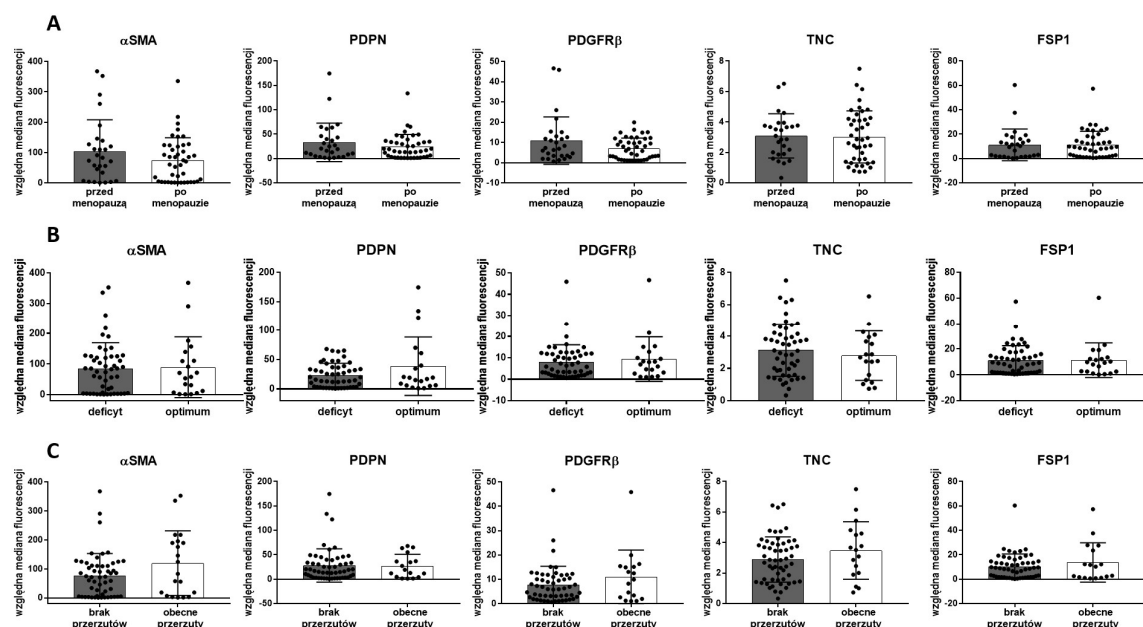


**Rycina 31.** Strategia bramkowania wyseparowanych ludzkich CAFs podczas analiz z zastosowaniem cytometrii przepływowej.



**Rycina 32.** Przykładowe wykresy poziomu białek typowych dla ludzkich CAFs. Analizie poddano komórki o fenotypie CD31<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>.

CAFs podzielono na grupy w oparciu o cechy kliniczne pacjentek: (1) status menopauzalny pacjentek, (2) poziom metabolitu 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu oraz (3) obecność przerzutów. Poziom białek typowych dla CAFs nie różnił się między CAFs pochodzącymi z guzów pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych (Rycina-33A-C).



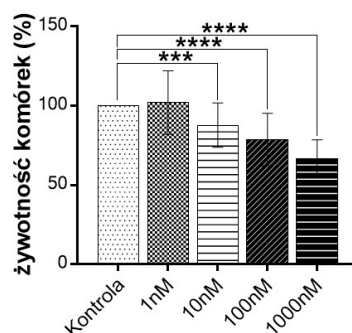
**Rycina 33. Porównanie poziomu wybranych białek w świeżo wyseparowanych CAFs pochodzących z guzów od pacjentek.** A - przed ( $n=28$ ) i po menopauzie ( $n=43$ ), B - z deficytem ( $n=51$ ) i prawidłowym ( $n=20$ ) stężeniem witaminy D<sub>3</sub> w osoczu, C - z nowotworem przerzutującym ( $n=19$ ) i nieprzerzutującym ( $n=52$ ). Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>.  $\alpha$ SMA -  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, PDPN - podoplanina, PDGFR $\beta$  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ , TNC - tenascyna C, FSP1 - białko specyficzne dla fibroblastów. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”; w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testów: T-studenta i Mann-Whitney. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

### 13.5. Badania *ex vivo*

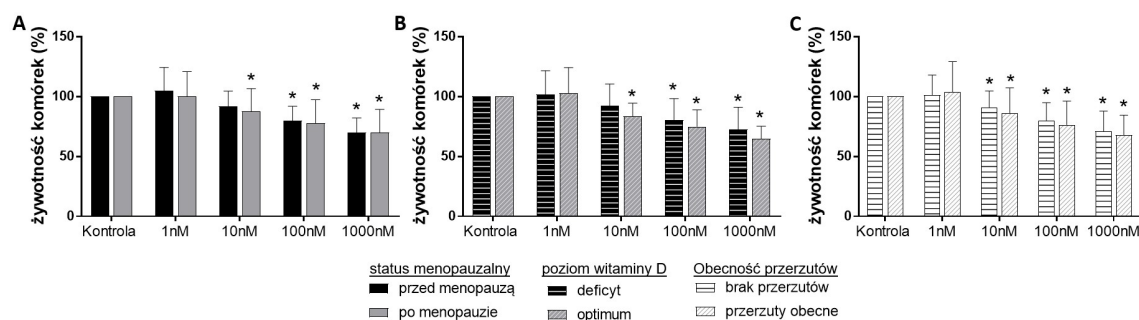
CAFs stymulowano kalcytriolem przez 72 godziny, celem oceny wpływu kalcytriolu na pronowotworowe właściwości komórek. Do analiz wykorzystano hodowle CAFs między 2 a 12 pasażem.

#### 13.5.1. Ocena wrażliwości CAFs na kalcytriol

Hodowle fibroblastów wyizolowanych z guzów pacjentek poddano ocenie wrażliwości na kalcytriol w stężeniach od 1nM do 1000nM. Testy proliferacji wykonano w 3-4 niezależnych powtórzeniach dla 36 hodowli CAFs. Kalcytriol hamuje proliferację fibroblastów w zakresie stężeń 10-1000nM. Najniższe zastosowane stężenie (1nM) nie wpłynęło na proliferację komórek (Rycina 34). W przypadku CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą i z deficytem witaminy D<sub>3</sub> zahamowanie proliferacji zaobserwowano dopiero dla stężenia 100nM (Rycina 35A i B).



**Rycina 34. Ocena aktywności antyproliferacyjnej kalcytriolu w hodowlach ludzkich CAFs.** Żywotność wyrażono jako procent w porównaniu do komórek niestymulowanych kalcytriolem. CAFs (n=36) stymulowano 1-1000nM kalcytriolem przez 72h, test został wykonany w 3-4 niezależnych powtórzeniach. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

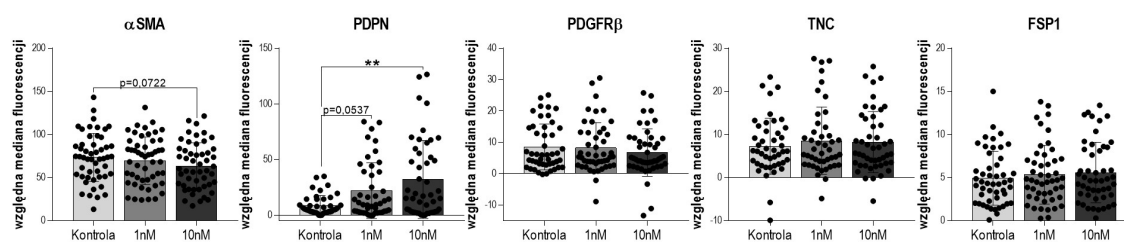


**Rycina 35. Wpływu kalcytriolu na żywotność CAFs z hodowli pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych:** A – przed (n=15) i po menopauzie (n=21). B – z deficytem (n=24) i prawidłowym poziomem (n=12) witaminy D<sub>3</sub>. C – z nowotworem przerzutu (n=13) i nieprzerzutu (n=23). Żywotność wyrażono jako procent w porównaniu do komórek niestymulowanych kalcytriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: A. w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”. B. w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)<sub>2</sub>D w osoczu: 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”. C. w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1-1000nM kalcytriolem przez 72h, test został wykonany w 3-4 niezależnych powtórzeniach. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

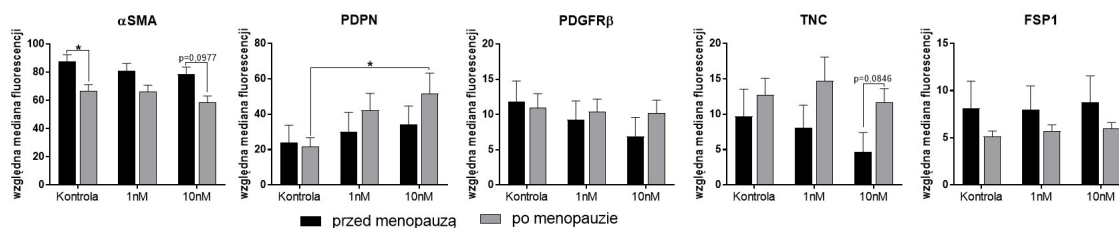


### 13.5.2. Ocena wpływu kalcytriolu na poziom białek specyficznych dla CAFs

Dla 51 wyprowadzonych hodowli CAFs oceniono wpływ kalcytriolu na poziom wybranych białek. CAFs stymulowane przez 72h kalcytriolem w dwóch stężeniach, 1nM i 10nM, poddano analizie fenotypu za pomocą cytometrii przepływowej. Oceniono poziom  $\alpha$ SMA, PDPN, TNC, PDGFR $\beta$  oraz FSP1 (S100A4). Poziom  $\alpha$ SMA po stymulacji komórek 10nM kalcytriolem nieznacznie uległ obniżeniu ( $p=0,0722$ , Rycina 36). Stymulacja CAFs kalcytriolem wpłynęła istotnie tylko na poziom PDPN - przy zastosowaniu 10nM kalcytriolu - poziom białka wzrósł w porównaniu do kontroli niestymulowanej kalcytriolem (mierzonej jako mediana fluorescencji) (Rycina 36). Stymulacja 1nM kalcytriolem również skutkowała wzrostem poziomu PDPN ( $p=0,0537$ , Rycina 36). Poziom białek został porównany również między CAFs pochodzącymi od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych, tj. CAFs z guzów: (1) pacjentek przed i po menopauzie (Rycina 37), (2) pacjentek z deficytem i prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> mierzonym w osoczu (Rycina Z1 w Załączniku) oraz (3) pacjentek z nowotworem przerzutującym i nieprzerzutującym (Rycina Z2 w Załączniku). CAFs od pacjentek po menopauzie charakteryzowały się mniejszym poziomem  $\alpha$ SMA (Rycina 37A). Stymulacja komórek kalcytriolem wyciszyła obserwowaną różnicę. Poziom białek typowych dla CAFs nie różni się między CAFs pochodzącymi od pacjentek z deficytem i prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z rakiem przerzutującym i nieprzerzutującym (Rycina Z1 i Z2 w Załączniku).



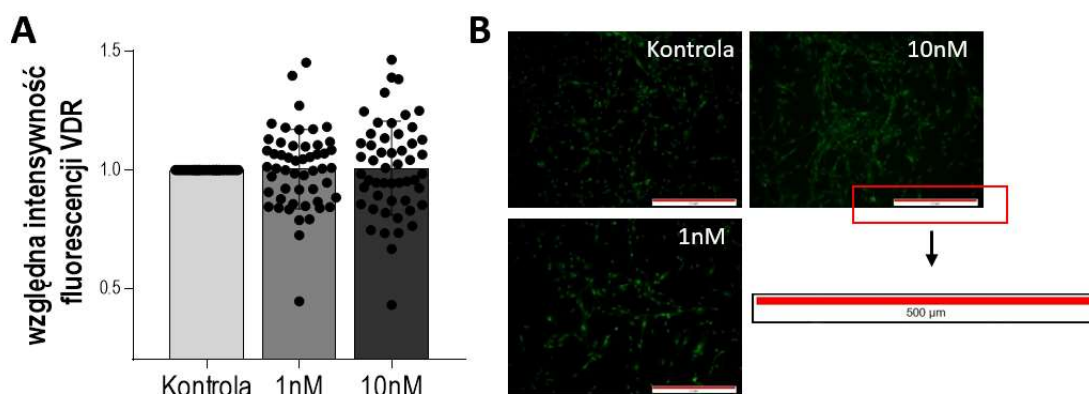
**Rycina 36.** Wpływ kalcytriolu na poziom białek typowych dla CAFs oceniony za pomocą cytometrii przepływowej ( $n=51$ ). Poziom badanych białek został przedstawiony jako względna mediana fluorescencji. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>.  $\alpha$ SMA -  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, PDPN - podoplanina, PDGFR $\beta$  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ , TNC - tenascyna C, FSP1 - białko specyficzne dla fibroblastów. CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem testów dla wielokrotnych porównań – One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



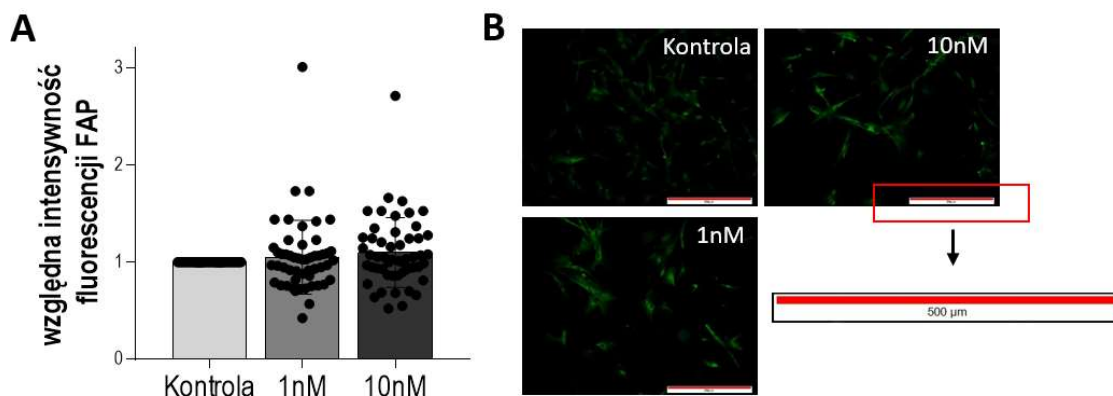
**Rycina 37. Wpływ kalcytriolu na poziom białek typowych dla CAFs od pacjentek przed ( $n=18$ ) i po menopauzie ( $n=33$ ) oceniony za pomocą cytometrii przepływowej.** Poziom badanych białek przedstawiono jako względną medianę fluorescencji. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>.  $\alpha$ SMA -  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, PDPN - podoplanina, PDGFR $\beta$  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ , TNC - tenascyna C, FSP1 – białko specyficzne dla fibroblastów. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”. CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

### 13.5.3. Ocena wpływu kalcytriolu na poziom VDR i FAP

Analizie poziomu VDR i FAP za pomocą techniki immunofluorescencji poddano 53 hodowle CAFs, wszystkie z nich posiadały ekspresję VDR i FAP. Zarówno średni poziom VDR (Rycina 38), jak i FAP (Rycina 39) w CAFs nie zmienił się pod wpływem stymulacji komórek kalcytriolem. Nie zaobserwowano również różnic w poziomie tych dwóch białek między CAFs pochodzącymi od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych (Rycina Z3 i Z4 w Załączniku).



**Rycina 38. Wpływ kalcytriolu na poziom receptora witaminy  $D_3$  (VDR) w CAFs ( $n=53$ ) oceniony metodą immunofluorescencji.** A – poziom VDR przedstawiono jako względną intensywność fluorescencji. B - Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) i oprogramowania CellSense (Olympus, Warszawa, Polska). CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. komórki utrwalano w 4% formaldehydzie i barwiono przy pomocy przeciwciał: pierwszorzędowego króliczego anti-VDR i drugorzędowego anty-króliczego skoniugowanego z fluorochromem Alexa Fluor 488. Względna intensywność fluorescencji obliczona na podstawie średniej fluorescencji (CTCF) dla hodowli stymulowanej kalcytriolem znormalizowanej do kontroli średniej fluorescencji kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

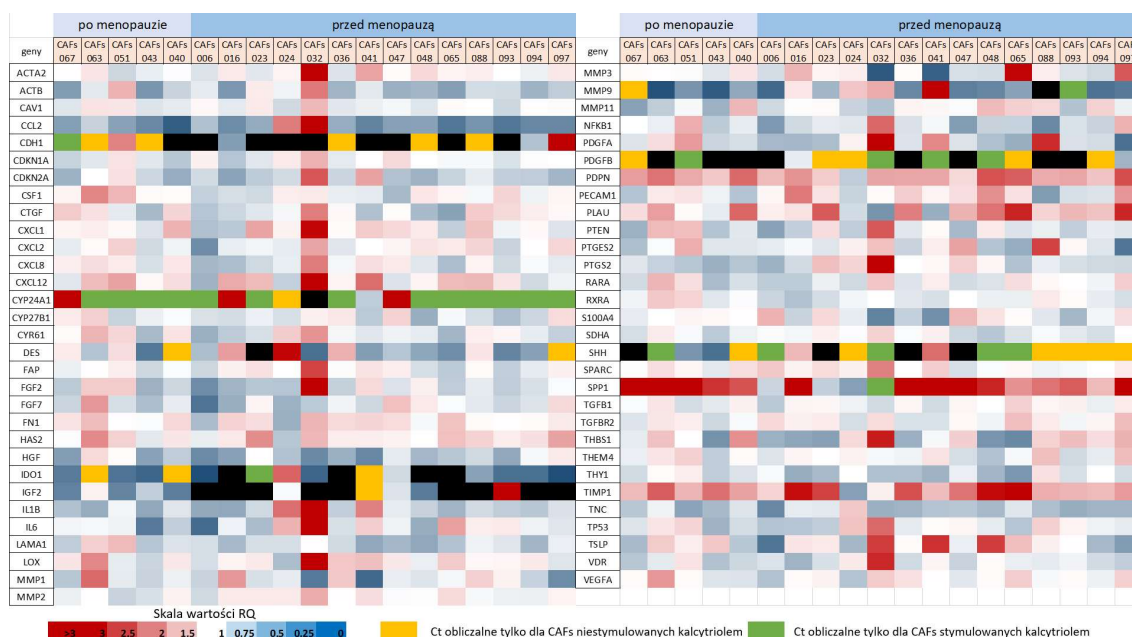


**Rycina 39. Wpływ kalcytriolu na poziom białka aktywacji fibroblastów (FAP) w CAFs ( $n=53$ ) oceniony metodą immunofluorescencji. A – poziom FAP przedstawiono jako względną intensywność fluorescencji. B - Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) i oprogramowania CellSense (Olympus, Warszawa, Polska). CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. komórki utrwalano w 4% formaldehydzie i barwiono przy pomocy przeciwciał: pierwszorzędowego króliczego anti-FAP i drugorzędowego anti-króliczego skoniugowanego z fluorochromem Alexa Fluor 488. Względna intensywność fluorescencji obliczona na podstawie średniej fluorescencji (CTCF) dla hodowli stymulowanej kalcytriolem znormalizowanej do kontroli średniej fluorescencji kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .**

### 13.5.4. Ocena wpływu kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów

#### 13.5.4.1. Macierz ekspresji mRNA

W pierwszym etapie wykonano przesiewową macierz ekspresji mRNA dla 61 genów i 19 hodowli CAFs – 14 od pacjentek przed menopauzą oraz 5 od pacjentek po menopauzie (Rycina 40). Dla większości (16/19) analizowanych hodowli CAFs zaobserwowano stymulowaną kalcytriolem indukcję ekspresji CYP24A1, zaś dla 14/19 CAFs obniżenie ekspresji VDR. Wykonanie panelu ekspresji genów posłużyło określeniu dalszych celów badawczych. Do kolejnych etapów badań wyłoniono następujące geny i białka: do analizy ekspresji mRNA za pomocą RT-PCR: *CCL2*, *MMP9*, *PDPN*, *TIMP1*, *TNC*, *SPPI*, *VDR*, (2) do analizy sekrecji białek przy pomocy komercyjnie dostępnych zestawów ELISA: CCL2, CXCL12, HGF (czynnik wzrostu hepatocytów), MMP9, TNC, OPN oraz do analizy ekspresji białek przy pomocy techniki western-blot i zymografii żelatynowej: IDO1, MMP2, MMP9, TIMP1, TGF $\beta$ 1 i OPN. Rycina Z5 w Załączniku przedstawia macierz ekspresji mRNA uzupełnioną o wartości liczbowe.

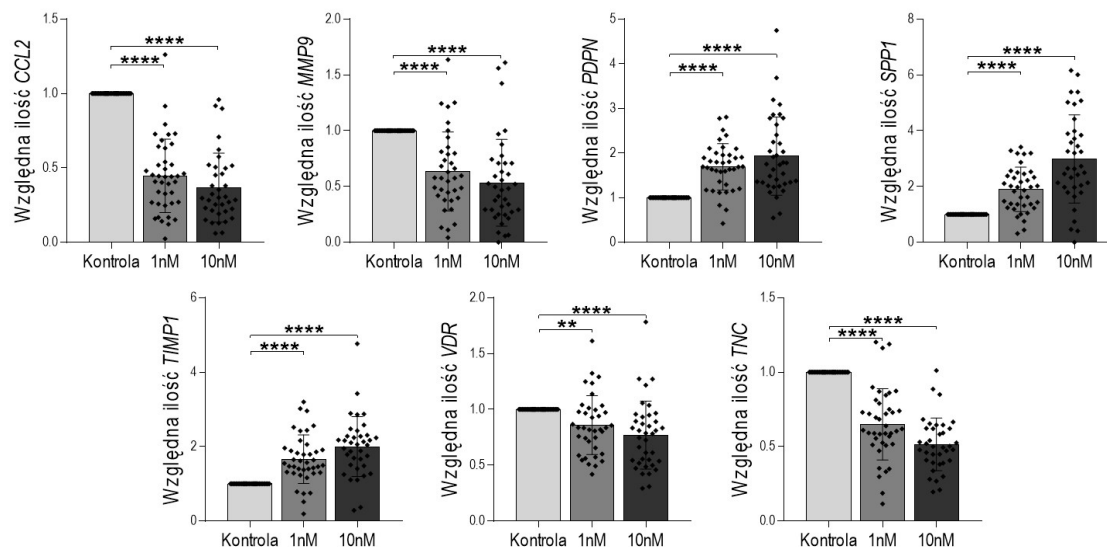


**Rycina 40. Macierz ekspresji 61 genów dla wybranych 19 hodowli CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem przez 72h: od pacjentek przed menopauzą (n=14), od pacjentek po menopauzie (n=5). W tabeli zamieszczono wartości RQ (krotność zmian ekspresji, względną ilość mRNA) które policzono za pomocą metody porównawczej  $\Delta\Delta C_t$  względem kontroli endogennych – GAPDH i RPLP0 – oraz kalibratora – CAFs niestymulowanych kalcytriolem w oprogramowaniu QuantiStudio™ Real-Time PCR Software oraz ExpressionSuite Software. Dla CAFs, dla których RQ było nieobliczalne ze względu na brak jednej z wartości Ct (wartość progowa cyklu) dla komórek niestymulowanych lub stymulowanych, przedstawiono wartości Ct, które zostały oznaczone - na rycinie zaznaczono kolorami żółtym (Ct oznaczone tylko dla CAFs niestymulowanych) lub zielonym (Ct oznaczone tylko dla CAFs stymulowanych kalcytriolem). Czarny kolor reprezentuje próbki, dla których nie udało się wyznaczyć żadnej wartości Ct (ani dla komórek niestymulowanych ani dla stymulowanych).**

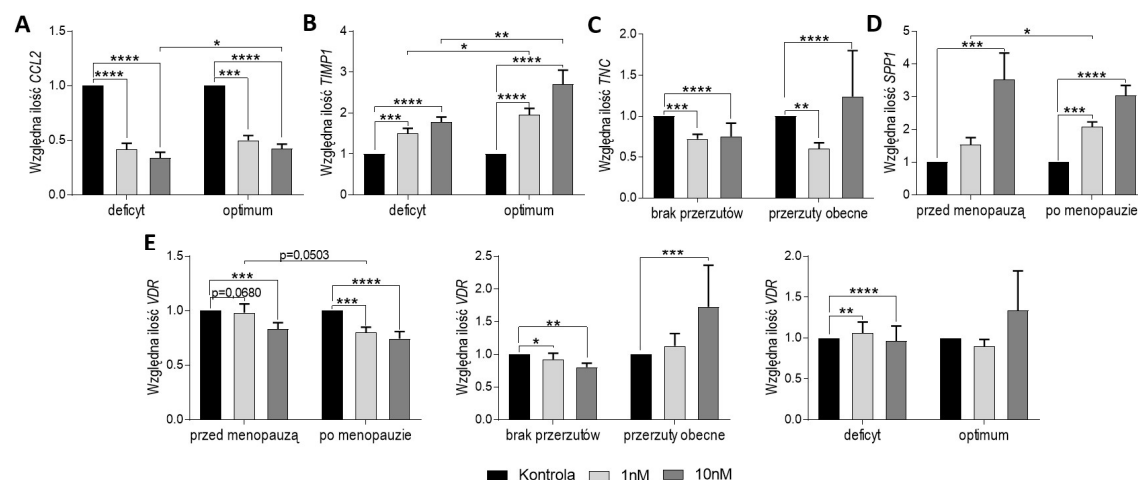
### 13.5.4.2. Ocena ekspresji mRNA wybranych genów

Wybrane geny zostały ocenione w hodowlach CAFs pochodzących od 44 pacjentek. Stymulacja komórek kalcytriolem (1nM i 10nM) istotnie zmniejszyła ekspresję *CCL2*, *MMP9*, *TNC*, *VDR* oraz zwiększyła ekspresję *PDPN*, *SPP1* oraz *TIMP1* (Rycina 41). Podobne tendencje zaobserwowano, gdy CAFs podzielono w oparciu o cechy kliniczne pacjentek (Rycina 42A-E i Z6A-F w Załączniku). CAFs pochodzące od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> charakteryzowały się silniejszą indukcją ekspresji *CCL2* po stymulacji 10nM i *TIMP1* po stymulacji 1nM i 10nM kalcytriolem (Rycina 42A i B). Ekspresja *TNC* w CAFs pochodzących od pacjentek z nowotworem przerzutującym (Rycina 42C) wzrosła po stymulacji 10nM kalcytriolem, przeciwnie niż w przypadku CAFs pochodzących od pacjentek z pozostałych grup klinicznych, gdzie ekspresja *TNC* zmalała zarówno po stymulacji 1nM, jak i 10nM kalcytriolem (Rycina 42C i Rycina Z6F). CAFs pochodzące od pacjentek o różnym statusie menopauzalnym wykazały zróżnicowaną ekspresję *SPP1* (Rycina 42D) i *VDR* (Rycina 42E) w odpowiedzi na stymulację kalcytriolem (1nM), fibroblasty pochodzące od pacjentek po menopauzie cechowała silniejsza indukcja ekspresji *SPP1* oraz represja ekspresji *VDR* (p=0,0503). Ponadto ekspresja *VDR* wzrosła po stymulacji 1nM kalcytriolem w CAFs pochodzących

od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> oraz po stymulacji 10nM w CAFs pacjentek z nowotworem przerzutującym (Rycina 42E).



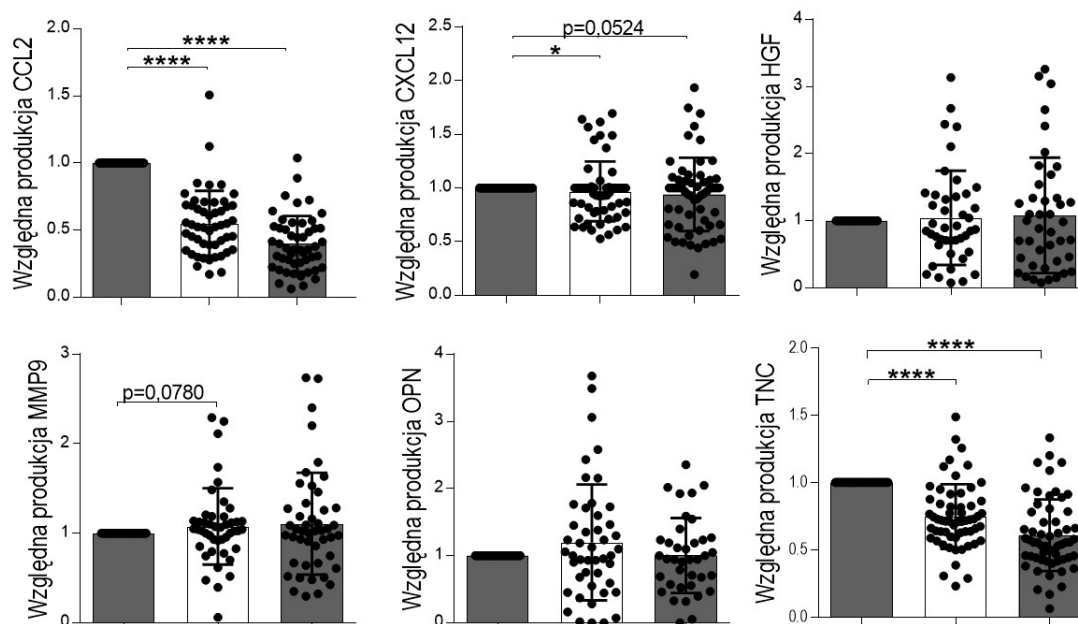
**Rycina 41.** Wpływ kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów w lizatach CAFs (n=44). CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Ekspresję mRNA przedstawiono jako względną ilość mRNA – wyniki analizowano metodą porównawczą  $\Delta\Delta Ct$  i normalizowano względem kontroli niestymulowanej kalcytriolem w oprogramowaniu QuantStudio™ Real-Time PCR Software oraz ExpressionSuite Software. CCL2 – ligand chomokiny motywu C-C 2, MMP9 – metaloproteinaza 9, PDPN – podoplanina, SPP1 – wydzielana fosfoproteina 1, TIMP1 – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1, VDR – receptor witaminy D, TNC – tenascyna C. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



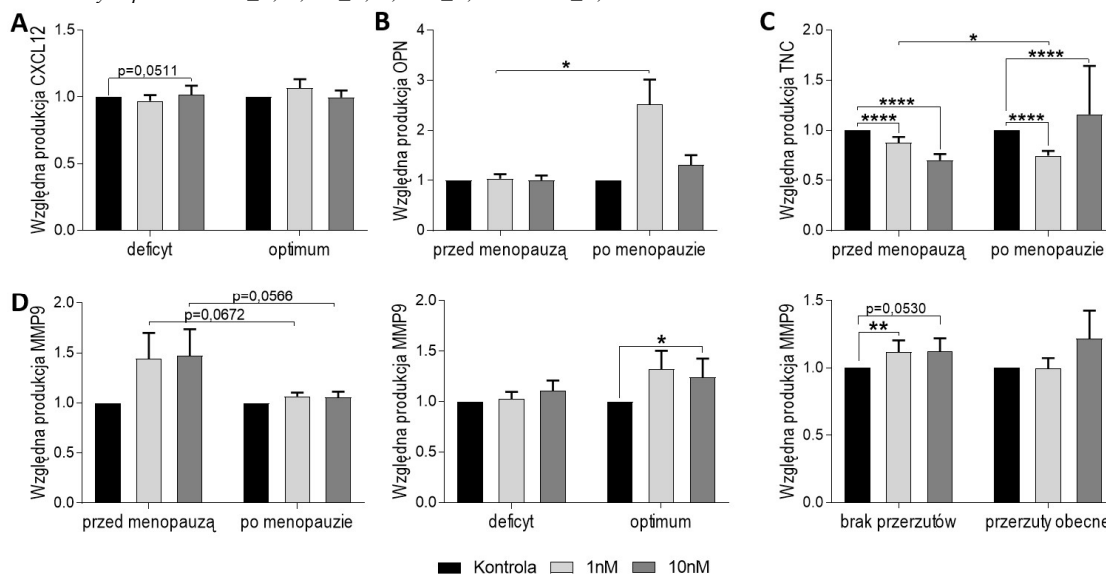
**Rycina 42.** Wpływ kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów w lizatach CAFs pochodzących od pacjentek o różnicowanych cechach klinicznych: pacjentek przed (n=16) i po menopauzie (n=28), pacjentek z deficytem (n=29) i prawidłowym poziomem (n=15) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem przerzutującym (n=15) i nieprzerzutującym (n=29). A - CCL2 (ligand chemokiny motywu C-C 2), B - TIMP1 (tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1), C - TNC (tenascyna C), D - SPP1 (wydzielana fosfoproteina 1) i E - VDR (receptor witaminy D). Ekspresję mRNA przedstawiono jako względną ilość mRNA – wyniki analizowano metodą porównawczą  $\Delta\Delta Ct$  i normalizowano względem kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Pacjenci zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

### 13.5.5. Ocena wpływu kalcytriolu na poziom wydzielanych białek przez fibroblasty towarzyszące nowotworom

Poziom wydzielanych białek przez CAFs został oceniony w supernatantach zebranych z 51 hodowli CAFs stymulowanych kalcytriolem. Stymulacja CAFs kalcytriolem w obu stężeniach zredukowała wydzielanie **CCL2**, **CXCL12** (dla 10nM  $p=0,0524$ ), **TNC** oraz nie miała wpływu na produkcję **HGF**, **MMP9** i **OPN** (Rycina 43). Obniżenie produkcji CCL2 zaobserwowano w CAFs pochodzących od wszystkich grup pacjentek (Rycina Z7A w Załączniku). Obniżenie produkcji CXCL12 po stymulacji kalcytriolem nie było możliwe do zaobserwowania gdy CAFs podzielono na grupy w oparciu o charakterystykę kliniczną pacjentek (Rycina 44A i Z7B w Załączniku). W przypadku CAFs pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> stymulacja 10nM kalcytriolem prowadziła do zwiększonej sekrecji CXCL12 przez CAFs (Rycina 44A). CAFs stymulowane 1nM kalcytriolem pochodzące od pacjentek przed menopauzą cechowały się niższą zdolnością do wydzielania OPN (Rycina 44B) oraz wyższą zdolnością do produkcji TNC (Rycina 44C) niż te pochodzące od pacjentek po menopauzie. Mimo obniżenia produkcji TNC w CAFs pochodzących od pacjentek z prawie każdej grupy klinicznej, dla CAFs pacjentek po menopauzie różne stężenia kalcytriolu wywoływały przeciwne efekty – stymulacja 1nM kalcytriolem skutkowała redukcją produkcji TNC, a stymulacja 10nM zwiększeniem (Rycina 44C). W przypadku CAFs od pacjentek bez przerzutów (dla 1nM  $p<0,05$ , dla 10nM  $p=0,0530$ ) oraz od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> (dla 10nM) stymulacja kalcytriolem zwiększyła produkcję MMP9 (Rycina 44A). CAFs stymulowane 1nM ( $p=0,0672$ ) i 10nM ( $p=0,0566$ ) kalcytriolem pochodzące od pacjentek przed menopauzą cechowały się większą zdolnością do wydzielania MMP9 niż te pochodzące od pacjentek po menopauzie (Rycina 44A).



**Rycina 43. Wpływ kalcytriolu na produkcję wybranych białek przez CAFs (n=51) oceniony przy pomocy testów ELISA.** CCL2 – ligand chemokiny motywu C-C 2, CXCL12 – ligand chemokiny motywu C-X-C 12, HGF – czynnik wzrostu hepatocytów, MMP9 – metaloproteinaza 9, OPN – osteopontyna, TNC – tenascyna C. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Poziom wydzielanych białek obliczono w oparciu o krzywą za pomocą oprogramowania CutveExpert 1.4. Poziom wydzielanych białek normalizowano wobec kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

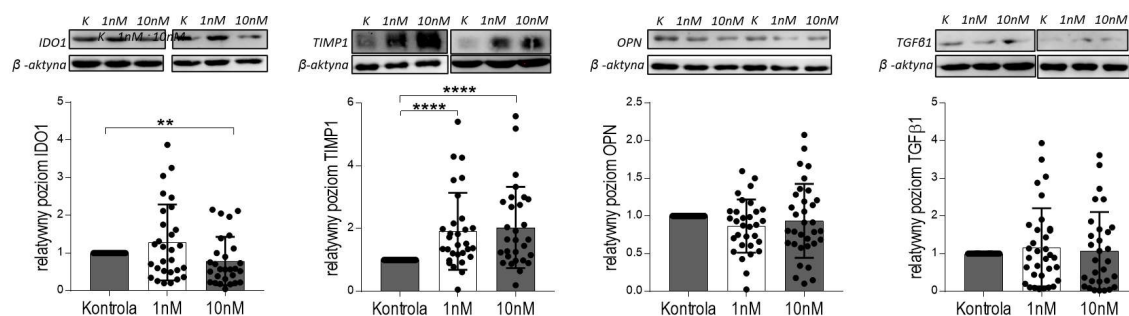


**Rycina 44. Wpływ kalcytriolu na produkcję wybranych białek przez CAFs pochodzące od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych oceniony przy pomocy testów ELISA:** przed (n=18) i po menopauzie (n=33), z deficytem (n=33) i prawidłowym poziomem (n=17) witaminy D<sub>3</sub> oraz z nowotworem przerzutującym (n=16) i nieprzerzutującym (n=35). A – CXCL12 (ligand chemokiny motywu C-X-C 12), B – OPN (osteopontyna), C – TNC (tenascyna C), D – MMP9 (metaloproteinaza 9). Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Poziom wydzielanych białek obliczono w oparciu o krzywą za pomocą oprogramowania CutveExpert 1.4. Poziom wydzielanych białek normalizowano wobec kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

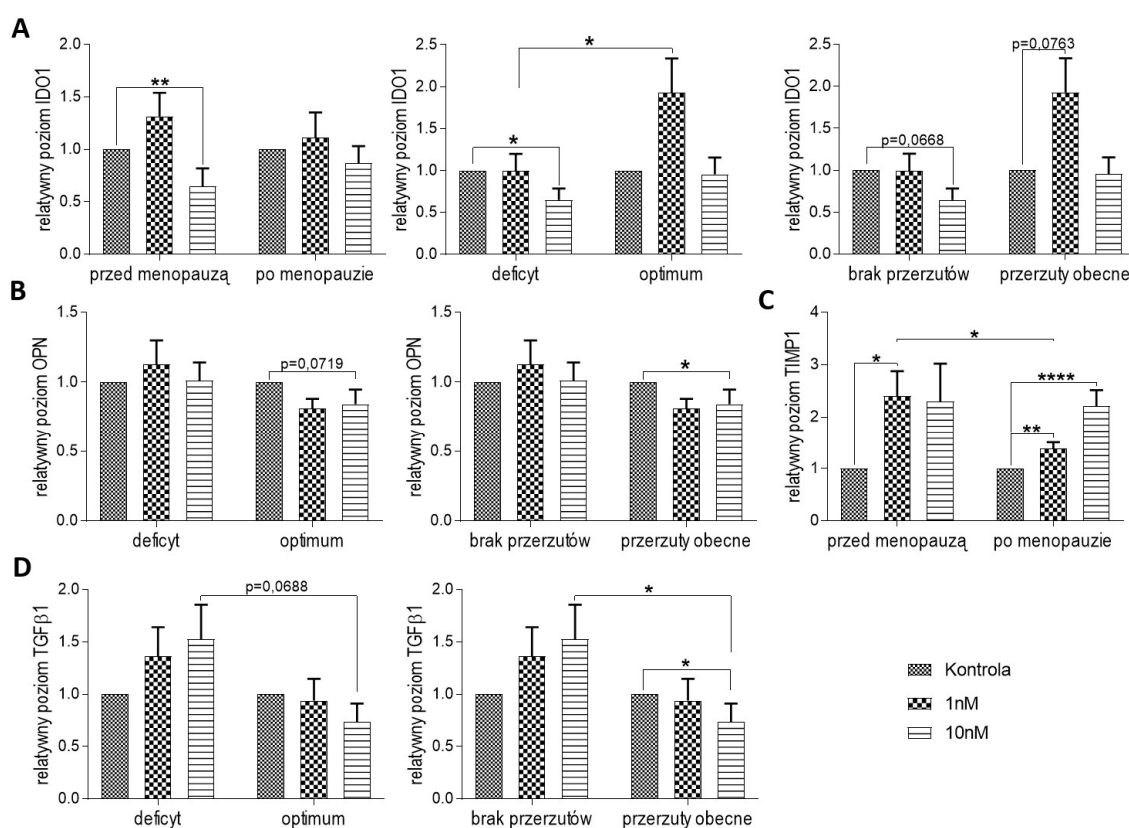
### 13.5.6. Ocena wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek w CAFs

Celem oceny wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek zebrano materiał z 35 hodowli CAFs. Stymulacja CAFs kalcytriolem obniżyła ekspresję **IDO1** wyłącznie przy zastosowaniu stężenia 10nM (Rycina 45). Dodatkowo taki efekt kalcytriolu widoczny był tylko w analizie wszystkich hodowli, hodowli od pacjentek przed menopauzą i pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> (Rycina 46A). Zaś w CAFs pacjentek z nowotworem przerzutującym zaobserwowano tendencję do wzrostu poziomu IDO1 po stymulacji 1nM kalcytriolem ( $p=0,0763$ , Rycina 46A). Stymulowane 1nM kalcytriolem CAFs pochodzące od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> charakteryzowały się niższym poziomem IDO1 niż CAFs pochodzące od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> (Rycina 46A). Analizując łącznie hodowle CAFs pochodzące od wszystkich pacjentek nie zaobserwowano aby kalcytriol wpłynął na poziom **OPN i TGFβ1** (Rycina 45). Jednocześnie stymulacja 10nM kalcytriolem CAFs pochodzących od pacjentek z nowotworem przerzutującym prowadziła do obniżenia poziomu OPN (Rycina 46B). Podobnie jak w przypadku analizy RT-PCR poziom **TIMP1** wzrósł w komórkach stymulowanych kalcytriolem (Rycina 45). Obserwacja ta była niezależna od grupy klinicznej pacjentek, z której pochodziły CAFs z wyjątkiem CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą, gdzie istotny statystycznie wzrost poziomu tego białka zaobserwowano wyłącznie dla 1nM stężenia kalcytriolu (Rycina 46C i Rycina Z8C w Załączniku). Stymulowane 1nM kalcytriolem CAFs pochodzące od pacjentek przed menopauzą charakteryzowały się wyższym poziomem TIMP1 niż CAFs pochodzące od pacjentek po menopauzie (Rycina 46C). W przypadku CAFs pacjentek z nowotworem przerzutującym stymulacja 10nM kalcytriolem skutkowała obniżeniem poziomu TGFβ1 (Rycina 46D). Stymulowane 10nM kalcytriolem CAFs pochodzące od pacjentek bez przerzutów cechowały się wyższym poziomem TGFβ1 niż CAFs pochodzące od pacjentek z guzem przerzutującym (Rycina 46D).





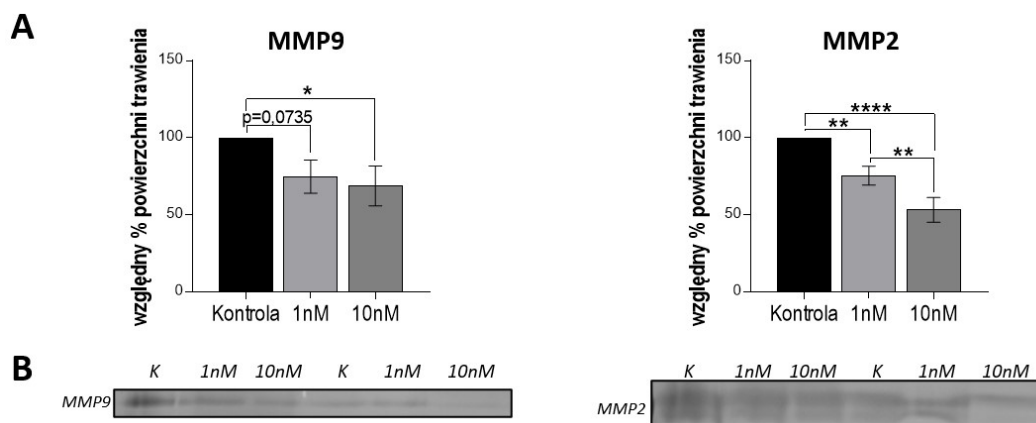
**Rycina 45. Wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek w liszatkach CAFs (n=35).** CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Analizowano prążki na następującej wysokości: IDO1 (idolamina 1): 40kDa, TIMP1 (tkankowy inhibitor metaloproteinaz): 25kDa, OPN (osteopontyna): 40kDa, TGFβ1 (transformujący czynnik wzrostu β 1): 35 kDa. Poziom białek normalizowano podwójnie do β-aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Przykłady zdjęć prążków umieszczono nad wykresami. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.



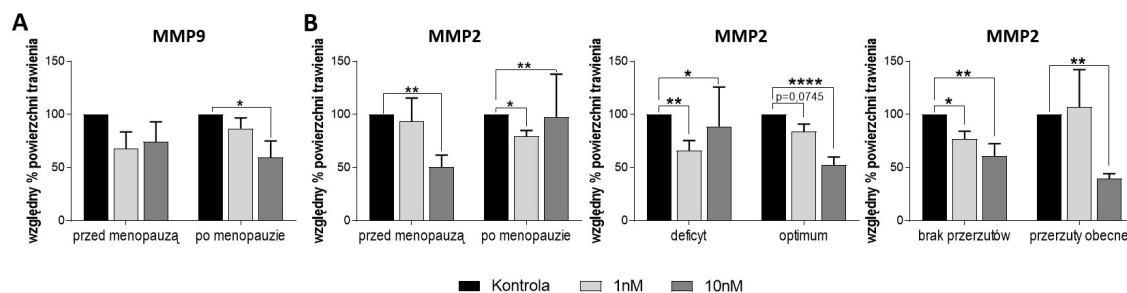
**Rycina 46. Wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek w liszatkach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych:** pacjentek przed (n=12) i po menopauzie (n=23), pacjentek z deficytem (n=20) i prawidłowym poziomem (n=15) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem przerzutującym (n=12) i nieprzerzutującym (n=23). A - IDO1 (idolamina 1), B - OPN (osteopontyna), C - TIMP1 (tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1), D - TGFβ1 (transformujący czynnik wzrostu β 1). Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”; w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Analizowano prążki na następującej wysokości: IDO1: 40kDa, TIMP1: 25kDa, OPN: 40kDa, TGFβ1: 35 kDa. Poziom białek normalizowano podwójnie do β-aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

### 13.5.7. Ocena wpływu kalcytriolu na aktywność żelatynaz w CAFs

Aktywność żelatynaz MMP2 i MMP9 została oceniona w 16 lizatach komórkowych. Analizie poddano prążki na wysokościach tożsamy z następującymi masami białek: MMP9 - około 100 kDa, MMP2 – około 60 kDa. Stymulacja komórek kalcytriolem zmniejszyła aktywność **MMP9** i **MMP2** w lizatach CAFs (Rycina 47). W przypadku MMP9 istotna zmiana została zaobserwowana dopiero przy zastosowaniu 10nM kalcytriolu, aczkolwiek przy 1nM widoczna była taka sama tendencja ( $p=0,0735$ ) (Rycina 47). Takim samym wynikiem charakteryzowały się CAFs pacjentek po menopauzie (Rycina 48A). W CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą, z deficytem/normą witaminy D<sub>3</sub> czy niezależnie od potencjału nowotworu do tworzenie przerzutów nie zaobserwowano obniżenia aktywności MMP9 po stymulacji kalcytriolem (Rycina Z9 w Załączniku). Obniżenie aktywności MMP2 po zastosowaniu obu stężeń kalcytriolu zostało zaobserwowane dla CAFs pacjentek po menopauzie, z deficytem witaminy D<sub>3</sub> lub bez przerzutów (Rycina 48B). W przypadku CAFs pacjentek przed menopauzą, z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> oraz z obecnymi przerzutami aktywność MMP2 została obniżona wyłącznie po zastosowaniu 10nM kalcytriolu (Rycina 48B).



**Rycina 47. Wpływ kalcytriolu na aktywność metaloproteiny 2 (MMP2) i metaloproteiny 9 (MMP9) w lizatach CAFs.** A – CAFs ( $n=16$ ) stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. B - Analizowano prążki na następującej wysokości: MMP9 – około 100 kDa, MMP2 – około 60 kDa. B - zdjęcia prążków, negatyw. Aktywność metaloproteinaz wyrażono jako procent kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



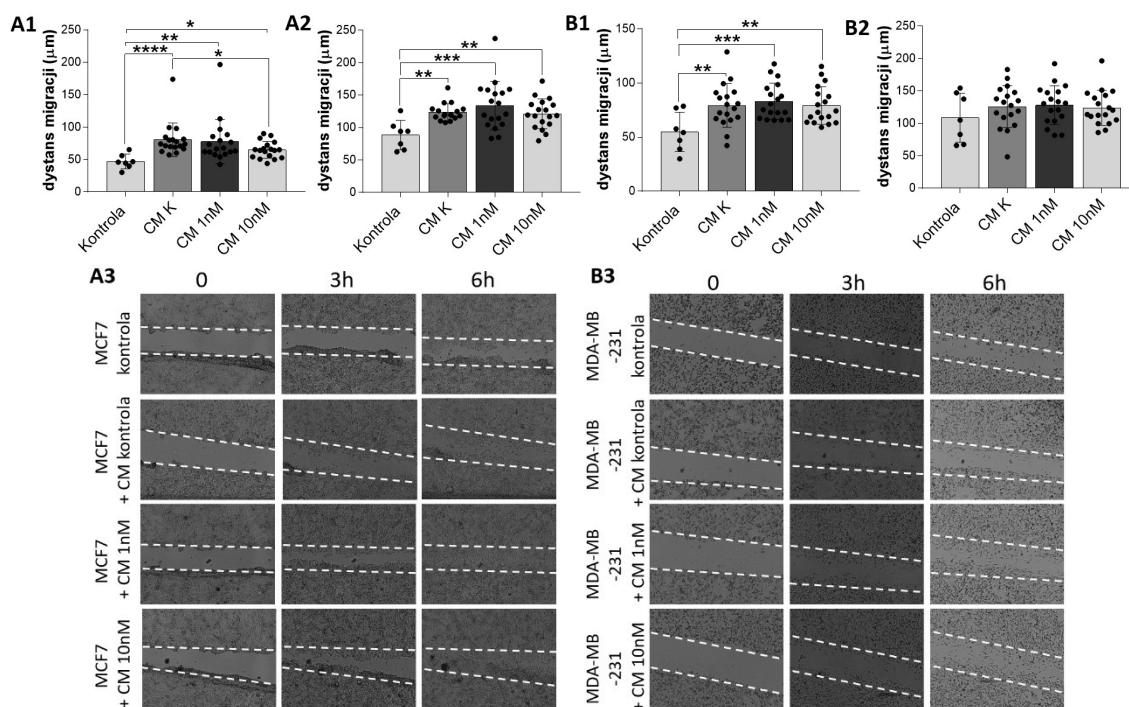
**Rycina 48. Wpływ kalcetriolu na aktywność metaloproteinazy 2 (MMP2) i metaloproteinazy 9 (MMP9) w lizatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych: pacjentek przed (n=10) i po menopauzie (n=6), pacjentek z deficytem (n=9) i prawidłowym poziomem (n=8) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem przerzutującym (n=6) i nieprzerzutującym (n=10). A - Ocena aktywności MMP9, B - MMP2. Aktywność metaloproteinaz wyrażono jako procent kontroli niestymulowanej kalcitriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> <30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcitriolem przez 72h. Analizowano próbki na następującej wysokości: MMP9 – około 100 kDa, MMP2 – około 60 kDa. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.**

### **13.6. Badania *in vitro***

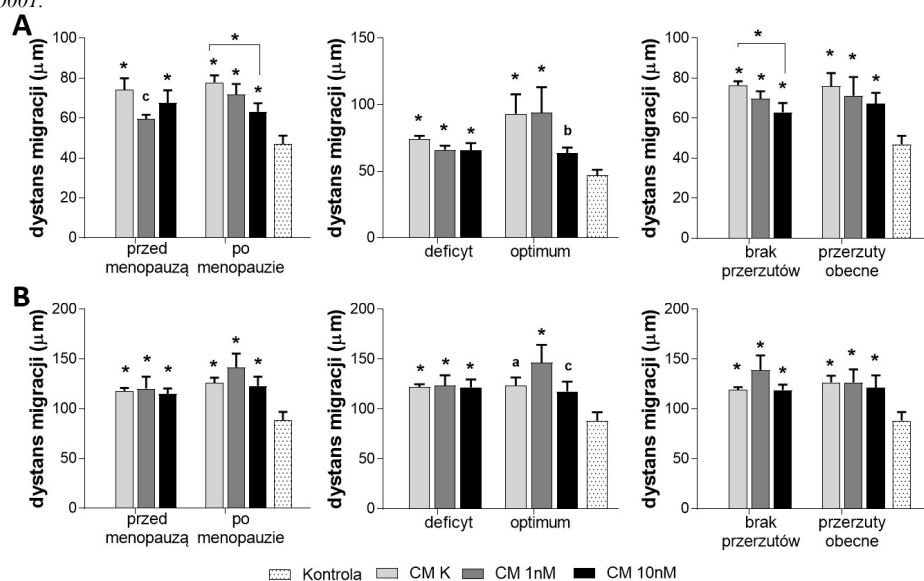
Celem przeprowadzenia analiz wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na komórki nowotworowe zebrano CM znad 16 hodowli CAFs głodzonych 24-godziny w medium bez surowicy. CM aplikowano na komórki nowotworowe linii MCF-7 i MDA-MB-231 celem sprawdzenia wpływu na migrację (za pomocą techniki zwanej testem rysy) oraz na ekspresję wybranych białek.

#### **13.6.1. Ocena wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na migrację komórek nowotworowych**

CM zebrane znad CAFs istotnie przyspieszyło migrację komórek obu linii nowotworowych (Rycina 49A1 i B1). CM znad CAFs pochodzących od pacjentek o różnych cechach klinicznych stymulowało migrację MCF-7, a efekt był widoczny zarówno po 3, jak i po 6h od nałożenia CM na komórki nowotworowe (Rycina 49A1-2, 50A i B). W przypadku komórek MDA-MB-231 stymulację migracji obserwuje się po 3 godzinach przy zastosowaniu CM znad CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych (Rycina 49B1 i Z10A w Załączniku). Nie zanotowano takiego samego efektu po 6h stymulacji CM znad CAFs (Rycina 49B2 i Z10B w Załączniku). Prócz tego zaobserwowano osłabienie migracji komórek MCF-7 po stymulacji komórek za pomocą CM znad CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem w porównaniu do CM znad CAFs niestymulowanych (Rycina 49A1), efekt ten był widoczny tylko w 3 godzinie stymulacji. Ponadto osłabienie promigracyjnej aktywności (dla MCF-7) CAFs po stymulacji kalcytriolem obserwuje się wyłącznie dla CAFs pochodzących od pacjentek po menopauzie i pacjentek bez przerzutów (Rycina 50A).



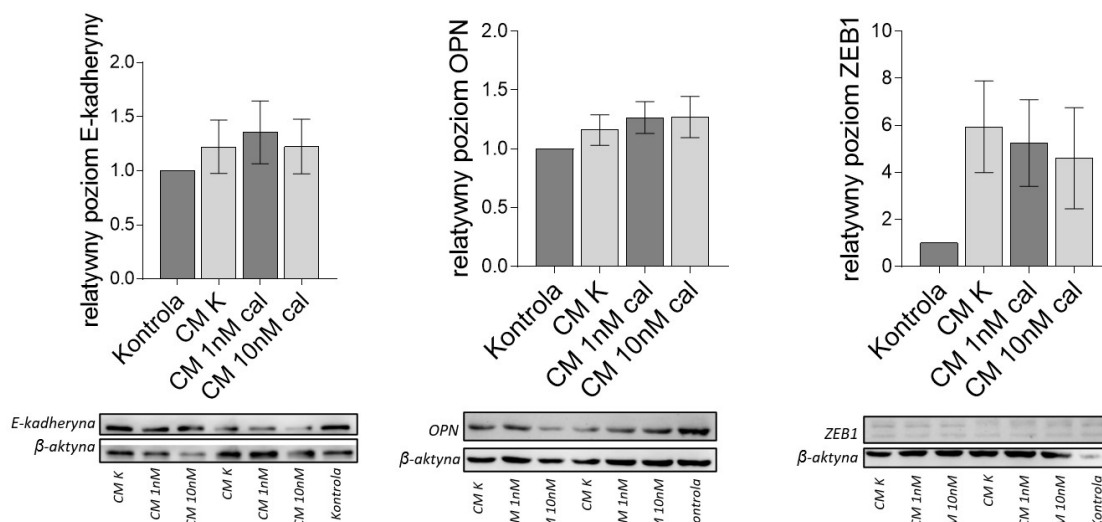
**Rycina 49. Wpływ medium znan CAFs stymulowanych kalcytriolem na migrację ludzkich komórek nowotworowych linii MCF-7 (A) i MDA-MB-231 (B):** A1 i B1 – po 3h od nałożenia CM, A2 i B2 – po 6h od nałożenia CM, A3 – przykład zdjęć MCF-7 w czasie 0, 3 i 6h, B3 - przykład zdjęć MDA-MB-231 w czasie 0, 3 i 6h. CAFs stymulowano 72h kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24h, zebrane CM nałożono na konfluentne MCF-7 i MDA-MB-231 (na płytce 24-dółkowej) po wykonaniu rysy. Zdjęcia wykonano za pomocą oprogramowania Stream Start 1.6.1. Analizę wykonano dla 18 CM znan CAFs. Wyniki przedstawiono w postaci średniego dystansu migracji  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* $\leq 0,05$ , \*\* $\leq 0,01$ , \*\*\* $\leq 0,001$  i \*\*\*\* $\leq 0,0001$ .



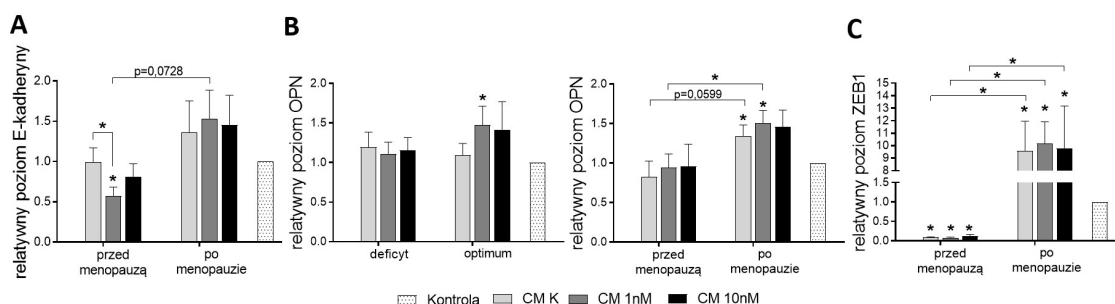
**Rycina 50. Wpływ medium znan CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na migrację komórek ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MCF-7.** A- po 3h, B- po 6h od rozpoczęcia stymulacji. Zastosowano media od pacjentek przed menopauzą (n=7), po menopauzie (n=9), pacjentek z deficytem (n=10) i prawidłowym poziomem (n=6) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem nieprzerzutującym (n=9) i przerzutującym (n=7). CAFs hodowano 72h z kalcytriolem, następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24h, zebrane CM nałożono na konfluentne MCF-7 (na płytce 24-dółkowej) po wykonaniu rysy. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. Zdjęcia wykonano za pomocą oprogramowania Stream Start 1.6.1. Wyniki przedstawiono w postaci średniego dystansu migracji  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. „\*” lub „a”, „b”, „c” nad słupkami wskazują na porównanie do kontroli niestymulowanej kalcytriolem, „a” p<0,06, „b” p>0,09, „c” p<0,1, \* $\leq 0,05$ .

### 13.6.2. Ocena wpływu CAFs stymulowanych kalcytriolem na ekspresję wybranych białek w komórkach nowotworowych

Komórki nowotworowe linii MCF-7 i MDA-MB-231 stymulowano 72 godziny CM znad CAFs stymulowanych kalcytriolem. Ocenie poddano poziom E-kadheryny, OPN i ZEB1. W przypadku linii MCF-7 wykrywalne były prążki dla całego białka E-kadheryny, zaś w przypadku linii MDA-MB-231 dla jej zdegradowanej w wyniku aktywności MMP7 formy o masie 40 kDa [222]. Stymulacja komórek MCF-7 za pomocą CM znad CAFs wpłynęła na poziom **E-kadheryny** tylko w przypadku zastosowania CM znad CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą (Rycina 51, 52A i Z11A w Załączniku). Zastosowanie CM znad CAFs stymulowanych 1nM kalcytriolem skutkowało obniżeniem poziomu E-kadheryny w MCF-7 zarówno w porównaniu do stymulacji MCF-7 CM znad CAFs niestymulowanych i w porównaniu do kontroli niestymulowanej MCF-7 (Rycina 52A). Zastosowanie CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o różnych cechach klinicznych nie miało wpływu na poziom **OPN i ZEB1** w MCF-7 (Rycina 51). CM znad CAFs stymulowanych 1nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> zwiększało poziom OPN w komórkach MCF-7 (Rycina 52B). Jednocześnie CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek po menopauzie powodowało wzrost poziomu OPN i ZEB1 w MCF-7 (Rycina 52B i C). Zastosowanie CM znad CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą skutkowało obniżeniem poziomu ZEB1 w MCF-7 (Rycina 52C). Ponadto CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem i stymulowanych 1nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek po menopauzie zwiększyło poziom OPN bardziej niż CM znad CAFs pacjentek przed menopauzą (Rycina 52B). Wykazano natomiast, że CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek po menopauzie zwiększało poziom ZEB1 znacznie bardziej niż CM znad CAFs pacjentek przed menopauzą (Rycina 52C). Nie zaobserwowano wpływu CM znad CAFs pochodzących od pacjentek z pozostałych grup klinicznych na poziom wybranych białek w MCF-7 (Rycina Z11 w Załączniku).



**Rycina 51.** Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem na poziom E-kadheryny, OPN i ZEB1 w lisatach komórek linii MCF-7. Analizowano próbki na następującej wysokości: E-kadheryna: 120 kDa, OPN (osteopontyna): 44 kDa, Zeb1 (homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym): 130 kDa. CAFs stymulowano 72h godziny kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24 godziny, zebrane media kondycjonowane (CM) nałożono na komórki linii MCF-7: CM K – CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem, CM 1nM – stymulowanych 1nM kalcytriolem, CM 10nM – stymulowanych 10nM kalcytriolem. Wyniki normalizowano względem ekspresji  $\beta$ -aktyny i kontroli niestymulowanej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizę wykonano dla 18 CM. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

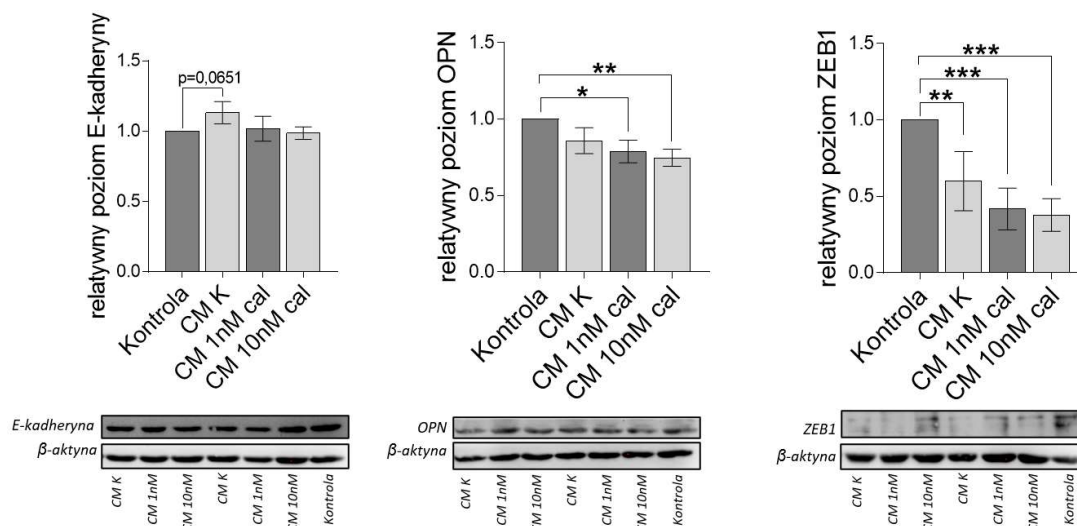


**Rycina 52.** Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na poziom wybranych białek w ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MCF-7. A – E-kadheryna, B - OPN (osteopontyna) i C - ZEB1 (homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym). Zastosowano media kondycjonowane (CM) znad CAFs od pacjentek przed menopauzą ( $n=7$ ), po menopauzie ( $n=9$ ) oraz pacjentek z deficytem ( $n=10$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=6$ ) witaminy  $D_3$ . próbki na następującej wysokości: E-kadheryna: 120 kDa, OPN: 44 kDa, Zeb1: 130 kDa. CAFs stymulowano 72h godziny kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24 godziny, zebrane CM nałożono na komórki linii MCF-7: CM K – CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem, CM 1nM – stymulowanych 1nM kalcytriolem, CM 10nM – stymulowanych 10nM kalcytriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH  $> 25,8$  mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy  $D_3$  –  $25(OH)D_3$  w osoczu:  $25(OH)D_3 < 30$ ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”. Wyniki normalizowano względem ekspresji  $\beta$ -aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. „\*” nad słupkami wskazują na porównanie do kontroli niestymulowanej. \*  $\leq 0,05$ .

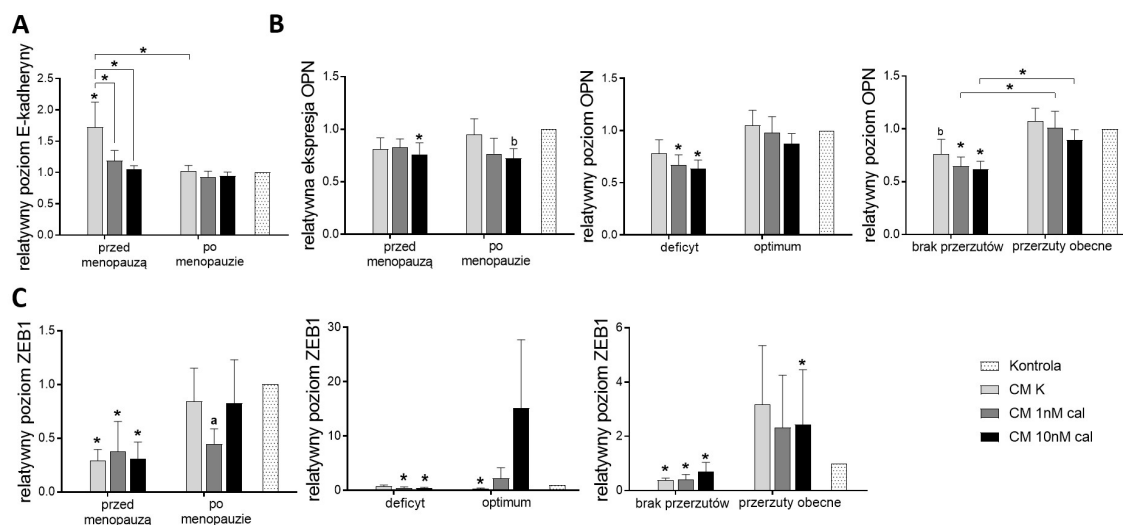
Zastosowanie CM znad CAFs niestymulowanych pochodzących od pacjentek o różnych cechach klinicznych skutkowało zwiększeniem poziomu **E-kadheryny** w komórkach MDA-MB-231 ( $p=0,0651$ , Rycina 53). Taki sam efekt CM znad CAFs zaobserwowano wyłącznie przy zastosowaniu CM znad CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą (Rycina 54A). CM znad CAFs stymulowanych 1nM i 10nM kalcytriolem od pacjentek przed menopauzą obniżyło ekspresję E-kadheryny w porównaniu do CM znad CAFs niestymulowanych (Rycina 54A). Ponadto poziom E-kadheryny był wyższy

w MDA-MB-231 stymulowanych CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek przed menopauzą niż w MDA-MB-231 stymulowanych CM znad CAFs pochodzących od pacjentek po menopauzie (Rycina 54A). Poziom **OPN** w komórkach MDA-MB-231 zmniejszył się po zastosowaniu CM znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o różnych cechach klinicznych (Rycina 53). Taki sam efekt CM znad CAFs zaobserwowano przy zastosowaniu CM znad CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> lub bez przerzutów. CM znad CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek przed menopauzą również obniżyło poziom OPN w komórkach MDA-MB-231 (Rycina 54B). Komórki MDA-MB-231 stymulowane CM znad CAFs inkubowanych z kalcytriolem od pacjentek z nowotworem przerzutującym miały znacznie większy poziom OPN niż MDA-MB-231 stymulowane CM znad CAFs pacjentek bez przerzutów (Rycina 54B). Stymulacja MDA-MB-231 CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o różnych cechach klinicznych skutkowała obniżeniem poziomu **ZEB1** (Rycina 53). Obniżenie poziomu ZEB1 zaobserwowano po stymulacji MDA-MB-231 CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek przed menopauzą lub bez przerzutów, CM znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> oraz CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> również obniżyło poziom ZEB1 w komórkach MDA-MB-231 (Rycina 54C). CM znad CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek z nowotworem przerzutującym zwiększyło poziom ZEB1 w komórkach MDA-MB-231 (Rycina 54C).





**Rycina 53.** Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem na poziom E-kadheryny, OPN i ZEB1 w lisatach komórek linii MDA-MB-231. Analizowano prążki na następującej wysokości: E-kadheryna: 40 kDa, osteopontyna (OPN): 44 kDa, Zeb1 (homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym): 130 kDa. CAFs stymulowano 72h godziny kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24 godziny, zebrane medium kondycjonowane (CM) nałożono na komórki linii MDA-MB-231: CM K – CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem, CM 1nM – stymulowanych 1nM kalcytriolem, CM 10nM – stymulowanych 10nM kalcytriolem. Wyniki normalizowano względem ekspresji β-aktyny i kontroli niestymulowanej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizę wykonano dla 18 CM. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0,001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.



**Rycina 54.** Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na poziom wybranych białek w ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231. A - E-kadheryna, B - OPN (osteopontyna) i D - ZEB1 (homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym). Zastosowano media kondycjonowane (CM) znad CAFs od pacjentek przed menopauzą (n=7), po menopauzie (n=9), pacjentek z deficytem (n=10) i prawidłowym poziomem (n=6) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem nieprzerzutu (n=9) i przerzutu (n=7). Analizowano prążki na następującej wysokości: E-kadheryna: 40 kDa (domena wewnątrzkomórkowa), OPN: 44 kDa, Zeb1: 130 kDa. CAFs stymulowano 72h godziny kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24 godziny, zebrane CM nałożono na komórki linii MDA-MB-231: CM K – CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem, CM 1nM – stymulowanych 1nM kalcytriolem, CM 10nM – stymulowanych 10nM kalcytriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. Wyniki normalizowano względem ekspresji β-aktyny i kontroli niestymulowanej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizę wykonano dla 18 CM. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test T-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. „\*”, „a” lub „b” nad słupkami wskazują na porównanie do kontroli niestymulowanej. „a” p < 0,05. „b” p < 0,08. \* ≤ 0,05.

**PODSUMOWANIE WYNIKÓW**

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania *in vivo* dotyczące aktywności witaminy D<sub>3</sub> i jej aktywnej biologicznie formy - kalcytriolu na CAFs oraz NFs płuc w modelach mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1, 67NR i E0771 wykazały, że:

1. Najwyższy poziom CCL2 i VEGF zanotowano w guzach E0771, OPN i SDF-1 w guzach 4T1. Guzy 4T1 i E0771 cechowały się znacznie wyższym poziomem TGFβ1 niż guzy 67NR.
2. Deficytowi witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy obarczonych komórkami 67NR towarzyszył zwiększony poziom CCL2 i TGFβ1 w guzach. Podawanie kalcytriolu przełożyło się na zmniejszenie poziomu tych białek. Podawanie kalcytriolu u myszy obarczonych komórkami 67NR karmionych dietą z normalną zawartością witaminy D<sub>3</sub> prowadziło do rozwoju guzów o niższym poziomie VEGF niż u myszy z dietą deficytową w witaminę D<sub>3</sub>.
3. Diecie bogatej w witaminę D<sub>3</sub> u myszy obarczonych komórkami E0771 towarzyszyło obniżenie poziomu OPN. Podawanie kalcytriolu myszom z deficytem witaminy D<sub>3</sub> w diecie tych myszy skutkowało obniżonym stężeniem CCL2 w guzach.
4. CAFs różniły się poziomem wybranych białek pomiędzy modelami raka gruczołu sutkowego. CAFs guzów 4T1 posiadały największy poziom TNC, PDGFRβ, najniższy αSMA. W guzach 67NR, CAFs miały najwyższy poziom PDPN.
5. NFs pochodzące od myszy obarczonych różnymi rakami gruczołu sutkowego różniły się poziomem wybranych białek. NFs myszy obarczonych 4T1 posiadały większy poziom PDPN, TNC i PDGFRβ w porównaniu do NFs od myszy obarczonych 67NR i E0771. Poziom αSMA był największy w NFs pochodzących od myszy obarczonych E0771.
6. Zróżnicowana dieta i podawanie kalcytriolu skutkowały zmianą fenotypu CAFs wyłącznie w modelu E0771. Diecie bogatej w witaminę D<sub>3</sub> towarzyszyło obniżenie poziomu αSMA i wzrost poziomu PDPN, TNC i PDGFRβ. Podawanie kalcytriolu myszom karmionym dietą z deficytem witaminy D<sub>3</sub> przekładało się na wzrost poziomu TNC w CAFs, zaś myszom karmionym dietą standardową na obniżenie poziomu αSMA i wzrost poziomu PDPN i TNC.
7. Zróżnicowana dieta i podawanie kalcytriolu skutkowały zmianą fenotypu NFs wyłącznie w modelu 4T1. Diecie bogatej w witaminę D<sub>3</sub> towarzyszyło obniżenie poziomu TNC i PDGFRβ w NFs, zaś diecie deficytowej obniżenie poziomu

wszystkich analizowanych białek. Podania kalcytriolu u myszy z deficytem witaminy D<sub>3</sub> skutkowały wzrostem (w stosunku do 100IU) poziomu  $\alpha$ SMA, PDPN i TNC w NFs.

Badania *ex vivo* na fibroblastach płuc myszy zdrowych stymulowanych TGF $\beta$ 1 i mediami zebranymi z komórek linii 4T1, 67NR i E0771 wykazały, że:

1. NFs pochodzące od myszy szczepu BALB/c i C57BL/6 różniły się poziomem wybranych białek. NFs pochodzące od myszy szczepu BALB/c cechował większy poziom PDPN i TNC oraz mniejszy poziom PDGFR $\beta$  niż NFs pochodzące od myszy szczepu C57BL/6.
2. Zróżnicowana dieta i podawanie kalcytriolu skutkowały wyłącznie zmianą poziomu  $\alpha$ SMA w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c. NFs pochodzące od myszy zdrowych wszystkich grup eksperymentalnych posiadały niższy poziom  $\alpha$ SMA niż NFs od myszy z grupy 1000IU.
3. Stymulacja NFs myszy szczepu BALB/c za pomocą TGF $\beta$ 1 prowadziła do obniżenia poziomu PDPN w NFs myszy z wszystkich grup,  $\alpha$ SMA i TNC w NFs myszy z grupy 1000IU.

Stymulacja NFs medium z komórek 4T1 prowadziła do wzrostu poziomu PDPN w NFs myszy z grup 5000IU i 100IU.

4. Stymulacja NFs za pomocą TGF $\beta$ 1 prowadziła do obniżenia poziomu VDR w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU+cal i od myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU oraz do wzrostu poziomu VDR w NFs myszy z grup 5000IU, 100IU i 100IU+cal pochodzących od myszy obu szczepów.

Stymulacja medium z komórek 4T1 prowadziła do wzrostu poziomu VDR w NFs pochodzących od myszy z grup 5000IU, 100IU i 100IU+cal oraz obniżenia ekspresji VDR w NFs od myszy z grupy 1000IU+cal.

Stymulacja NFs medium z komórek 67NR prowadziła do obniżenia poziomu VDR w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU.

Stymulacja medium z E0771 prowadziła do obniżenia poziomu VDR w NFs myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU.

5. Stymulacja NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c za pomocą TGF $\beta$ 1 prowadziła do wzrostu poziomu FAP w NFs pochodzących od myszy BALB/c z grup 1000IU, 100IU i 100IU+cal oraz NFs myszy C57BL/6 z grup 1000IU, 5000IU, 100IU i 100IU+cal.

Stymulacja medium znad komórek 4T1 prowadziła do obniżenia poziomu FAP w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU i 100IU+cal.

Stymulacja NFs medium znad komórek 67NR prowadziła do wzrostu poziomu FAP w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU i obniżenia poziomu FAP w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU+cal.

Stymulacja medium znad komórek E0771 prowadziła do obniżenia poziomu FAP w NFs myszy ze wszystkich grup.

6. Stymulacja NFs za pomocą TGF $\beta$ 1 prowadziła do wzrostu ekspresji *Acta2* w NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z grup 1000IU i 100IU+cal i myszy szczepu C57BL/6 z grup 1000IU, 100IU i 100IU+cal, wzrostu ekspresji *Mmp9* w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU, obniżenia ekspresji *Spp1* w NFs myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU, obniżenia ekspresji *Vdr* w NFs myszy obu szczepów z grup 1000IU, 100IU i 100IU+cal.

Stymulacja NFs medium znad komórek 4T1 prowadziła do wzrostu ekspresji *Mmp9* w NFs myszy szczepu BALB/c z grup 100IU i 100IU+cal, wzrostu ekspresji *Spp1* w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU, wzrostu ekspresji *Vdr* w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 1000IU.

Stymulacja NFs medium znad komórek 67NR prowadziła do wzrostu ekspresji *Vdr* w NFs myszy szczepu BALB/c z grupy 100IU.

Stymulacja NFs medium znad komórek E0771 prowadziła do wzrostu ekspresji *Acta2* w NFs myszy szczepu C57BL/6 z grupy 100IU+cal oraz obniżenia ekspresji *Spp1* i *Vdr* w NFs myszy szczepu C57BL/6 z grupy 1000IU.

Badania *in vitro* na komórkach 4T1, 67NR i E0771 stymulowanych medium znad NFs płuc myszy zdrowych stymulowanych TGF $\beta$ 1 wykazały, że:

1. CM znad NFs od myszy ze wszystkich grup hamowało proliferację komórek linii 67NR. NFs stymulowane TGF $\beta$ 1 nie miały wpływu na proliferację 67NR. CM znad NFs z grupy 1000IU promuje proliferację E0771, CM znad NFs z grupy 5000IU hamuje ten efekt.
2. CM znad NFs od myszy ze wszystkich grup nie zmieniły zdolności komórek 4T1 do tworzenia kolonii. CM znad NFs od myszy grupy 100IU+cal hamowało potencjał do tworzenia kolonii komórek linii 67NR. Stymulacja komórek 67NR za pomocą CM znad stymulowanych TGF $\beta$ 1 NFs pochodzących od myszy z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> traktowanych kalcytriolem skutkowała zwiększoną ilością kolonii

utworzonych przez 67NR w porównaniu do CM znad stymulowanych TGFβ1 pochodzących od myszy z deficytem cholekalcyferolu w diecie traktowanych kalcytriolem. CM znad stymulowanych TGFβ1 NFs pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 z deficytem witaminy D<sub>3</sub> traktowanych kalcytriolem zwiększyło zdolność E0771 do tworzenia kolonii w porównaniu do CM znad NFs niestymulowanych (p=0,0593). Wyłącznie CM znad NFs niestymulowanych TGFβ1 od myszy z grupy 100IU nie hamowało zdolności do tworzenia kolonii linii komórek E0771 oraz tylko CM znad NFs stymulowanych TGFβ1 od tych samych myszy hamuje klonogenność komórek E0771.

Badania mające na celu porównanie guzów pacjentek o różnych cechach klinicznych wykazały, że:

1. Guzy pacjentek bez przerzutów posiadały większy poziom OPN. Guzy od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> lub bez przerzutów posiadały wyższy poziom TGFβ1.

Badania *ex vivo*, dotyczące wpływu kalcytriolu na ludzkie fibroblasty towarzyszące rakom gruczołu sutkowego od pacjentek o różnych cechach klinicznych wykazały, że:

1. CAFs były wrażliwe na antyproliferacyjne działanie kalcytriolu w zakresie stężeń 10nM-1000nM w przypadku CAFs pochodzących od pacjentek po menopauzie, z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> i niezależnie od obecności przerzutów lub w zakresie stężeń 100nM-1000nM w przypadku CAFs od pacjentek przed menopauzą lub z deficytem witaminy D<sub>3</sub>.
2. Stymulacja kalcytriolem obniżyła poziom PDPN w CAFs, tendencja ta tyczyła się CAFs pochodzących od pacjentek po menopauzie, z deficytem witaminy D<sub>3</sub> lub bez przerzutów.
3. CAFs charakteryzowały się ekspresją VDR i FAP, która nie uległa zmianie po stymulacji komórek kalcytriolem.
4. Dla większości analizowanych hodowli CAFs zaobserwowano stymulowaną kalcytriolem indukcję ekspresji CYP24A1. Do kolejnych etapów badań wyłoniono następujące geny i białka: do analizy ekspresji mRNA za pomocą RT-PCR: *CCL2*, *MMP9*, *PDPN*, *TIMP1*, *TNC*, *SPPI*, *VDR*, (2) do analizy sekrecji białek przy pomocy komercyjnie dostępnych zestawów ELISA: CCL2, CXCL12, HGF, MMP9,

TNC, OPN oraz do analizy ekspresji białek przy pomocy techniki western-blot i zymografii żelatynowej: IDO1, MMP2, MMP9, TIMP1, TGFβ1 i OPN.

5. Stymulacja kalcytriolem CAFs pochodzących od wszystkich pacjentek prowadziła do obniżenia ekspresji mRNA *CCL2*, *MMP9*, *TNC*, *VDR* oraz wzrostu ekspresji mRNA *PDPN*, *SPPI* i *TIMP1*. Ekspresja *CCL2* i *MMP9* zmalała a ekspresja *PDPN*, *TIMP1* i *SPPI* wzrosła również we wszystkich grupach klinicznych CAFs. Po stymulacji 1nM kalcytriolem ekspresja *TNC* zmalała w CAFs pacjentek z przerzutami, a po stymulacji 10nM kalcytriolem ekspresja *TNC* i *VDR* wzrosła. Nie zanotowano zmian w ekspresji *VDR* w CAFs pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub>.
6. Stymulacja kalcytriolem CAFs pochodzących od wszystkich pacjentek prowadziła do obniżenia sekrecji CCL2, CXCL12 i TNC. Produkcja CCL2 była taka sama dla CAFs od pacjentek wszystkich grup klinicznych. W poszczególnych grupach klinicznych pacjentek nie zaobserwowano obniżenia produkcji CXCL12 przez CAFs, natomiast dla CAFs pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> zaobserwowano wzrost produkcji CXCL12 po stymulacji 1nM kalcytriolem. Kalcytriol obniżył sekrecję TNC przez CAFs poza jednym wyjątkiem – CAFs pacjentek po menopauzie stymulowane 10nM kalcytriolem wydzielały więcej TNC. Produkcja MMP9 wzrosła w CAFs pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> po stymulacji 10nM i w CAFs pacjentek bez przerzutów po stymulacji 1nM i 10nM kalcytriolem.
7. Stymulacja kalcytriolem CAFs pochodzących od wszystkich pacjentek prowadziła do zwiększonego poziomu TIMP1 oraz zmniejszonego poziomu IDO1 (10nM). Obniżenie poziomu IDO1 po stymulacji 10nM kalcytriolem było wyraźne dla CAFs pacjentek przed menopauzą lub z deficytem witaminy D<sub>3</sub>. Ekspresja OPN i TGFβ1 uległa obniżeniu po stymulacji 10nM kalcytriolem w CAFs pacjentek z obecnymi przerzutami.
8. Stymulacja kalcytriolem CAFs pochodzących od pacjentek wszystkich grup prowadziła do obniżonej aktywności MMP9 i MMP2. Obniżenie aktywności MMP9 wyraźne było tylko w CAFs pacjentek po menopauzie.

Badania *in vitro* na komórkach linii MCF-7 i MDA-MB-231 stymulowanych medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem wykazały, że:

1. CM znad CAFs stymulowały migrację komórek MCF-7 i MDA-MB-231. Dla komórek MDA-MB-231 efekt ten był widoczny tylko po 3h stymulacji. Stymulowanie

CAFs 10nM kalcytriolem przekładało się na osłabienie migracji MCF-7, efekt ten był wyraźny dla CM znad CAFs pacjentek po menopauzie i bez przerzutów.

2. Stymulacja komórek MCF-7 za pomocą CM znad CAFs stymulowanych 1nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek przed menopauzą prowadziła do obniżenia poziomu E-kadheryny w komórkach. CM znad CAFs stymulowanych 1nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> zwiększało poziom OPN w komórkach MCF-7. Stymulacja komórek MCF-7 za pomocą CM znad CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem prowadziła do obniżenia poziomu ZEB1, zaś CM znad CAFs od pacjentek po menopauzie – zwiększenia poziomu ZEB1.
3. Stymulacja komórek MDA-MB-231 CM znad wszystkich CAFs stymulowanych kalcytriolem obniżała poziom OPN. Inkubacja MDA-MB-231 z CM znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek przed menopauzą skutkowała zmniejszeniem poziomu E-kadheryny (1nM i 10nM) i OPN (10nM) w komórkach. Jednocześnie stymulacja komórek MDA-MB-231 CM znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek bez przerzutów (1nM i 10nM) prowadziła do obniżenia poziomu OPN. CM znad hodowli CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> prowadziło do obniżenia poziomu OPN i ZEB1 w MDA-MB-231. Stymulacja za pomocą CM znad CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem pochodzących od pacjentek z nowotworem przerzutującym prowadziła do zwiększenia poziomu ZEB1 w komórkach MDA-MB-231. Jednocześnie CM znad CAFs niestymulowanych i stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek przed menopauzą lub pacjentek bez przerzutów zmniejszało poziom ZEB1 w komórkach MDA-MB-231.

## DYSKUSJA

Kobiety z rozpoznaniem raka gruczołu sutkowego często mają niski poziom witaminy D<sub>3</sub> określany na podstawie stężenia 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu [58]. Wśród pacjentek biorących udział w badaniach do niniejszej rozprawy doktorskiej aż 70% (90/128) pacjentek miało poziom 25(OH)D<sub>3</sub> niższy niż 30ng/ml, uznany za wartość progową między deficytem a prawidłowym poziomem tego metabolitu, wskazującym na deficyt witaminy D<sub>3</sub> w organizmie [223]. Mimo rozpoznanej *in vitro* przeciwnowotworowej aktywności kalcytriolu, aktywnej biologicznie formy witaminy D<sub>3</sub> (opisanej w rozdziale 3), niektóre badania kliniczne wskazują na zwiększone ryzyko wystąpienia raka gruczołu sutkowego u pacjentów z wysokim poziomem 25(OH)D<sub>3</sub> (75-99ng/ml [53] lub >99ng/ml [55]). Co więcej, do tej pory tylko jedna publikacja opisała wpływ kalcytriolu na CAFs raka gruczołu sutkowego [209]. CAFs aktywnie uczestniczą w progresji nowotworu i w przypadku nowotworów gruczołu sutkowego stanowią najliczniejszą populację komórek w TME [209]. Według *Campos i wsp.* aktywność kalcytriolu w CAFs jest analogiczna do aktywności w komórkach nowotworowych, tj. kalcytriol obniża pronowotworowy charakter CAFs poprzez zmniejszenie ekspresji genów zaangażowanych w proliferację (*NRG1*, *WNT5A*, *PDGFC*) i zwiększenie ekspresji genów modulujących aktywność komórek układu odpornościowego (*NFKBIA* – inhibitor NF-κB α, *TREM-1* – receptor wyzwalający komórek mieloidalnych 1) [209]. Jednocześnie działanie kalcytriolu zostało zaobserwowane dopiero po zastosowaniu wysokiej, niemożliwej do osiągnięcia w organizmie dawki kalcytriolu (100nM). Autorzy nie znaleźli podobnych zależności gdy zastosowali stężenie kalcytriolu zbliżone do osiągalnego fizjologicznie (0,5nM) [209]. W związku z tym, badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej miały na celu scharakteryzowanie wpływu witaminy D<sub>3</sub> i kalcytriolu na CAFs w rakach gruczołu sutkowego w możliwie jak najbliższych fizjologii warunkach. Badania zostały podzielone na dwie części: badania na materiale pochodzącym od myszy oraz badania na materiale pochodzącym od pacjentek. Eksperymenty *in vivo* zostały wykonane z wykorzystaniem trzech dobrze scharakteryzowanych komórek linii mysiego raka gruczołu sutkowego: (1) 4T1 wyprowadzonej z powstałego spontanicznie raka gruczołu sutkowego myszy szczepu BALB/c; (2) 67NR, również od myszy szczepu BALB/c oraz (3) E0771 wyprowadzonej ze spontanicznego raka gruczołu sutkowego myszy szczepu C57BL/6 [213,224,225]. Dzięki współpracy z Centrum Chorób Piersi Dolnośląskiego Centrum Onkologii,



Pulmonologii i Hematologii możliwe było przeprowadzenie drugiej części badań - uzyskane fragmenty tkanki guza gruczołu sutkowego posłużyły izolacji CAFs, które następnie stymulowano *ex vivo* kalcytriolem o stężeniu 1nM (fizjologicznie osiągalne stężenie u pacjentów) i 10nM (najczęściej wykorzystywane w badaniach *in vitro/ex vivo*) [65,226,227]. Wykorzystane w pierwszej części badań komórki linii raka gruczołu sutkowego różnią się między sobą obecnością receptorów ER, PR czy ErbB2/neu (4T1: ER $\alpha$ <sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, ErbB2<sup>-</sup>, 67NR: ER $\alpha$ <sup>+</sup>, PR<sup>-</sup>, ErbB2<sup>-</sup>, E0771: ER $\alpha$ <sup>-</sup>, PR<sup>+</sup>, ErbB2<sup>+</sup>) [212,213], zdolnością do tworzenia przerzutów (67NR – model nieprzerzutujący, E0771 - przerzutujący, 4T1 – silnie przerzutujący) [76,212,228] czy wrażliwością na antyproliferacyjne działanie kalcytriolu (4T1- niewrażliwe, 67NR i E0771– wrażliwe) [75,77]. Ponadto według badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej (prezentowanych w niniejszym manuskrypcie oraz opublikowanych w [229]) mysie guzy powstałe w wyniku ortotopowej inokulacji komórek 4T1, 67NR i E0771 różnią się znacząco między sobą odpowiedzią na witaminę D<sub>3</sub> i kalcytriol *in vivo*. Myszy karmione dietą z normalną, deficytową i nadmiarową zawartością witaminy D<sub>3</sub> zostały zaszczerpione ortotopowo komórkami linii 4T1, 67NR i E0771, gdy w osoczu myszy zaobserwowano znaczące różnice poziomu 25(OH)D<sub>3</sub>. Siedem dni po inokulacji komórek, gdy guzy zaczynały być wyczuwalne, rozpoczęto doustne podawanie kalcytriolu za pomocą specjalnej sondy (1μg/kg masy ciała) [77]. Wszystkie zastosowane schematy diety skutkowały modyfikacją niektórych parametrów przepływu krwi w guzach 4T1 i E0771. Jednakże najwyraźniejszy efekt można było dostrzec w guzach myszy z niedoborem witaminy D<sub>3</sub> w diecie. Taka dieta prowadziła do rozwoju guzów o zwiększonych parametrach przepływu krwi. Zaś podawanie kalcytriolu u myszy karmionych dietą deficytową w witaminę D<sub>3</sub> skutkowało znaczącym obniżeniem większości markerów przepływu krwi [229]. Podawanie kalcytriolu u myszy (4T1) karmionych dietą standardową prowadziło do wzrostu części parametrów przepływu krwi i spadku innych [229]. Zmiany w unaczynieniu guza mogą mieć istotne znaczenie nie tylko w kontekście przerzutowania czy odpowiedzi na chemioterapię [230], zwiększenie przepływu krwi może również wiązać się ze zwiększoną rekrutacją komórek z odległych tkanek, które następnie w odpowiedzi na czynniki produkowane przez guzy mogą ulegać różnicowaniu do różnych populacji komórek TME – w tym CAFs [231]. Zmiany w unaczynieniu guza często tożsame są z modyfikacją poziomu VEGF – induktora i Tsp-1 – inhibitora angiogeny. We wcześniejszych badaniach naszego laboratorium, *Anisiewicz i wsp.* zaobserwowali, że kalcytriol i jego analogi zwiększyły przepływ krwi

w guzach 4T1 [75]. Zaś według *Mantell i wsp.* kalcytriol zmniejszył unaczynienie guzów MCF-7 z nadekspresją VEGF [116]. Z kolei w badaniach *García-Quiroz i wsp.* podawanie myszom kalcytriolu skutkowało obniżeniem produkcji Tsp-1 i zwiększeniem produkcji VEGF w mysich rakach gruczołu sutkowego, ale nie wpłynęło na samą waskularyzację [114]. W badaniach do niniejszej rozprawy doktorskiej ze zmianami w unaczynieniu guza nie wiązały się zmiany stężenia VEGF ani w tkance guza, ani w osoczu myszy obciążonych komórkami 4T1 i E0771 [229]. Jedynie u myszy zaszczipionych komórkami 67NR, u których dieta i podawanie kalcytriolu nie zmieniły przepływu krwi, zaobserwowano zmiany w stężeniu VEGF zarówno w guzie, jak i w osoczu [229]. Co więcej, guzy 4T1, 67NR i E0771 różniły się stężeniem CCL2 i OPN, cytokin zaangażowanych w proces angiogenezy – bezpośrednio [232,233] lub za pośrednictwem rekrutowanych makrofagów (CCL2) [234] lub CAFs (OPN) [235]. Guzy 4T1 charakteryzowały się największym stężeniem OPN, zaś E0771 - CCL2 i VEGF. W guzach 4T1, których cechą jest wysoki potencjał do przerzutowania, zaobserwowano również wysokie stężenie TGFβ1 i SDF-1. Cytokiny te, razem z OPN, są zaangażowane w szereg procesów prowadzących do przerzutowania (m.in. angiogenezę, utratę adhezji, migrację czy inwazję) [236–238]. OPN, TGFβ1, SDF-1 mogą również pośrednio promować przerzutowanie poprzez rekrutację i różnicowanie CAFs [131,140,141,235,239]. Przedstawione wyniki na tym etapie nie są tożsame z wynikami uzyskanymi na tkankach pochodzących od pacjentek - w guzach pacjentek z nowotworem przerzutującym poziom OPN i TGFβ1 był niższy niż w guzach pacjentek bez przerzutów. Zgodnie z obserwacjami *Johnstone i wsp.* 4T1, 67NR i E0771 różnią się również zdolnością do inwazji, aktywnością MMP9 (4T1 największa) czy obecnością ekspresji p53 (4T1, 67NR negatywne) [212]. Guzy o odmiennej charakterystyce, produkujące różne stężenia cytokin mogą stymulować powstawanie zróżnicowanego TME, co wyraźnie odzwierciedlają uzyskane w tej pracy wyniki - CAFs pochodzące z guzów 4T1 cechował najniższy poziom αSMA, największy PDGFRβ i TNC, zaś CAFs z guzów 67NR najwyższy poziom PDPN. Niniejsza rozprawa doktorska miała na celu scharakteryzowanie w jaki sposób witamina D<sub>3</sub> i kalcytriol, w guzach o tak zróżnicowanej charakterystyce wpływają na funkcje komórek mikrośrodowiska, w szczególności CAFs. CAFs odgrywają istotną rolę w procesach angiogenezy, unikania odpowiedzi odpornościowej, inwazji czy przerzutowania [119,134,164,165]. Komórki nowotworowe promują różnicowanie CAFs z rezydualnych fibroblastów [131,235] lub innych komórek, np. rekrutowanych ze szpiku kostnego mezenchymalnych komórek

macierzystych [140,141]. Wzajemne oddziaływania między CAFs i komórkami nowotworowymi prowadzą do progresji raka gruczołu sutkowego [235]. Według wyników niniejszej rozprawy doktorskiej kalcytriol hamował proliferację hCAFs (CAFs pochodzące od pacjentek) *ex vivo* przy stężeniu większym niż 1nM. Podobnych obserwacji dokonali *Gorchs i wsp.* [207] oraz *Sherman i wsp.* [204] dla CAFs raka trzustki – zastosowanie 100nM kalciportiolu, analogu witaminy D<sub>3</sub>, skutkowało zmniejszeniem proliferacji komórek [204,207]. Zaś według *Campos i wsp.* 100nM kalcytriol obniżył w CAFs raka gruczołu sutkowego ekspresję genów związanych z proliferacją [209]. Według obserwacji z niniejszej rozprawy doktorskiej efekt ten jest trudniejszy do osiągnięcia w przypadku hCAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą lub z deficytem witaminy D<sub>3</sub> (zahamowanie proliferacji zaobserwowano dopiero przy stężeniu 100nM). Obniżenie żywotności CAFs może przekładać się na modulację fenotypu i aktywności CAFs. Suplementacja myszy dietą ze zróżnicowaną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i podawanie kalcytriolu zmieniły fenotyp mysich CAFs wyłącznie w przypadku guzów E0771. Według obserwacji *Wang i wsp.* CAFs guza pierwotnego różnią się od fibroblastów obecnych w miejscu przerzutowania [240]. W badaniach niniejszej rozprawy doktorskiej zaobserwowano, że u zdrowych myszy szczepu C57BL/6 ani witamina D<sub>3</sub> w diecie, ani traktowanie kalcytriolem nie stymulowały zmian poziomu białek specyficznych dla CAFs w NFs. Zaś w NFs od zdrowych myszy BALB/c, poziom  $\alpha$ SMA był mniejszy w NFs pochodzących od myszy ze wszystkich grup eksperymentalnych (1000IU+cal, 5000IU, 100IU, 100IU+cal vs 1000IU). Dieta ze zróżnicowaną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i podawanie kalcytriolu nie zmieniły poziomu analizowanych białek również w przypadku NFs myszy obciążonych nieprzerzutującym 67NR i przerzutującym E0771. Z kolei u myszy obciążonych silnie-przerzutującym rakiem 4T1, dla którego stężenie OPN i SDF-1 (wydzielanych przez komórki nowotworowe i stymulujących różnicowanie NFs do miofibroblastów) w tkance guza i w osoczu myszy było największe w porównaniu do guzów modelu 67NR i E0771 [229,235], witamina D<sub>3</sub> i kalcytriol zmodyfikowały fenotyp NFs. W zgodzie z poprzednimi badaniami [75] podawanie kalcytriolu przy diecie normalnej lub ubogiej w witaminę D<sub>3</sub> wiązało się ze zwiększonym przerzutowaniem do płuc [77] oraz oznakami aktywacji obecnych w płucach NFs (wzrost poziomu  $\alpha$ SMA, PDPN i TNC). *Anisiewicz i wsp.* zanotowali, że traktowanie kalcytriolem myszy obciążonych 4T1 nie tylko prowadzi do zwiększonej liczby przerzutów w płucach, skutkuje również zwiększonym odkładaniem depozytów kolagenu w płucach, mogącym świadczyć

o zwiększonej aktywności fibroblastów [75]. W niniejszej rozprawie doktorskiej zmiany poziomu analizowanych białek były wyraźniejsze, gdy myszy karmiono dietą deficytową w witaminę D<sub>3</sub> (dla 100IU+cal: wzrost poziomu  $\alpha$ SMA, PDPN i TNC, dla 1000IU+cal: tylko  $\alpha$ SMA). Oprócz tego zwiększona aktywacja NFs w płucach myszy z grupy 100IU+cal może być wynikiem wzmożonej produkcji IL-6 w tkance guza – cytokiny, która poprzez indukcję szlaku STAT3 może kierować aktywacją NFs [229,241]. Co ciekawe, żadnej z tych zmian nie towarzyszyło zwiększenie poziomu białek typowych dla CAFs czy zmiany stężenia SDF-1, OPN i TGF $\beta$ 1 w tkance guza lub osoczu [229]. Zwiększona aktywacja NFs mogłaby wynikać również ze zwiększonej ekspresji mRNA *Spp1* (kodującego OPN) i *Tgf $\beta$*  w płucach zaobserwowanych w jednym ze wcześniejszych badań naszego laboratorium u myszy traktowanych kalcytriolem podskórnym [111]. Co więcej, w poprzednich badaniach [75] wyższy poziom OPN widoczny był w późniejszych etapach progresji guza 4T1 (dzień 28 i 33) w osoczu myszy otrzymujących iniekcje kalcytriolu. Zaskakująco, zwiększonej podaży witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy (5000IU) towarzyszyło zarówno zwiększenie przerzutowania do płuc [77], jak i obniżenie aktywacji NFs w płucach myszy 4T1 (obniżenie poziomu  $\alpha$ SMA, TNC i PDGFR $\beta$ ). Zmniejszonemu poziomowi analizowanych białek w NFs z grupy 5000IU towarzyszył najwyższy poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>) w osoczu myszy z tej grupy w porównaniu do myszy pozostałych grup eksperymentalnych. Z kolei podawanie kalcytriolu myszom z deficytem witaminy D<sub>3</sub> skutkowało jeszcze większym obniżeniem poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu (25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>) w porównaniu do grupy deficytowej [77]. Co więcej, mimo analogicznych zmian obserwowanych w stężeniu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu zdrowych myszy, [77] w NFs pochodzących od tych myszy zaobserwowano zmiany wyłącznie w poziomie  $\alpha$ SMA. **Na fenotyp NFs pochodzących z miejsc przerzutów raka gruczołu sutkowego 4T1 prawdopodobnie wpływ miały zarówno obecność komórek nowotworowych w miejscu przerzutowania oraz poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy. Komórki nowotworowe mogą wydzielać czynniki aktywujące NFs. Zróżnicowany poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> miał niewielki wpływ na cytokiny wydzielane przez komórki guza pierwotnego ale mógł bezpośrednio modyfikować mikrośrodowisko płuc. Wysoka podaż witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy, której konsekwencją był wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu mogła, mimo obecności komórek nowotworowych w płucach, prowadzić do utworzenia**

**mikrośrodowiska bogatego w czynniki zapobiegające aktywacji NFs. Natomiast podawanie kalcytriolu myszom z deficytem witaminy D<sub>3</sub> prowadzące do jeszcze większego obniżenia poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy mogło uwrażliwić obecne w płucach NFs na cytokiny wydzielane przez komórki guza.**

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, następnym etapem niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie, jak CAFs wpływają na właściwości komórek raka gruczołu sutkowego w zależności od tego, czy pochodzą od myszy z normalnym poziomem, deficytem lub nadmiarem witaminy D<sub>3</sub> w diecie oraz od tego, czy myszy traktowano kalcytriolem. Ze względu na brak wyprowadzonych hodowli mysich CAFs podjęto próbę przekształcenia NFs pochodzących od myszy zdrowych szczepu BALB/c lub C57BL/6 do CAFs za pomocą stymulacji TGFβ1, znanym czynnikiem aktywującym CAFs [220]. Medium kondycjonowanym zebranych z nad aktywowanych TGFβ1 NFs (tNFs) stymulowano komórki linii raka gruczołu sutkowego, te same które wykorzystano w badaniach *in vivo* – 4T1, 67NR i E0771. Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują, że NFs mogą hamować proliferację komórek raka gruczołu sutkowego (67NR) lub ich zdolność do tworzenia kolonii (E0771). Aktywacja NFs za pomocą TGFβ1 skutkowałą wyciszeniem tej przeciwnowotworowej aktywności. Co prawda, przeciwnie do spodziewanych obserwacji, stymulacja komórek 4T1 i 67NR za pomocą CM z nad tNFs pochodzących od myszy z różnych grup eksperymentalnych nie zwiększyła proliferacji komórek nowotworowych ponad kontrolę komórek niestymulowanych. Zatem obserwowane zmiany nie były tak wyraźne, jak w badaniach *Guido i wsp.*, w których stymulowane TGFβ1 fibroblasty zwiększały wzrost komórek raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231 *in vivo* [242] ani jak w pracy *Waver i wsp.*, w której TGFβ1 był wystarczającym czynnikiem różnicującym NFs okężnicy do miofibroblastów - stymulujących migrację komórek raka okężnicy *in vitro* [243]. Co prawda *Casey i wsp.* zanotowali, że stymulacja fibroblastów gruczołu sutkowego pochodzących od zdrowych pacjentów za pomocą TGFβ1 nie zwiększa w nich właściwości promujących inwazję komórek linii MDA-MB-231, dopiero stymulacja CAFs pochodzących z tkanki raka gruczołu sutkowego za pomocą TGFβ1 zwiększa potencjał inwazyjny komórek nowotworowych [244]. Co więcej, efekt CM na 67NR był taki sam niezależnie od jakich myszy pochodziły NFs. W przypadku E0771, CM z nad tNFs pochodzących od myszy z nadmiarem cholekalcyferolu w diecie obniżyło żywotność E0771 w porównaniu do CM z nad tNFs myszy z normalnym poziomem

witaminy D<sub>3</sub> – wskazując na to, że wysokie stężenie metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy szczepu C57BL/6 (wynikające z diety bogatej w cholekalcyferol) prowadzi do rozwoju NFs mniej wrażliwych na czynniki aktywujące, tj. TGFβ. Co więcej, CM znad tNFs nie zwiększało zdolności komórek 4T1, 67NR i E0771 do tworzenia kolonii ponad kontrolę niestymulowaną CM. Jednocześnie CM znad tNFs pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 z deficytem witaminy D<sub>3</sub> traktowanych kalcytriolem zwiększyło zdolność E0771 do tworzenia kolonii w porównaniu do CM znad NFs niestymulowanych. Z kolei stymulacja komórek 67NR za pomocą CM znad tNFs pochodzących od myszy z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> traktowanych kalcytriolem skutkowałą zwiększoną ilością kolonii utworzonych przez 67NR w porównaniu do CM znad tNFs pochodzących od myszy z deficytem cholekalcyferolu w diecie traktowanych kalcytriolem. **Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami, NFs rozwijające się u myszy z wysokim poziomem metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu (będącym rezultatem diety z wysoką zawartością cholekalcyferolu) są mniej wrażliwe na aktywację i nabywanie pronowotworowych właściwości. Świadczy o tym obniżenie tempa proliferacji komórek E0771 stymulowanych medium znad aktywowanych TGFβ1 NFs pochodzących od myszy z wysokim poziomem witaminy D<sub>3</sub> w porównaniu do NFs od myszy z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub>. Z kolei traktowanie myszy z deficytem (obserwacja dla komórek E0771) lub normalnym poziomem (67NR) witaminy D<sub>3</sub> kalcytriolem skutkuje rozwojem NFs, które w obecności czynników aktywujących nabywają zdolności pronowotworowe, na co wskazuje zwiększenie stymulacji tworzenia kolonii przez komórki raka gruczołu sutkowego w obecności mediów kondycjonowanych znad tych NFs.**

Biorąc pod uwagę prawdopodobny wpływ zarówno komórek nowotworowych (4T1 i E0771), jak i witaminy D<sub>3</sub> lub kalcytriolu na fenotyp CAFs lub NFs kolejnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie jak witamina D<sub>3</sub> w diecie myszy zdrowych oraz podawanie kalcytriolu zmieniają aktywację NFs. NFs zdrowych myszy szczepu BALB/c i C57BL/6 różniły się wyjściowym poziomem αSMA, PDPN, TNC i PDGFRβ. NFs myszy szczepu BALB/c charakteryzowała wyższa ekspresja PDPN i TNC oraz niższa PDGFRβ w porównaniu do NFs zdrowych myszy C57BL/6. Co więcej, stężenia metabolitów witaminy D<sub>3</sub>, tj. 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu były niższe u myszy szczepu BALB/c karmionych dietą ze standardową zawartością witaminy D<sub>3</sub> (1000IU, 1000IU+cal) i jej nadmiarem (5000IU)

w porównaniu do myszy szczepu C57BL/6 [77]. Oprócz tego traktowanie kalcytriolem myszy BALB/c z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> lub jej deficytem skutkowało wzrostem stężenia CCL2 w osoczu myszy. Tak, jak i podawanie kalcytriolu myszom z grupy deficytowej wiązało się ze zwiększeniem stężenia OPN w osoczu zarówno u myszy BALB/c, jak i C57BL/6. Natomiast u myszy BALB/c, podawanie kalcytriolu myszom z grupy deficytowej wiązało się również ze wzrostem poziomu IL-6 w osoczu [229]. Zgodnie z piśmiennictwem, zwiększone stężenie OPN, CCL2 i IL-6 w osoczu zdrowych myszy może promować aktywację NFs płuc [131,241]. Według wyników niniejszej rozprawy doktorskiej zwiększona, jak i zmniejszona podaż witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy BALB/c i równoczesne podawanie kalcytriolu prowadziły do rozwoju NFs o niższym poziomie  $\alpha$ SMA. NFs rozwijające się w takim środowisku modulowanym przez witaminę D<sub>3</sub> i kalcytriol zostały poddane stymulacji TGF $\beta$ 1 oraz CM znad komórek nowotworowych (4T1, 67NR i E0771). W przypadku NFs pochodzących od myszy z dietą deficytową i od myszy z dietą deficytową traktowanych kalcytriolem zaobserwowano najwięcej istotnych różnic (poziom wybranych białek w CAFs i NFs myszy obarczonych rakami gruczołu sutkowego czy też poziom FAP w NFs myszy zdrowych stymulowanych TGF $\beta$ 1 lub CM znad komórek nowotworowych). Z tego powodu w NFs pochodzących od myszy z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub>, z deficytem witaminy D<sub>3</sub> i deficytem witaminy D<sub>3</sub> traktowanych kalcytriolem oceniono również ekspresję wybranych mRNA. Niestety aktywacja NFs *ex vivo* nie odzwierciedliła obserwacji dokonanych dla NFs obecnych w płucach myszy obarczonych rakami gruczołu sutkowego. Jednym z przykładów jest to, że stymulacja NFs pochodzących od myszy zdrowych z nadmiarem i deficytem witaminy D<sub>3</sub> przy pomocy CM zebranego znad komórek 4T1 prowadziła do wzrostu poziomu PDPN, a NFs pochodzące od myszy tych samych grup ale obarczonych guzami 4T1 charakteryzowały się niskim poziomem PDPN. Stymulacja NFs za pomocą CM zebranego znad komórek E0771 nie odwzorowała również różnic obserwowanych między CAFs pochodzącymi od myszy różnych grup obarczonych guzami E0771. Eksperymentalne warunki *ex vivo* miały ograniczoną liczbę składowych i nie odzwierciedliły panujących wewnątrz organizmu warunków, gdzie na końcowy fenotyp CAFs ma wpływ wiele czynników tj. interakcje między CAFs a komórkami nowotworowymi i innymi komórkami TME np. TAMs [245]. Co więcej, Jones *i wsp.* oraz Guo *i wsp.* zanotowali, że do zależnej od TGF $\beta$  aktywacji fibroblastów płuc niezbędna jest aktywność deacetylazy histonów [246,247]. Zaś Bordignon *i wsp.* wykazał, że stymulacja fibroblastów za pomocą TGF $\beta$  skutkuje zwiększeniem ekspresji

wielu genów zaangażowanych w pronowotworową aktywność CAFs, między innymi tych uczestniczących w procesie EMT, ale jednocześnie obniża też ekspresję genów zaangażowanych w inne ważne funkcje CAFs – przebudowę ECM czy infiltrację komórek odpornościowych [248]. Ponadto w badaniach niniejszej rozprawy doktorskiej niczym niestymulowane NFs posiadały ekspresję FAP, glikoproteiny o aktywności proteolitycznej, której poziom w zdrowej stromie powinien być niski i rosnąć w procesach gojenia się ran czy rozwoju guza – aktywacji NFs. Świadczyć to może o częściowej aktywacji NFs w warunkach hodowli *ex vivo*, niezależnej od TGF $\beta$ , zaobserwowanej również przez innych autorów [249]. Według licznych publikacji, TGF $\beta$  jest czynnikiem wydzielanym intensywnie przez komórki nowotworowe i pełni kluczową rolę w procesie różnicowania fibroblastów lub komórek macierzystych do miofibroblastów lub CAFs [141,220,246,247]. *Bordignon i wsp.* oraz *Yoon i wsp.* zaobserwowali, że stymulacja fibroblastów skóry lub fibroblastów żołądka za pomocą TGF $\beta$ 1 zwiększa w nich poziom TNC [220,248]. Poza tym według pracy *Waver i wsp.* aktywowane TGF $\beta$ 1 fibroblasty okrężnicy zwiększały produkcję TNC uczestniczącej w inwazji komórek nowotworowych [243]. W niniejszej rozprawie doktorskiej, TGF $\beta$ 1 oraz medium znad 4T1, które prawdopodobnie zawiera ten czynnik wzrostu, wywarły odwrotny efekt – obniżały poziom TNC w NFs. Co więcej - efekt ten obserwowano wyłącznie w przypadku NFs pochodzących od myszy BALB/c z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> w diecie. TGF $\beta$ 1 i CM znad 4T1 obniżyły również poziom PDGFR $\beta$  w NFs pochodzących od myszy z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub>. W pracy *Casey i wsp.* stymulacja NFs za pomocą TGF $\beta$ 1 skutkowała wzrostem ekspresji mRNA *ACTA2*, co również zostało zaobserwowane w badaniach niniejszej rozprawy doktorskiej [244]. Jednocześnie poziom  $\alpha$ SMA (białka kodowanego przez ten gen) w wyniku stymulacji NFs za pomocą TGF $\beta$ 1 uległ obniżeniu. W NFs pochodzących od myszy zdrowych z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> stymulacja TGF $\beta$ 1 lub CM znad 4T1 wiązała się zarówno z obniżeniem poziomu  $\alpha$ SMA, PDPN (CM znad 4T1), TNC, PDGFR $\beta$  (TGF $\beta$ 1 i CM znad 4T1), jak i ze wzrostem poziomu FAP. Takie zmiany fenotypu sugerują powstawanie odmiennego podtypu NFs, aczkolwiek zgodnie z aktualną literaturą, wysoki poziom FAP zwykle występuje wspólnie z  $\alpha$ SMA i PDGFR $\beta$  [172,250]. W NFs myszy z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> w diecie traktowanych kalcytriolem poziom FAP był znacznie niższy niż w NFs myszy nietraktowanych kalcytriolem, jednak zmianom tym nie towarzyszyły zmiany poziomu pozostałych białek ( $\alpha$ SMA, PDPN, TNC, PDGFR $\beta$ ). TGF $\beta$ 1 zmniejszał poziom PDPN w NFs pochodzących od myszy ze



wszystkich grup. *Gorchs i wsp.* zaobserwowali z kolei wzrost PDPN po stymulacji fibroblastów analogiem witaminy D<sub>3</sub> – kalcypotriolem [207]. Obserwacje tego autora częściowo pokrywają się z obserwacjami niniejszej rozprawy doktorskiej - wzrostem poziomu tego białka w NFs pochodzących od myszy z nadmiarem witaminy D<sub>3</sub> w diecie stymulowanych medium zebranych znad komórek 4T1. Stymulacja TGFβ1 lub CM znad komórek nowotworowych wywierała zróżnicowany efekt na aktywację i właściwości NFs. Ponadto zastosowane warunki aktywacji NFs zwykle nie prowadziły do istotnie różnych reakcji NFs pochodzących od myszy z deficytem, normalnym poziomem lub nadmiarem cholekalcyferolu w diecie nietraktowanych lub traktowanych kalcytriolem. Celem podsumowania wyników obserwowane zmiany zebrano w tabeli 17 i 18.

**Tabela 17. Podsumowanie wyników dla fibroblastów płuc myszy zdrowych stymulowanych TGFβ1 i medium znad komórek nowotworowych. Dane dotyczą porównania wobec komórek niestymulowanych.**

NFs zdrowych myszy BALB/c (vs kontrola niestymulowana)				NFs zdrowych myszy C57BL/6 (vs kontrola niestymulowana)		
	TGFβ1	4T1	67NR		TGFβ1	E0771
<b>1000IU</b>	↓αSMA ↓PDPN ↓PDGFRβ ↓TNC ↑FAP ↑Acta2 ↓Vdr	↓PDGFRβ ↓TNC ↑FAP ↑Spp1 ↑Vdr	-	<b>1000IU</b>	↓VDR ↑FAP ↑Acta2 ↓Spp1 ↓Vdr	↓VDR ↓Spp1 ↓Vdr
<b>1000IU + cal</b>	↓PDPN ↓VDR	↓VDR	↓VDR	<b>1000IU + cal</b>	-	↑FAP
<b>5000IU</b>	↓PDPN ↑VDR	↑PDPN ↑VDR ↓FAP	-	<b>5000IU</b>	↑VDR ↑FAP	↓FAP
<b>100IU</b>	↓PDPN ↑VDR ↑FAP ↑Mmp9 ↓Vdr	↑PDPN ↑VDR ↓FAP ↑Mmp9	↑FAP ↑Vdr	<b>100IU</b>	↑VDR ↑FAP ↑Acta2 ↓Vdr	↓FAP
<b>100IU + cal</b>	↓PDPN ↑VDR ↓FAP ↑Acta2 ↓Vdr	↑VDR ↓FAP ↑Mmp9	↓FAP	<b>100IU + cal</b>	↑VDR ↑FAP ↑Acta2 ↓Vdr	↓FAP ↑Acta2

Najciekawsze efekty stymulacji zaobserwowano w przypadku NFs pochodzących od myszy z deficytem witaminy D<sub>3</sub> nietraktowanych lub traktowanych kalcytriolem. W NFs pochodzących od myszy szczepu BALB/c z dietą ubogą w witaminę D<sub>3</sub> TGFβ1 indukował ekspresję *Mmp9* (100IU) i zwiększał poziom FAP (100IU i 100IU+cal). CM znad 4T1 również indukowało ekspresję *Mmp9* w tej grupie myszy, aczkolwiek wpływ CM znad 4T1 lub E0771 na poziom FAP był przeciwny, stymulacja obniżyła poziom FAP w NF z grupy 100IU i 100IU+cal. Według *Timms i wsp.* najwyższy poziom krążącego MMP9 występował u pacjentów z deficytem witaminy D<sub>3</sub> [251], podobnie według *Wasse i wsp.* jego stężenie korelowało odwrotnie z poziomem metabolitów witaminy D<sub>3</sub> osoczu [252]. Dodatkowo według *Kim i wsp.* kalcytriol obniżał produkcję

MMP9 zarówno bezpośrednio, jak i poprzez zwiększenie aktywności inhibitorów MMP9 – TIMP1 i TIMP2 [253].

**Tabela 18.** Podsumowanie wyników dla fibroblastów płuc myszy zdrowych stymulowanych TGFβ1 i medium znad komórek nowotworowych. Dane dotyczą porównania wobec fibroblastów myszy z grupy 1000IU.

NFs zdrowych myszy BALB/c (vs 1000IU)					NFs zdrowych myszy C57BL/6 (vs 1000IU)			
	K	TGFβ1	4T1	67NR		K	TGFβ1	E0771
<b>1000IU+cal</b>	↓αSMA ↑VDR ↑FAP	↑VDR ↓FAP	↓FAP	↑VDR ↑FAP	<b>1000IU+cal</b>	↓VDR	↓VDR ↓FAP	↓VDR ↓FAP
<b>5000IU</b>	↓αSMA ↓VDR ↑FAP	↑VDR	-	↓VDR ↓FAP	<b>5000IU</b>	↓VDR ↑FAP	↑VDR ↑FAP	↓VDR ↑FAP
<b>100IU</b>	↓αSMA ↓VDR ↑FAP	↓VDR ↑ <i>Spp1</i> ↑ <i>Vdr</i>	↓VDR ↓FAP	↓VDR ↑FAP ↑ <i>Vdr</i>	<b>100IU</b>	↓VDR	↓VDR	↓VDR ↑ <i>Mmp9</i> ↑ <i>Spp1</i>
<b>100IU + cal</b>	↓αSMA ↓VDR	-	↓FAP	↓VDR ↑ <i>Spp1</i> ↑ <i>Vdr</i>	<b>100IU + cal</b>	↓VDR ↓FAP	↑ <i>Spp1</i> ↑ <i>Vdr</i>	↑ <i>Acta2</i> ↑ <i>Spp1</i> ↑ <i>Vdr</i> ↓VDR ↓FAP
<b>100IU + cal vs 100IU</b>	↑VDR ↑FAP	↑VDR	↑VDR	↑VDR ↓FAP	<b>100IU + cal vs 100IU</b>	↑VDR ↓FAP	↑VDR ↓FAP ↓ <i>Acta2</i>	↑VDR ↓FAP ↑ <i>Acta2</i>

Stymulacja TGFβ1 lub CM znad E0771 skutkowała znacznie wyższą ekspresją *Spp1* w NFs pochodzących od myszy z deficytem witaminy D<sub>3</sub> (100IU i 100IU+cal) niż w NFs od myszy z grupy 1000IU. Traktowanie kalcytriolem myszy z grup deficytowych skutkowało zwiększoną ekspresją *Spp1* (w stosunku do 100IU) w NFs stymulowanych TGFβ1 oraz CM znad E0771. Podobnie poprzednie badania wskazały, że kalcytriol *in vitro* wzmacnia sekrecję OPN przez fibroblasty BALB/3T3 [112]. Stymulacja kalcytriolem hCAFs również skutkowała zwiększoną ekspresją mRNA *SPPI*. Analogiczny efekt był obserwowany również przez innych autorów [121] i zależy prawdopodobnie od interakcji genu *Spp1* z VDR [254]. Według wielu publikacji zarówno NFs, jak i CAFs posiadają ekspresję funkcjonalnego VDR [121,207,209]. Ekspresja niektórych genów CAFs (wzrost ekspresji *CD82* i spadek *S100A4*) koreluje z poziomem VDR oraz współczynnikiem przeżycia całkowitego [121]. W niniejszej rozprawie doktorskiej NFs stymulowane TGFβ1 lub CM znad komórek raka gruczołu sutkowego również posiadały ekspresję VDR zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. W przypadku NFs pochodzących od myszy szczepu C57BL/6 stymulowanych CM znad E0771 ekspresja mRNA *Vdr* była największa w NFs od myszy z grupy 100IU+cal, gdzie również ekspresja *Spp1* była najwyższa. Aczkolwiek poziom białka VDR w tej grupie

był niższy niż w NFs pochodzących od myszy z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> w diecie. Poziom VDR w aktywowanych NFs nie oddawał obserwowanych w osoczu efektów suplementacji (+cal lub 5000IU)/deficytu (100IU) witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy. Tak samo poziom VDR w całej tkance guza nie korelował z poziomem metabolitów witaminy D<sub>3</sub> [77]. Ponadto najwięcej oznak aktywacji CAFs zaobserwowano w NFs pochodzących od myszy BALB/c i C57BL/6 z deficytem witaminy D<sub>3</sub> stymulowanych TGFβ1 lub CM znad 4T1. Aktywowane NFs cechowały się zwiększonym poziomem PDPN, *Mmp9* (stymulacja NFs myszy szczepu BALB/c za pomocą CM znad komórek 4T1), FAP, *Mmp9* (tNFs myszy szczepu BALB/c) lub *Acta2* i FAP (tNFs myszy szczepu C57BL/6). **Mimo że publikacje wskazują na hamowanie aktywacji fibroblastów przez witaminę D<sub>3</sub> lub kalcytriol, w badaniach do tej pracy nie zaobserwowano tak jednoznacznego efektu. Aktywowane *ex vivo* NFs pochodzące od myszy z nadmiarem, normalną i deficytową zawartością witaminy D<sub>3</sub> w diecie oraz traktowanych kalcytriolem cechowały się zarówno zwiększeniem, jak i zmniejszeniem poziomu białek związanych z pronowotworowymi właściwościami fibroblastów. Najbardziej wrażliwe na aktywację w wyniku stymulacji TGFβ1 lub CM znad komórek nowotworowych były NFs pochodzące od myszy BALB/c i C57BL/6 z deficytem witaminy D<sub>3</sub>.**

Obniżenie poziomu najczęściej opisywanego markera aktywacji CAFs - αSMA [255] w CAFs było widoczne u myszy obarczonych komórkami E0771 i 67NR ze zwiększoną podażą witaminy D<sub>3</sub> w diecie. Zmiana ta mogła wynikać ze zwiększonej ilości metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy (25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>) i obniżonej produkcji OPN w tkance guza (E0771) – cytokiny ważnej w indukcji różnicowania fibroblastów lub komórek macierzystych do CAFs [131,140,235]. Nie tylko zwiększona podaż witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy ale i traktowanie kalcytriolem myszy karmionych dietą z normalną zawartością cholekalcyferolu skutkowało obniżeniem poziomu αSMA w CAFs pochodzących z guzów E0771. Taki efekt kalcytriolu został również zaobserwowany przez *Mukai i wsp.* w przypadku PSCs, prekursorów CAFs w raku trzustki (obniżenie poziomu αSMA) [206]. Co więcej, w pracy *Sherman i wsp.* podawanie analogu witaminy D<sub>3</sub> – kalcyportiolu - zmniejszało aktywację stromy oraz progresję procesu włóknienia w raku trzustki [204]. Jednakże w badaniach niniejszej rozprawy doktorskiej zmniejszeniu poziomu αSMA w CAFs pochodzących od myszy obarczonych rakiem E0771 z grup

1000IU+cal, 5000IU vs 1000IU towarzyszył wzrost poziomu innych markerów aktywacji CAFs - TNC, PDGFR $\beta$  i PDPN. W przypadku hCAFów wpływ kalcytriolu na poziom białek specyficznych dla CAFów również nie był jednoznaczny. Zarówno w hCAFach pacjentek z deficytem, jak i prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> oraz w CAFach pochodzących od pacjentek z pozostałych grup klinicznych stymulacja hCAFów kalcytriolem zwiększała w nich ekspresję mRNA *PDPN* i zmniejszała mRNA *TNC*. Poziom białka TNC na powierzchni CAFów nie zmniejszył się pod wpływem stymulacji kalcytriolem, obniżeniu uległa natomiast produkcja tego białka przez CAFy pochodzące od pacjentek z prawie wszystkich grup klinicznych – z wyłączeniem CAFów pacjentek po menopauzie, dla których stymulacja *ex vivo* kalcytriolem (10nM) prowadziła do wzrostu sekrecji TNC. Poziom białka PDPN uległ zwiększeniu tylko w CAFach pacjentek po menopauzie lub CAFach pacjentek bez przerzutów. W CAFach od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> zaobserwowano jedynie nieistotny statystycznie wzrost poziomu PDPN ( $p < 0,08$ ). Zaskakująco, mimo analogicznego wpływu diety bogatej w witaminę D<sub>3</sub> i traktowania kalcytriolem myszy obciążonych guzami E0771 karmionych dietą o normalnej zawartości witaminy D<sub>3</sub> na fenotyp CAFów, myszy z tych grup nie charakteryzowały się podobnym stężeniem metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu. Wysoka podaż witaminy D<sub>3</sub> w diecie myszy prowadziła do zwiększenia poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> a podawanie kalcytriolu myszom z normalnym poziomem witaminy D<sub>3</sub> skutkowało obniżeniem poziomu 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> [77]. Zatem efekt obserwowany w CAFach może zależeć nie tylko od zmian w poziomie metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy ale również od bezpośredniej aktywności kalcytriolu. Zmiany poziomu analizowanych białek w CAFach będące rezultatem zmian w poziomie metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu oraz podawania myszom kalcytriolu mogą prowadzić do rozwoju różnych podtypów CAFów – CAFów E0771 o niskiej ekspresji  $\alpha$ SMA i wysokiej TNC, PDPN i PDGFR $\beta$  (1000IU+cal, 5000IU), NFs aktywowanych w płucach myszy obciążonych guzem 4T1 o wysokiej ekspresji  $\alpha$ SMA, PDPN i TNC (100IU+cal) oraz hCAFów o wysokiej ekspresji PDPN (stymulowane kalcytriolem CAFy pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub>). W przypadku myszy obciążonych guzami 4T1 ani dieta zawierająca zróżnicowaną ilość witaminy D<sub>3</sub>, ani podawanie kalcytriolu nie wpłynęły na fenotyp CAFów. Kilku autorów podjęło się scharakteryzowania zróżnicowanych funkcjonalnie podtypów CAFów raka gruczołu sutkowego. *Costa i wsp.* wyodrębnili 4 populacje CAFów (CAF-S1, CAF-S2, CAF-S3, CAF-S4) o odmiennej ekspresji  $\alpha$ SMA, CD29, FAP, integryny  $\beta$ 1, FSP1, PDGFR $\beta$  i CAV1 [172]. CAF-S1

charakteryzowały się ekspresją wszystkich, poza CAV1, białek i jako jedyne posiadały ekspresję FAP. CAF-S4, poza ekspresją FAP, cechował ten sam zestaw białek. Oba te podtypy CAFs posiadały ekspresję  $\alpha$ SMA i można było je określić mianem miofibroblastów. Ponadto FAP<sup>+</sup> CAF-S1, w porównaniu do CAF-S4, charakteryzowały się większą produkcją cytokin, rekrutacją limfocytów T i ich różnicowaniem w kierunku T<sub>reg</sub> o działaniu immunosupresyjnym [172]. Z kolei *Friedman i wsp.* podzielili CAFs na sCAFs i pCAFs charakteryzujące się odpowiednio ekspresją FSP1/S100A4 (sCAFs) lub PDPN (pCAFs). sCAFs cechowały się ekspresją MHC klasy II i prozapalnym fenotypem, zaś pCAFs ekspresją  $\alpha$ SMA i charakterem miofibroblastów. Ponadto stosunek sCAFs/pCAFs powiązано z lepszym rokowaniem pacjentów z TNBC [256]. *Cremasco i wsp.* stwierdzili rozdzielność populacji CAFs FAP<sup>+</sup> PDPN<sup>+</sup> i CAFs FAP<sup>+</sup>PDPN<sup>-</sup> [257]. Komórki PDPN<sup>+</sup> w porównaniu do PDPN<sup>-</sup> CAFs, poza wyższą ekspresją genów zaangażowanych w aktywację fibroblastów i przebudowę ECM, regulowały migrację i funkcje limfocytów naciekających tkankę guza prowadząc do stanu immunosupresji [257]. **Zmiany w poziomie metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu, podawanie kalcytriolu *in vivo* lub stymulacja kalcytriolem *ex vivo* mogą prowadzić do powstawania CAFs o zmienionym fenotypie. Efekt końcowy działania kalcytriolu lub witaminy D<sub>3</sub> może wynikać z charakterystyki mikrośrodowiska: podstawowego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w organizmie (norma/deficyt), tak, jak i charakterystyki klinicznej pacjentek/modelu myszy. Co więcej, zarówno wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy tak, jak i dostarczanie kalcytriolu do organizmu, w którym już rozwinął się rak gruczołu sutkowego może skutkować rozwojem CAFs o tym samym fenotypie, świadczącym o zwiększonej aktywacji CAFs.**

Wcześniejsze badania wskazały, że stymulacja kalcytriolem *in vitro* komórek przyzębia, w skład których wchodzi fibroblasty, skutkuje zwiększeniem ekspresji *SPPI* [258]. Zwiększony poziom  $\alpha$ SMA w NFs płuc pochodzących od myszy obciążonych guzem 4T1 traktowanych kalcytriolem (4T1, 100IU+cal) może promować wzrost raka gruczołu sutkowego poprzez sekrecję OPN [259]. Również w niniejszej rozprawie doktorskiej oraz w zgodzie z wynikami pracy *Campos i wsp.* [209] (pracujących również na CAFs raka gruczołu sutkowego), stymulacja kalcytriolem skutkowała zwiększoną ekspresją mRNA *SPPI* i *PDPN* w hCAFs. Jednocześnie wzrost ekspresji *SPPI* widoczny był wyłącznie na poziomie mRNA. CAFs (E0771, 1000IU+cal, 5000IU) z wysokim poziomem PDPN mogą ułatwiać migrację i inwazję komórkom gruczolaka płuc i raka trzustki

prawdopodobnie poprzez aktywację kaskady sygnału Wnt/ $\beta$ -katenina odpowiedzialnej za proliferację, migrację i inwazję komórek nowotworowych [260–263]. W przypadku raka gruczołu sutkowego, autorzy nie są zgodni. Według *Niemiec i wsp.* CAFs PDPN<sup>+</sup> wspomagają migrację komórek nowotworowych do miejsc przerzutowania [264]. Z kolei *Suchański i wsp.* w swojej pracy twierdzili, że podoplanina obecna na powierzchni CAFs nie zmienia tempa migracji komórek raka gruczołu sutkowego [265]. TNC produkowana przez CAFs (E0771, 1000IU+cal, 5000IU), które mogą migrować do miejsca przerzutowania oraz przez aktywowane NFs obecne w miejscu powstawania przerzutów (4T1, 100IU+cal) może aktywować w komórkach nowotworowych szlaki Notch i Wnt chroniąc komórki nowotworowe przed apoptozą i wspierając ich kolonizację [148,266,267]. Co więcej, TNC może promować produkcję MMP2 i MMP9 przez komórki nowotworowe oraz stymulować ich proliferację, migrację, inwazję i neowaskularyzację guza [268]. MMP2 i MMP9 modulują równowagę między pro- i antyangiogennymi czynnikami w TME. Degradując ECM, MMP2 i MMP9 mogą uwalniać bFGF, VEGF i TGF $\beta$  indukując w ten sposób angiogenezę i inwazję [269–271]. Wspominane procesy - promocja przeżycia, zwiększona proliferacja, migracja, inwazja czy EMT komórek nowotworowych oraz neowaskularyzacja guza są krytyczne dla progresji guza i powstawania przerzutów [236]. Aczkolwiek, mimo że u myszy obarczonych guzami 4T1 dieta bogata w witaminę D<sub>3</sub> oraz podawanie kalcytriolu skutkowało zwiększeniem ilości przerzutów w płucach, nie zaobserwowano zmian poziomu białek specyficznych dla CAFs. **Wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu, będący wynikiem diety bogatej w cholekalcyferol oraz traktowanie kalcytriolem myszy z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> mogą prowadzić do rozwoju CAFs o fenotypie promującym proces przerzutowania.**

W wyniku aktywacji (zwiększonego poziomu  $\alpha$ SMA), NFs (4T1, 100IU+cal) dzięki wydzielanym chemokinom (CCL2, CXCL12 lub CXCL16) mogą rekrutować monocyty/makrofagi lub neutrofile do TME i stymulować ich polaryzację w kierunku TAMs, neutrofile towarzyszących nowotworom lub MDSC. Mogą również rekrutować limfocyty T<sub>reg</sub> oraz kierować różnicowanie limfocytów T do Th<sub>2</sub> [183,272–274]. Z kolei cytokiny produkowane przez TAMs i MDSCs mogą hamować infiltrację limfocytów T, aktywować immunosupresyjne limfocyty T<sub>reg</sub>, regulować komórki dendrytyczne i komórki NK oraz promować przesunięcie odpowiedzi typu Th<sub>1</sub> do Th<sub>2</sub> [273–275]. TNC<sup>+</sup> CAFs lub PDPN<sup>+</sup> CAFs mogą uczestniczyć w rekrutacji monocytów/makrofagów

[276,277] tak, jak i sama TNC może utrudniać aktywację limfocytów T zależną od receptora komórek T, proliferację komórek T i produkcję cytokin [278]. Poza stymulacją ekspresji PDPN i TNC w NFs płuc myszy obciążonych guzami 4T1 (jako konsekwencji diety z deficytem witaminy D<sub>3</sub> i podawania kalcytriolu), zwiększony poziom PDPN obserwowano w hCAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących z guzów pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub>, zaś zwiększoną produkcję TNC przez hCAFs pacjentek po menopauzie lub z nowotworem przerzutującym. W hCAFs pozostałych grup pacjentek, poziom i sekrecja TNC uległy obniżeniu w wyniku stymulacji kalcytriolem. Stymulacja kalcytriolem skutkowała również obniżeniem sekrecji CCL2 i CXCL12 w hCAFs. W wyniku działania 10nM kalcytriolu na hCAFs pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> lub pacjentek przed menopauzą obniżeniu uległ poziom IDO1, enzymu katalizującego pierwszą reakcję rozpadu tryptofanu [279]. W CAFs pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> i CAFs pacjentek z przerzutami obserwuje się przeciwną tendencję, aczkolwiek nieistotną statystycznie i wyłącznie przy zastosowaniu 1nM kalcytriolu. Niedobór tryptofanu oraz powstające w wyniku jego rozpadu kinureny (Kyn) mogą prowadzić do uszkodzenia funkcji limfocytów T, apoptozy limfocytów T cytotoksycznych oraz do różnicowania komórek T do limfocytów T<sub>reg</sub> [279–281].

W wyniku stymulacji kalcytriolem niektóre CAFs wykazywały obniżony poziom i aktywność MMP2 i MMP9, które poprzez uwalnianie aktywnej formy TGFβ, uczestniczą w hamowaniu przeciwnowotworowej aktywności limfocytów T [282]. Ponadto MMP9 może usuwać z powierzchni limfocytów receptor dla IL-2, hamując w ten sposób proliferację limfocytów T [283]. Obniżenie aktywności MMP2 zostało zaobserwowane we wszystkich podgrupach CAFs, z kolei w przypadku MMP9 obserwuje się tylko obniżenie jego ekspresji na poziomie mRNA. Aktywność MMP9 zmalała w wyniku stymulacji kalcytriolem tylko hCAFs pacjentek po menopauzie. Zaś w CAFs pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> sekrecja MMP9 wzrosła po stymulacji kalcytriolem.

Analogicznie do wyników niniejszej rozprawy, *Ferrer-Mayorga i wsp.* [121] opisali zależne od kalcytriolu zahamowanie ekspresji *CCL2* w CAFs raka okrężnicy. Aczkolwiek *Gorchs i wsp.* [207] zaobserwował, że kalcytriol w modelu raka trzustki działa immunosupresyjnie na limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, a działanie to wyraźnie ulega pogłębieniu w obecności CAFs. Co więcej, w poprzednich badaniach podskórne iniekcje kalcytriolu u myszy obciążonych 4T1 (na diecie ze standardową zawartością witaminy D<sub>3</sub>) skutkowały zwiększonym odsetkiem monocytów we krwi [111] oraz wzrostem

stosunku prozapalnych ( $\text{LyC6}^{\text{high}}\text{CXCR1}^{\text{low}}\text{CCR2}^+$ ) do przeciwzapalnych ( $\text{LyC6}^{\text{low}}\text{CXCR1}^{\text{high}}$ ) monocytów śledziona [112]. Podania kalcytriolu u myszy zaszczerpionych komórkami 4T1 skutkowało zwiększoną odpowiedzią typu  $\text{T}_{\text{H}2}$  i  $\text{T}_{\text{reg}}$  w śledzionie i obniżeniem odsetka limfocytów  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  we krwi i tkance guza [78,111]. Ponadto poprzednie badania *ex vivo* potwierdziły, że CM znad 4T1 wzmacnia indukowaną kalcytriolem polaryzację makrofagów M2 [113]. Zwiększenie udziału w TME komórek immunosupresyjnych (TAMs, neutrofile towarzyszące nowotworom, MDSCs, limfocyty  $\text{T}_{\text{reg}}$ ), przesunięcie odpowiedzi w kierunku limfocytów  $\text{T}_{\text{H}2}$ , hamowanie funkcji efektorowych komórek cytotoksycznych (limfocyty T  $\text{CD8}^+$ , NK) i apoptoza limfocytów umożliwiają komórkom nowotworowym uniknięcie przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej gospodarza oraz promują powstawanie immunosupresyjnego, korzystnego dla progresji guza mikrośrodowiska poprzez wpływ na angiogenezę, inwazję czy formowanie się niszy przedmetastatycznej [284]. Zwiększona ekspresja TNC i PDPN w CAFs i w aktywowanych NFs pochodzących od myszy z normalnym (CAF<sub>s</sub>, E0771) lub deficytowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> (NFs, 4T1) traktowanych kalcytriolem sugeruje, że kalcytriol niezależnie od poziomu witaminy D<sub>3</sub> w organizmie promuje immunosupresję kierowaną przez fibroblasty. Co więcej, wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy również promuje immunosupresyjną aktywność CAFs (u myszy obciążonych komórkami E0771). Jednocześnie w przypadku hCAF<sub>s</sub> kalcytriol wywierał zróżnicowany efekt. W CAF<sub>s</sub> pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> zaobserwowano promocję immunosupresji przez kalcytriol poprzez zwiększenie poziomu PDPN i CXCL12 w hCAF<sub>s</sub> oraz jej hamowanie poprzez obniżenie produkcji TNC, IDO1, ekspresji mRNA *MMP9* i aktywności MMP2. Zaś w CAF<sub>s</sub> pochodzących od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> kalcytriol zwiększał poziom IDO1 i sekrecję MMP9 (ale obniżał ekspresję mRNA *MMP9*) oraz zmniejszał aktywność MMP2 i poziom CCL2 i TNC. W pozostałych podgrupach hCAF<sub>s</sub>, pochodzących od pacjentek przed i po menopauzie oraz pacjentek bez przerzutów i pacjentek z obecnymi przerzutami, stymulacja komórek kalcytriolem skutkuje osłabieniem immunosupresyjnych właściwości CAF<sub>s</sub>. **Poprzez zmiany w poziomie PDPN, TNC, MMP2 i MMP9, CCL2, CXCL12 oraz IDO1 kalcytriol może zarówno promować, jak i hamować tworzenie przez CAFs immunosupresyjnego mikrośrodowiska. Traktowanie myszy kalcytriolem, wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy promują nabywanie przez CAFs (E0771, 1000IU+cal) lub NFs (4T1,**



**100IU+cal) immunosupresyjnych właściwości (CAFs - wzrost poziomu TNC, NFs – wzrost poziomu PDPN, TNC). Stymulacja kalcytriolem CAFs pochodzących od pacjentek skutkuje najczęściej obniżeniem pronowotworowej aktywności tych komórek w kontekście ich wpływu na przeciwnowotworową odpowiedź odpornościową.**

Dla hCAFs pochodzących od pacjentek z różnych grup klinicznych wyniki stymulacji kalcytriolem nie wskazywały na jednoznaczne działanie kalcytriolu na CAFs – często wzrostowi poziomu kilku białek zaangażowanych w promocję proliferacji, migracji, EMT czy angiogenezy guza towarzyszył spadek poziomu innych białek pełniących podobne funkcje. Dla hCAFs pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub>, wzrostowi poziomu PDPN, TIMP1, CXCL12 i mRNA *SPP1* (brak zmian na poziomie białka) towarzyszyło zahamowanie sekrecji CCL2, TNC, aktywności MMP2 i ekspresji mRNA *MMP9* (brak zmian na poziomie białka). Zgodnie z przedstawionym wcześniej opisem zwiększenie poziomu PDPN może skutkować wzmocnieniem funkcji CAFs promujących powstawanie przerzutów [260–263]. Podobnie jak w badaniach *Ferrer-Mayorga i wsp.* (TIMP3) [121,208] kalcytriol zwiększył w hCAFs poziom TIMP1 - jednego z naturalnych inhibitorów metaloproteinaz [285]. Efekt ten był niezależny od tego czy hCAFs pochodziły od pacjentek z prawidłowym poziomem lub deficytem witaminy D<sub>3</sub>. Zdawałoby się, że poprzez hamowanie aktywności proteolitycznej metaloproteinaz TIMPs mogą przeciwdziałać progresji nowotworu [285]. Tymczasem ekspresję TIMPs powiązano również ze słabym rokowaniem pacjentów m.in chorujących na TNBC [286]. Kompleks TIMP1/CD63/ $\beta$ 1-integryna poprzez aktywację szlaków MAPK, FAK-PI3K czy YAP/TAZ (regulator transkrypcyjny związany z Yes1) może promować progresję nowotworu i przerzutowanie poprzez indukcję proliferacji, wzrostu, przeżycia, migracji, EMT, regulacji różnicowania czy hamowanie apoptozy [287–294]. Wzrost sekrecji CXCL12 może wiązać się ze zwiększoną promocją angiogenezy w wyniku rekrutacji komórek progenitorowych śródbłonna [295,296] lub wzbudzaniu ekspresji VEGF w komórkach nowotworowych [238]. Co więcej, CXCL12 oddziałując na receptor CXCR4 lub CXCR7 na komórkach nowotworowych promuje ich proliferację, adhezję, inwazję, EMT i angiogenezę [295,297]. Z drugiej strony zahamowanie produkcji CCL2 wiąże się z osłabieniem podobnych procesów zaangażowanych w promocję przerzutowania – kierowanej przez CCL2 rekrutacji makrofagów do TME, które uczestniczą w angiogenezie i wspomagają wynaczynienie komórek nowotworowych

[74,75]. Obniżenie interakcji CCL2 z receptorem CRC2 na powierzchni komórek nowotworowych może hamować migrację i przeżycie komórek raka gruczołu sutkowego (prawdopodobnie poprzez aktywację szlaków Smad3 i MAPK) [298]. Obniżenie sekrecji TNC może stymulować apoptozę komórek nowotworowych [266]. Zmniejszenie poziomu TNC pod wpływem kalcytriolu obserwuje się również w samych komórkach nabłonkowych i nowotworowych (linii EpH4, MDA-MB-231 oraz BT-474) [89]. Obniżenie poziomu MMP2 i TNC wiąże się ze zmniejszoną proliferacją, migracją, inwazją i angiogenezą guza [54]. W przypadku hCAFs pochodzących od pacjentek z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub> obserwuje się z kolei delikatną przewagę inhibitorowego efektu kalcytriolu ponad stymulację pronowotworowej aktywności CAFs. Stymulacja kalcytriolem skutkowała obniżeniem produkcji CCL2, TNC, OPN (ale wzrostem ekspresji mRNA *SPP1*) i aktywności MMP2 oraz wzrostem poziomu MMP9 (na poziomie mRNA obniżenie ekspresji), TIMP1 i *PDPN* (brak zmian na poziomie białka) w hCAFs. Obserwacja ta przeciwstawia się wynikom *Sherman i wsp.* [204], w których zastosowanie kalcyportiolu wiązało się zwiększeniem poziomu Tsp-1 (inhibitora angiogenezy) i obniżeniem poziomu MMP9 (induktora angiogenezy) w CAFs raka trzustki [204,299]. Efekt działania kalcytriolu różnił się także między hCAFs pacjentek przed menopauzą i hCAFs pacjentek po menopauzie oraz hCAFs pacjentek z przerzutami i hCAFs pacjentek bez przerzutów. W przypadku CAFs pacjentek przed menopauzą kalcytriol hamował ich właściwości proprzerzutowe poprzez obniżenie produkcji CCL2, TNC, *MMP9* (tylko na poziomie mRNA) i aktywności MMP2 oraz promował te właściwości poprzez zwiększenie poziomu TIMP1 i mRNA *PDPN* oraz *SPP1* (brak wpływu na poziomie białka). W CAFs pacjentek po menopauzie kalcytriol promował pronowotworowy charakter CAFs poprzez wzrost poziomu *PDPN*, TIMP1, TNC (obniżenie ekspresji na poziomie mRNA) i *SPP1* (brak wpływu na poziomie białka). Aczkolwiek taki efekt kalcytriolu na poziom TNC w CAFs był obserwowany tylko przy zastosowaniu wyższego (10nM) stężenia kalcytriolu. Zahamowanie funkcji CAFs promujących przerzutowanie obserwowano poprzez obniżenie poziomu CCL2, MMP2 i MMP9 i TNC (1nM). Co ciekawe, kalcytriol modulował również odmiennie właściwości CAFs pochodzących z guzów pacjentek bez przerzutów i z przerzutami. Efekt stymulacji CAFs kalcytriolem był bardziej korzystny w przypadku CAFs pochodzących od pacjentek z przerzutami – zaobserwowano obniżenie poziomu CCL2, MMP2 i MMP9, TNC, OPN, TGFβ1 oraz zwiększenie poziomu tylko TIMP1, mRNA *PDPN* i *SPP1* (brak wpływu na poziomie białka). W przypadku CAFs pochodzących od

pacjentek bez przerzutów zanotowano zwiększony poziom PDPN, TIMP1, MMP9, mRNA PDPN i SSP1 (brak wpływu na poziomie białka) oraz zmniejszony poziom CCL2, TNC i aktywności MMP2 po stymulacji kalcytriolem. Trudno jest jednoznacznie oszacować, które cytokiny mają większy udział w procesach progresji i przerzutowania raka gruczołu sutkowego. Bez badań zgłębiających mechanizm działania kalcytriolu i analizy szerszej grupy czynników wpływających na procesy wzrostu, migracji, inwazji, EMT czy angiogenezy guza nie jest możliwe jednoznaczne określenie działania kalcytriolu na hCAFs raka gruczołu sutkowego.

Piśmiennictwo wskazuje, że komórki raka gruczołu sutkowego są wrażliwe na aktywność kalcytriolu *in vitro*. Stymulowane kalcytriolem wykazują obniżoną ekspresję ZEB1, N-kadheryny, wimentyny i niektórych integrzyn. Zwiększa się w tych komórkach natomiast ekspresja E-kadheryny [83,300]. *Sherman i wsp.* [204] zaobserwowali, że stymulacja kalcytriolem zmniejsza pronowotworową aktywność CAFs - obniża zdolność CAFs do indukcji w komórkach raka trzustki (MIAPaCa-2) ekspresji genów związanych z ich proliferacją, przeżyciem, EMT czy chemioopornością (tj. *CXCL1* – ligand 1 chemokiny motywu C-X-C, *CCND1* – cyklina D1, *CDK1*, *SHH*, *BIRC5* - surwiwina, *AURKB* – kinaza Aurora B). Biorąc pod uwagę udokumentowany wpływ kalcytriolu i jego analogów na komórki nowotworowe, w kolejnych eksperymentach tej rozprawy podjęto się określenia jak kalcytriol moduluje pronowotworowe działanie CAFs. Zróznicowany wpływ kalcytriolu na aktywność CAFs został zaobserwowany gdy dwie linie ludzkiego raka gruczołu sutkowego - MCF-7 i MDA-MB-231 reprezentujące inne podtypy raka gruczołu sutkowego (MCF-7 - typ luminalny A, MDA-MB-231 - TNBC) – stymulowano medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem. hCAFs promowały migrację komórek raka gruczołu sutkowego oraz modulowały w komórkach nowotworowych poziom białek istotnych dla progresji nowotworu. W przypadku komórek MCF-7 promigracyjne działanie hCAFs pochodzących z guzów pacjentek po menopauzie i bez przerzutów zostało osłabione przez 10nM kalcytriol. Stymulacja kalcytriolem nie zmieniła wpływu hCAFs na migrację komórek MDA-MB-231. Co więcej, stymulacja kalcytriolem CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą, pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> i pacjentek bez przerzutów prowadziła do obniżenia poziomu OPN w komórkach MDA-MB-231 inkubowanych z medium znad tych CAFs. Jednocześnie CM znad stymulowanych kalcytriolem CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> obniżyło poziom ZEB1 w komórkach MDA-MB-231. Zahamowanie stymulacji ekspresji OPN i ZEB1 w komórkach raka gruczołu sutkowego

świadczy o przeciwnowotworowej aktywności kalcytriolu w kontekście CAFs, ponieważ ZEB1 i OPN to białka zaangażowane w wiele procesów prowadzących do progresji raka gruczołu sutkowego [301–303]. Niestety są to jedyne obserwacje wskazujące na przeciwnowotworową aktywność kalcytriolu w kontekście jego wpływu na CAFs. Medium znad stymulowanych kalcytriolem CAFs pochodzących od pacjentek przed menopauzą prowadziło do obniżenia poziomu E-kadheryny w komórkach MCF-7 (1nM) i MDA-MB-231 (1 i 10nM kalcytriol). Obniżenie poziomu E-kadheryny będącej markerem fenotypu nabłonkowego może sugerować indukcję procesu EMT [304]. Wzrost poziomu OPN został zaobserwowany w komórkach MCF-7 po stymulacji CM znad CAFs stymulowanych 1nM kalcytriolem pochodzących z guzów pacjentek po menopauzie i z prawidłowym poziomem witaminy D<sub>3</sub>. Co ciekawe, niezależnie od stymulacji kalcytriolem CAFs pacjentek przed menopauzą indukowały w komórkach raka gruczołu sutkowego obniżenie poziomu ZEB1 (MCF-7 i MDA-MB-231). Analogicznie stymulacja komórek MDA-MB-231 za pomocą CM znad CAFs pochodzących od pacjentek bez przerzutów skutkowała zmniejszeniem poziomu ZEB1. Z kolei stymulacja komórek MCF-7 za pomocą CM znad CAFs pochodzących od pacjentek po menopauzie prowadziła do zwiększenia poziomu ZEB1 w komórkach. W swoich badaniach *Matsamura i wsp.* zaobserwowali, że fibroblasty mogą promować powstawanie klastrow odmiennych populacji komórek nowotworowych: o charakterze nabłonkowym (E<sup>hi</sup>) - wysokim poziomie E-kadheryny i niskim poziomie ZEB1 (E-cadh<sup>hi</sup>ZEB1<sup>lo/neg</sup>) oraz o charakterze mieszanym nabłonkowo-mezenchymalnym (E/M) - niskim poziomie E-kadheryny i wysokim ZEB1 (E-cadh<sup>lo</sup>ZEB1<sup>hi</sup>), świadczącym o niepełnym procesie EMT [305]. Dzięki częściowo utrzymanej ekspresji E-kadheryny, komórki nowotworowe E/M mogą wiązać się z E<sup>hi</sup> (o silnych właściwościach adhezyjnych) i razem prowadzić do inwazji i przerzutowania [305]. **Stymulacja CAFs kalcytriolem może zarówno wpierać pronowotworowy charakter CAFs lub go hamować. CAFs stanowią heterogenną grupę komórek, a efekt kalcytriolu na różne ich podgrupy może być odmienny. Przedstawione wyniki w przypadku hCAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub>, przed menopauzą, bez przerzutów i z obecnymi przerzutami wskazują na przewagę przeciwnowotworowej aktywności kalcytriolu w kontekście modulacji właściwości CAFs promujących przerzutowanie raka gruczołu sutkowego. Należy podkreślić, że działanie kalcytriolu na komórki nie zależy wyłącznie od samej charakterystyki CAFs ale i od podtypu komórek raka gruczołu sutkowego na jaki oddziałują.**

---

## WNIOSKI

1. Wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy wywiera odmienny efekt w fibroblastach obecnych w miejscu przerzutowania i CAFs guza pierwotnego w mysich modelach raka gruczołu sutkowego 4T1 i E0771.
2. Zwiększenie poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy obarczonych 4T1 skutkuje rozwojem fibroblastów opornych na czynniki promujące ich aktywację w miejscu przerzutowania. Wskazuje na to obniżenie poziomu  $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$  i TNC w komórkach.
3. Deficyt witaminy D<sub>3</sub> w organizmie myszy obarczonych komórkami raka gruczołu sutkowego 4T1 wraz z administracją kalcytriolu zwiększają poziom  $\alpha$ SMA, PDPN i TNC w fibroblastach obecnych w miejscu przerzutowania uwrażliwiając je na czynniki promujące ich aktywację.
4. Zarówno wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu, jak i administracja kalcytriolu do organizmu myszy obarczonych komórkami E0771, w którym już rozwinął się rak gruczołu sutkowego może skutkować powstawaniem CAFs o tym samym fenotypie (PDPN<sup>+</sup>, TNC<sup>+</sup>) świadczącym o zwiększonej aktywacji i właściwościach pronowotworowych, zarówno w kontekście immunosupresji, jak i promocji procesów zaangażowanych w przerzutowanie raka gruczołu sutkowego.
5. Stymulacja *ex vivo* CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych za pomocą kalcytriolu może zarówno promować i hamować pronowotworową aktywność fibroblastów.
6. W przypadku CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> stymulacja *ex vivo* pokazuje przeważający przeciwnowotworowy efekt kalcytriolu. Obniżeniu ulega poziom CCL2, TNC, IDO1 i MMPs zaangażowanych w indukcję stanu immunosupresji i promocję przerzutowania. Komórki raka gruczołu sutkowego linii MDA-MB-231 stymulowane medium z CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D<sub>3</sub> wykazują obniżony poziom OPN i ZEB1 - ważnych induktorów progresji raka gruczołu sutkowego.
7. Działanie kalcytriolu *ex vivo* nie zależy wyłącznie od samej charakterystyki CAFs, ale i od podtypu komórek raka gruczołu sutkowego, na jaki oddziałują. Stymulowane

kalcytriolem CAFs mogą zwiększać (wzrost poziomu OPN) lub obniżać (obniżenie tempa migracji) złośliwość komórek MCF-7 (typ luminalny A) tak, jak i obniżać złośliwość komórek potrójnie ujemnego raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231 poprzez obniżenie poziomu OPN.

8. Biorąc pod uwagę niejednoznaczny wpływ witaminy D<sub>3</sub> i kalcytriolu *in vivo* i *ex vivo* niezbędne są dalsze badania, które pozwolą jednoznacznie rozstrzygnąć zasadność suplementacji witaminą D<sub>3</sub> w różnych podtypach raka gruczołu sutkowego.

**BIBLIOGRAFIA**

1. GLOBOCAN 2020 [Internet]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>
2. Hanna TP, King WD, Thibodeau S, Jalink M, Paulin GA, Harvey-Jones E, et al. Mortality due to cancer treatment delay: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020 Nov 4;371:m4087.
3. Esebua M. Histopathology and Grading of Breast Cancer. In: Schatten H, editor. *Cell and Molecular Biology of Breast Cancer* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 1–27. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-634-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-634-4_1)
4. Bertero L, Massa F, Metovic J, Zanetti R, Castellano I, Ricardi U, et al. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch Int J Pathol*. 2018 Apr;472(4):519–31.
5. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77(2):181–5.
6. Anna Smaga, Magdalena Mikułowska, Aleksandra Komorowska, dr Bogdan Falkiewicz, Jerzy Grygielkiewicz. *Rak piersi w Polsce - leczenie to inwestycja*. 2014;66.
7. Nascimento RG do, Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*. 2020;30:e20200024.
8. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Sep;10(9):494–506.
9. Dubiański R, Jagiełło-Gruszczyńska A, Nowecki Z. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in the treatment of advanced oestrogen receptor-positive breast cancer. *Oncol Clin Pract*. 2016;12(6):209–14.
10. Ban M, Petrić Miše B, Vrdoljak E. Early HER2-Positive Breast Cancer: Current Treatment and Novel Approaches. *Breast Care*. 2020;15(6):560–9.
11. Canonici A, Ivers L, Conlon NT, Pedersen K, Gaynor N, Browne BC, et al. HER-targeted tyrosine kinase inhibitors enhance response to trastuzumab and pertuzumab in HER2-positive breast cancer. *Invest New Drugs*. 2019 Jun;37(3):441–51.
12. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 10;377(6):523–33.
13. Hobbs EA, Litton JK, Yap TA. Development of the PARP inhibitor talazoparib for the treatment of advanced BRCA1 and BRCA2 mutated breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2021 Oct;22(14):1825–37.
14. Shah M, Osgood CL, Amatya AK, Fiero MH, Pierce WF, Nair A, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Neoadjuvant and Adjuvant Treatment of

- Patients with High-Risk Early-Stage Triple Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2022 Aug 4;CCR-22-1110.
15. Santini D, Stumbo L, Spoto C, D'Onofrio L, Pantano F, Iuliani M, et al. Bisphosphonates as anticancer agents in early breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Breast Cancer Res.* 2015 Sep 2;17(1):121.
  16. Rock CL, Thomson C, Gansler T, Gapstur SM, McCullough ML, Patel AV, et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(4):245–71.
  17. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets Ther.* 2019 Apr 10;11:151–64.
  18. Szkiela M, Worach-Kardas H, Marcinkowski JT. Nowotwór złośliwy piersi – epidemiologia, czynniki ryzyka, znaczenie profilaktyki pierwotnej i wtórnej. 2014;11.
  19. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017 Nov 1;13(11):1387–97.
  20. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):365–408.
  21. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol.* 2014 Mar 20;21(3):319–29.
  22. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients.* 2016 Mar 2;8(3):135.
  23. Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab.* 2018;72(2):87–95.
  24. Silva MC, Furlanetto TW. Intestinal absorption of vitamin D: a systematic review. *Nutr Rev.* 2018 Jan 1;76(1):60–76.
  25. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T. Vitamin D and Intestinal Calcium Absorption. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Dec 5;347(1–2):25–9.
  26. Perwad F, Portale AA. Vitamin D metabolism in the kidney: Regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Dec 5;347(1):17–24.
  27. Kim S, Yamazaki M, Zella LA, Shevde NK, Pike JW. Activation of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Is Mediated through Multiple Long-Range Enhancers. *Mol Cell Biol.* 2006 Sep;26(17):6469–86.
  28. Lai YH, Fang TC. The Pleiotropic Effect of Vitamin D. *ISRN Nephrol.* 2013 Sep 4;2013:898125.



29. Gorgoni B, Maritano D, Marthyn P, Righi M, Poli V. C/EBP beta gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Apr 15;168(8):4055–62.
30. Ji Y, Studzinski GP. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res*. 2004 Jan 1;64(1):370–7.
31. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996 Jan 15;10(2):142–53.
32. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, et al. Inherited Variation in Vitamin D Genes Is Associated With Predisposition to Autoimmune Disease Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1624–31.
33. Ma R, Deng XL, Du GL, Li C, Xiao S, Aibibai Y, et al. Active vitamin D3, 1,25-(OH)2D3, protects against macrovasculopathy in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res GMR*. 2016 Jun 3;15(2).
34. Barrea L, Savanelli MC, Di Somma C, Napolitano M, Megna M, Colao A, et al. Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017;18(2):195–205.
35. Shojaei M, Sabzeghabaei A, Valaei Barhagh H, Soltani S. The Correlation between Serum Level of Vitamin D and Outcome of Sepsis Patients; a Cross-Sectional Study. *Arch Acad Emerg Med*. 2019 Jan 10;7(1):e1.
36. Bartosik-Psujek H, Psujek M. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol*. 2019;53(2):113–22.
37. Andújar-Espinosa R, Salinero-González L, Illán-Gómez F, Castilla-Martínez M, Hu-Yang C, Ruiz-López FJ. Effect of vitamin D supplementation on asthma control in patients with vitamin D deficiency: the ACVID randomised clinical trial. *Thorax*. 2021 Feb 1;76(2):126–33.
38. Borzutzky A, Camargo CA. Role of vitamin D in the pathogenesis and treatment of atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013 Aug;9(8):751–60.
39. Yüksel RN, Altunsoy N, Tikir B, Cingi Külük M, Unal K, Goka S, et al. Correlation between total vitamin D levels and psychotic psychopathology in patients with schizophrenia: therapeutic implications for add-on vitamin D augmentation. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2014 Dec;4(6):268–75.
40. Koduah P, Paul F, Dörr JM. Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *EPMA J*. 2017 Nov 15;8(4):313–25.
41. Williams S, Malatesta K, Norris K. Vitamin D and Chronic Kidney Disease. *Ethn Dis*. 2009;19(4 Suppl 5):S5–8–11.

42. Iruzubieta P, Terán Á, Crespo J, Fábrega E. Vitamin D deficiency in chronic liver disease. *World J Hepatol.* 2014 Dec 27;6(12):901–15.
43. Szarpak L, Filipiak KJ, Gasecka A, Gawel W, Koziel D, Jaguszewski MJ, et al. Vitamin D supplementation to treat SARS-CoV-2 positive patients. Evidence from meta-analysis. *Cardiol J.* 2022;29(2):188–96.
44. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ.* 2017 Feb 15;356:i6583.
45. Jacobs MLB, Gosal E, Goodwin A, Navaratnam V, Dexter L, Rich AL. Vitamin D levels in patients with active TB: Is it clinically relevant? *Eur Respir J [Internet].* 2018 Sep 15;52(suppl 62). Available from: [https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl\\_62/PA2692](https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl_62/PA2692)
46. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002 Jul 15;110(2):229–38.
47. Motiwala SR, Wang TJ. Vitamin D and cardiovascular risk. *Curr Hypertens Rep.* 2012 Jun;14(3):209–18.
48. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients.* 2020 Jul 15;12(7):2097.
49. Chesdachai S, Tangpricha V. Treatment of Vitamin D Deficiency in Cystic Fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Nov;164:36–9.
50. Lerner A, Shapira Y, Agmon-Levin N, Pacht A, Ben-Ami Shor D, López HM, et al. The Clinical Significance of 25OH-Vitamin D Status in Celiac Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012 Jun 1;42(3):322–30.
51. Jalili M, Vahedi H, Poustchi H, Hekmatdoost A. Effects of Vitamin D Supplementation in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Int J Prev Med.* 2019 Feb 12;10:16.
52. Estébanez N, Gómez-Acebo I, Palazuelos C, Llorca J, Dierssen-Sotos T. Vitamin D exposure and Risk of Breast Cancer: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2018 Jun 13;8(1):9039.
53. Ganji V, Sukik L, Hoque B, Boutefnouchet L, Shi Z. Association of Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentration with Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women in the US. *J Pers Med.* 2022 Jun 9;12(6):944.
54. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Fedirko V, Jenab M, Olsen A, Halkjær J, et al. Pre-diagnostic vitamin D concentrations and cancer risks in older individuals: an analysis of cohorts participating in the CHANCES consortium. *Eur J Epidemiol.* 2016 Mar;31(3):311–23.

55. Kanstrup C, Teilum D, Rejnmark L, Bigaard JV, Eiken P, Kroman N, et al. 25-Hydroxyvitamin D at time of breast cancer diagnosis and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Feb 1;179(3):699–708.
56. Karthikayan A, Sureshkumar S, Kadambari D, Vijayakumar C. Low serum 25-hydroxy vitamin D levels are associated with aggressive breast cancer variants and poor prognostic factors in patients with breast carcinoma. *Arch Endocrinol Metab.* 2018 Aug;62:452–9.
57. Peppone LJ, Rickles AS, Janelins MC, Insalaco MR, Skinner KA. The Association Between Breast Cancer Prognostic Indicators and Serum 25-OH Vitamin D Levels. *Ann Surg Oncol.* 2012 Aug 1;19(8):2590–9.
58. Voutsadakis IA. Vitamin D baseline levels at diagnosis of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2021 Mar;14(1):16–26.
59. Vanhevel J, Verlinden L, Doms S, Wildiers H, Verstuyf A. The role of vitamin D in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer.* 2022 Feb 1;29(2):R33–55.
60. Al-Azhri J, Zhang Y, Bshara W, Zirpoli G, McCann SE, Khoury T, et al. Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2017 Jan 2;23(1):97–103.
61. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D, Veronese LA, et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. *BMC Cancer.* 2010 Sep 11;10(1):483.
62. Welsh J. Function of the vitamin D endocrine system in mammary gland and breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Sep 15;453:88–95.
63. Huss L, Butt ST, Borgquist S, Elebro K, Sandsveden M, Rosendahl A, et al. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast Cancer Res BCR.* 2019 Jul 29;21(1):84.
64. Rossdeutscher L, Li J, Luco AL, Fadhil I, Ochietti B, Camirand A, et al. Chemoprevention Activity of 25-Hydroxyvitamin D in the MMTV-PyMT Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2015 Feb 1;8(2):120–8.
65. Williams JD, Aggarwal A, Swami S, Krishnan AV, Ji L, Albertelli MA, et al. Tumor Autonomous Effects of Vitamin D Deficiency Promote Breast Cancer Metastasis. *Endocrinology.* 2016 Apr 1;157(4):1341–7.
66. LaPorta E, Welsh J. Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Oct 1;144:65–73.
67. Zheng Y, Trivedi T, Lin RC, Fong-Yee C, Nolte R, Manibo J, et al. Loss of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Bone Res.* 2017 Sep 5;5(1):1–12.

68. Pickholtz I, Saadyan S, Keshet GI, Wang VS, Cohen R, Bouwman P, et al. Cooperation between BRCA1 and vitamin D is critical for histone acetylation of the p21waf1 promoter and for growth inhibition of breast cancer cells and cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 2014 Nov 26;5(23):11827–46.
69. Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2001 Aug;15(8):1370–80.
70. Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1998 Jul 25;142(1–2):57–65.
71. Lopes N, Paredes J, Costa JL, Ylstra B, Schmitt F. Vitamin D and the mammary gland: a review on its role in normal development and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012 May 31;14(3):211.
72. Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Peng L, Albertelli MA, et al. Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression in vivo. *Horm Cancer*. 2011 Jun 1;2(3):190–202.
73. Karkeni E, Morin SO, Bou Tayeh B, Goubard A, Josselin E, Castellano R, et al. Vitamin D Controls Tumor Growth and CD8+ T Cell Infiltration in Breast Cancer. *Front Immunol*. 2019 Jun 6;10:1307.
74. Fonseca-Filho VCN, Katayama MLH, Lyra EC, Maria DA, Basso RA, Nonogaki S, et al. Orthotopic tumorgrafts in nude mice as a model to evaluate calcitriol effects in breast cancer. *Braz J Biol*. 2017 May 4;77:856–67.
75. Anisiewicz A, Pawlik A, Filip-Psurska B, Turlej E, Dzimira S, Milczarek M, et al. Unfavorable effect of calcitriol and its low-calcemic analogs on metastasis of 4T1 mouse mammary gland cancer. *Int J Oncol*. 2018 Jan 1;52(1):103–26.
76. Anisiewicz A, Filip-Psurska B, Pawlik A, Nasulewicz-Goldeman A, Piasecki T, Kowalski K, et al. Calcitriol Analogues Decrease Lung Metastasis but Impair Bone Metabolism in Aged Ovariectomized Mice Bearing 4T1 Mammary Gland Tumours. *Aging Dis*. 2019;10(5):977.
77. Anisiewicz A, Kowalski K, Banach J, Łabędź N, Stachowicz-Suhs M, Piotrowska A, et al. Vitamin D Metabolite Profile in Cholecalciferol- or Calcitriol-Supplemented Healthy and Mammary Gland Tumor-Bearing Mice. *Nutrients*. 2020 Nov;12(11):3416.
78. Cao Y, Du Y, Liu F, Feng Y, Cheng S, Guan S, et al. Vitamin D aggravates breast cancer by inducing immunosuppression in the tumor bearing mouse. *Immunotherapy*. 2018 Jun;10(7):555–66.
79. Trivedi T, Zheng Y, Fournier PGJ, Murthy S, John S, Schillo S, et al. The vitamin D receptor is involved in the regulation of human breast cancer cell growth via a ligand-independent function in cytoplasm. *Oncotarget*. 2017 Mar 1;8(16):26687–701.

80. Vanoirbeek E, Krishnan A, Eelen G, Verlinden L, Bouillon R, Feldman D, et al. The anti-cancer and anti-inflammatory actions of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug 1;25(4):593–604.
81. Weitsman GE, Koren R, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D sensitizes breast cancer cells to the action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Mitochondria as a convergence point in the death pathway. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jul 15;39(2):266–78.
82. Kłopotowska D, Matuszyk J, Wietrzyk J. Steroid hormone calcitriol and its analog tacalcitol inhibit miR-125b expression in a human breast cancer MCF-7 cell line. *Steroids.* 2019 Jan 1;141:70–5.
83. 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 Jul 1;162(7):bqab049.
84. Zhang Y, Guo Q, Zhang Z, Bai N, Liu Z, Xiong M, et al. VDR Status Arbitrates the Prometastatic Effects of Tumor-Associated Macrophages. *Mol Cancer Res.* 2014 Aug 1;12(8):1181–91.
85. Horas K, Zheng Y, Fong-Yee C, Macfarlane E, Manibo J, Chen Y, 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):1721–32.
86. Lopes N, Carvalho J, Durães C, Sousa B, Gomes M, Costa JL, et al. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces de novo E-cadherin expression in triple-negative breast cancer cells by CDH1-promoter demethylation. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):249–57.
87. Wilmanski T, Barnard A, Parikh MR, Kirshner J, Buhman K, Burgess J, et al. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D inhibits the metastatic capability of MCF10CA1a and MDA-MB-231 cells in an in vitro model of breast to bone metastasis. *Nutr Cancer.* 2016 Oct;68(7):1202–9.
88. Pendás-Franco N, González-Sancho JM, Suárez Y, Aguilera O, Steinmeyer A, Gamallo C, et al. Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells. *Differ Res Biol Divers.* 2007 Mar;75(3):193–207.
89. González-Sancho JM, Alvarez-Dolado M, Muñoz A. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits tenascin-C expression in mammary epithelial cells. *FEBS Lett.* 1998;426(2):225–8.
90. Koli K, Keski-Oja J. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res.* 2000 Apr;11(4):221–9.
91. Sundaram S, Beckman MJ, Bajwa A, Wei J, Smith KM, Posner GH, et al. QW-1624F2-2, a synthetic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, enhances the response to other dexamethasone and suppresses the invasiveness of human metastatic breast tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2006 Nov;5(11):2806–14.

92. Hansen CM, Frandsen TL, Br nner N, Binderup L. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 1994 May;12(3):195–202.
93. Zheng W, Duan B, Zhang Q, Ouyang L, Peng W, Qian F, et al. Vitamin D-induced vitamin D receptor expression induces tamoxifen sensitivity in MCF-7 stem cells via suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Biosci Rep*. 2018 Dec 7;38(6):BSR20180595.
94. So JY, Wahler J, Das Gupta S, Salerno DM, Maehr H, Uskokovic M, et al. HES1-mediated inhibition of Notch1 signaling by a Gemini vitamin D analog leads to decreased CD44+/CD24–/low tumor-initiating subpopulation in basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Apr 1;148:111–21.
95. Song K, Farzaneh M. Signaling pathways governing breast cancer stem cells behavior. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Apr 16;12(1):245.
96. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983–8.
97. Saeg F, Anbalagan M. Breast cancer stem cells and the challenges of eradication: a review of novel therapies. *Stem Cell Investig*. 2018;5:39.
98. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:18.
99. Shan NL, Wahler J, Lee HJ, Bak MJ, Gupta SD, Maehr H, et al. Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 Oct 1;173:122–9.
100. Wahler J, So JY, Cheng LC, Maehr H, Uskokovic M, Suh N. Vitamin D compounds reduce mammosphere formation and decrease expression of putative stem cell markers in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Apr 1;148:148–55.
101. Jeong Y, Swami S, Krishnan AV, Williams JD, Martin S, Horst RL, et al. Inhibition of Mouse Breast Tumor-Initiating Cells by Calcitriol and Dietary Vitamin D. *Mol Cancer Ther*. 2015 Aug 5;14(8):1951–61.
102. Zheng W, Tayyari F, Gowda GAN, Raftery D, McLamore ES, Shi J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D regulation of glucose metabolism in Harvey-ras transformed MCF10A human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Nov 1;138:81–9.
103. Wilmanski T, Zhou X, Zheng W, Shinde A, Donkin SS, Wendt M, et al. Inhibition of pyruvate carboxylase by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D promotes oxidative stress in early breast cancer progression. *Cancer Lett*. 2017 Dec 28;411:171–81.
104. Abu el Maaty MA, Dabiri Y, Almouhanna F, Blagojevic B, Theobald J, B ttner M, et al. Activation of pro-survival metabolic networks by 1,25(OH)2D3 does not

- hamper the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapeutics. *Cancer Metab.* 2018 Aug 30;6(1):11.
105. Santos JM, Khan ZS, Munir MT, Tarafdar K, Rahman SM, Hussain F. Vitamin D3 decreases glycolysis and invasiveness, and increases cellular stiffness in breast cancer cells. *J Nutr Biochem.* 2018 Mar 1;53:111–20.
106. Santos JM, Hussain F. VD3 mitigates breast cancer aggressiveness by targeting V-H<sup>+</sup>-ATPase. *J Nutr Biochem.* 2019 Aug 1;70:185–93.
107. Oshi M, Asaoka M, Tokumaru Y, Yan L, Matsuyama R, Ishikawa T, et al. CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(18):6968.
108. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2016 Dec 1;4(1):59.
109. Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosumi M, Inoue K, Fujii T, Horiguchi J, et al. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett.* 2019 Mar 1;17(3):2647–56.
110. Gao Z hua, Li C xin, Liu M, Jiang J yuan. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2020 Nov 25;20(1):1150.
111. Pawlik A, Anisiewicz A, Filip-Psurska B, Nowak M, Turlej E, Trynda J, et al. Calcitriol and Its Analogs Establish the Immunosuppressive Microenvironment That Drives Metastasis in 4T1 Mouse Mammary Gland Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 20;19(7):2116.
112. Anisiewicz A, Pawlik A, Filip-Psurska B, Wietrzyk J. Differential Impact of Calcitriol and Its Analogs on Tumor Stroma in Young and Aged Ovariectomized Mice Bearing 4T1 Mammary Gland Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 2;21(17):6359.
113. 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 Nov 23;12(11):3485.
114. García-Quiroz J, Rivas-Suárez M, García-Becerra R, Barrera D, Martínez-Reza I, Ordaz-Rosado D, et al. Calcitriol reduces thrombospondin-1 and increases vascular endothelial growth factor in breast cancer cells: Implications for tumor angiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Oct 1;144:215–22.
115. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabjeesh NJ. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Apr 12;6(4):1433–9.

116. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2000 Aug 4;87(3):214–20.
117. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):174–86.
118. Joshi RS, Kanugula SS, Sudhir S, Pereira MP, Jain S, Aghi MK. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Progression. *Cancers.* 2021 Mar 19;13(6):1399.
119. Ziani L, Chouaib S, Thiery J. Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front Immunol.* 2018 Mar 1;9:414.
120. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014 Jul 28;211(8):1503–23.
121. Ferrer-Mayorga G, Gómez-López G, Barbáchano A, Fernández-Barral A, Peña C, Pisano DG, et al. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut.* 2017 Aug;66(8):1449–62.
122. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.* 2006 Dec 31;5(12):1640–6.
123. Gomes RN, Manuel F, Nascimento DS. The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. *Npj Regen Med.* 2021 Aug 10;6(1):1–12.
124. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014 May 27;5:123.
125. Murtha LA, Schuliga MJ, Mabotuwana NS, Hardy SA, Waters DW, Burgess JK, et al. The Processes and Mechanisms of Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Front Physiol.* 2017;8:777.
126. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012 Jul 6;18(7):1028–40.
127. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986 Dec 25;315(26):1650–9.
128. Ping Q, Yan R, Cheng X, Wang W, Zhong Y, Hou Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther.* 2021 Sep;28(9):984–99.
129. Ringuette Goulet C, Bernard G, Tremblay S, Chabaud S, Bolduc S, Pouliot F. Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF $\beta$  Signaling. *Mol Cancer Res MCR.* 2018 Jul;16(7):1196–204.



130. Kuzet SE, Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):607–19.
131. Sharon Y, Raz Y, Cohen N, Ben-Shmuel A, Schwartz H, Geiger T, et al. Tumor-Derived Osteopontin Reprograms Normal Mammary Fibroblasts to Promote Inflammation and Tumor Growth in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2015 Mar 15;75(6):963–73.
132. Albregues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, et al. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun.* 2015 Dec 15;6:10204.
133. Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, et al. ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. *Cancer Cell.* 2011 Aug 16;20(2):229–45.
134. Erez N, Truitt M, Olson P, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Cancer Cell.* 2010 Feb 17;17(2):135–47.
135. Foster CT, Gualdrini F, Treisman R. Mutual dependence of the MRTF–SRF and YAP–TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev.* 2017 Dec 1;31(23–24):2361–75.
136. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechano-transduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer associated fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2013 Jun;15(6):10.1038/ncb2756.
137. Yeon JH, Jeong HE, Seo H, Cho S, Kim K, Na D, et al. Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomater.* 2018 Aug 1;76:146–53.
138. Ning X, Zhang H, Wang C, Song X. Exosomes Released by Gastric Cancer Cells Induce Transition of Pericytes Into Cancer-Associated Fibroblasts. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2018 Apr 18;24:2350–9.
139. Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013 Sep 15;73(18):5657–68.
140. Weber CE, Kothari AN, Wai PY, Li NY, Driver J, Zapf M a. C, et al. Osteopontin mediates an MZF1-TGF- $\beta$ 1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Oncogene.* 2015 Sep 10;34(37):4821–33.
141. Tan HX, Cao ZB, He TT, Huang T, Xiang CL, Liu Y. TGFbeta1 is essential for MSCs-CAFs differentiation and promotes HCT116 cells migration and invasion via JAK/STAT3 signaling. *OncoTargets Ther.* 2019 Jul 5;12:5323–34.

142. Fernández-Nogueira P, Fuster G, Gutierrez-Uzquiza Á, Gascón P, Carbó N, Bragado P. Cancer-Associated Fibroblasts in Breast Cancer Treatment Response and Metastasis. *Cancers*. 2021 Jun 23;13(13):3146.
143. Ganguly D, Chandra R, Karalis J, Teke M, Aguilera T, Maddipati R, et al. Cancer-Associated Fibroblasts: Versatile Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2020 Sep 17;12(9):2652.
144. Wu F, Yang J, Liu J, Wang Y, Mu J, Zeng Q, et al. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jun 10;6:218.
145. Avagliano A, Granato G, Ruocco MR, Romano V, Belviso I, Carfora A, et al. Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts: The Slavery of Stromal Fibroblasts. *BioMed Res Int*. 2018 Jun 5;2018:6075403.
146. Monteran L, Erez N. The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019 Aug 2;10:1835.
147. Cox TR, Bird D, Baker AM, Barker HE, Ho MWY, Lang G, et al. LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis. *Cancer Res*. 2013 Mar 14;73(6):1721–32.
148. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XHF, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med*. 2011 Jun 26;17(7):867–74.
149. Suh J, Kim DH, Lee YH, Jang JH, Surh YJ. Fibroblast growth factor-2, derived from cancer-associated fibroblasts, stimulates growth and progression of human breast cancer cells via FGFR1 signaling. *Mol Carcinog*. 2020;59(9):1028–40.
150. Giorello MB, Borzone FR, Labovsky V, Piccioni FV, Chasseing NA. Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2021 Jun 1;26(2):135–55.
151. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Dec;9(12):1392–400.
152. Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. *Pathol Int*. 2002;52(4):255–64.
153. Soon PSH, Kim E, Pon CK, Gill AJ, Moore K, Spillane AJ, et al. Breast cancer-associated fibroblasts induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Feb;20(1):1–12.
154. Gao MQ, Kim BG, Kang S, Choi YP, Park H, Kang KS, et al. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial–mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro. *J Cell Sci*. 2010 Oct 15;123(20):3507–14.

155. Dvorak KM, Pettee KM, Rubinic-Minotti K, Su R, Nestor-Kalinoski A, Eisenmann KM. Carcinoma associated fibroblasts (CAFs) promote breast cancer motility by suppressing mammalian Diaphanous-related formin-2 (mDia2). *PLoS ONE*. 2018 Mar 29;13(3):e0195278.
156. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 1997 Dec 29;139(7):1861–72.
157. Donnarumma E, Fiore D, Nappa M, Roscigno G, Adamo A, Iaboni M, et al. Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 19;8(12):19592–608.
158. Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer Associated Fibroblasts Promote Tumor Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Immune Microenvironment in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. *PLOS ONE*. 2009 Nov 23;4(11):e7965.
159. Gok Yavuz B, Gunaydin G, Gedik ME, Kosemehmetoglu K, Karakoc D, Ozgur F, et al. Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1+ TAMs. *Sci Rep*. 2019 Feb 28;9(1):3172.
160. Kwa MQ, Herum KM, Brakebusch C. Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis? *Clin Exp Metastasis*. 2019 Apr 1;36(2):71–86.
161. Jang I, Beningo KA. Integrins, CAFs and Mechanical Forces in the Progression of Cancer. *Cancers*. 2019 May;11(5):721.
162. Wang Z, Xiong S, Mao Y, Chen M, Ma X, Zhou X, et al. Periostin promotes immunosuppressive premetastatic niche formation to facilitate breast tumour metastasis. *J Pathol*. 2016;239(4):484–95.
163. O’Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 20;108(38):16002–7.
164. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335–48.
165. Eiro N, González L, Martínez-Ordoñez A, Fernandez-Garcia B, González LO, Cid S, et al. Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cell Oncol*. 2018 Aug 1;41(4):369–78.
166. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2011 Dec 7;481(7379):85–9.

167. Wang B, Xi C, Liu M, Sun H, Liu S, Song L, et al. Breast fibroblasts in both cancer and normal tissues induce phenotypic transformation of breast cancer stem cells: a preliminary study. *PeerJ*. 2018 May 15;6:e4805.
168. Tsuyada A, Chow A, Wu J, Somlo G, Chu P, Loera S, et al. CCL2 Mediates Cross-talk between Cancer Cells and Stromal Fibroblasts That Regulates Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2012 May 31;72(11):2768–79.
169. Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*. 2018 Feb 8;172(4):841-856.e16.
170. Cazet AS, Hui MN, Elsworth BL, Wu SZ, Roden D, Chan CL, et al. Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. *Nat Commun*. 2018 Jul 24;9(1):2897.
171. Fernández-Nogueira P, Mancino M, Fuster G, López-Plana A, Jauregui P, Almendro V, et al. Tumor-Associated Fibroblasts Promote HER2-Targeted Therapy Resistance through FGFR2 Activation. *Clin Cancer Res*. 2020 Mar 13;26(6):1432–48.
172. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Mar 12;33(3):463-479.e10.
173. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFκB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle Georget Tex*. 2010 Sep 1;9(17):3515–33.
174. Yoshida GJ, Azuma A, Miura Y, Orimo A. Activated Fibroblast Program Orchestrates Tumor Initiation and Progression; Molecular Mechanisms and the Associated Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan;20(9):2256.
175. Becker LM, O’Connell JT, Vo AP, Cain MP, Tampe D, Bizarro L, et al. Epigenetic Reprogramming of Cancer-Associated Fibroblasts Dereglates Glucose Metabolism and Facilitates Progression of Breast Cancer. *Cell Rep*. 2020 Jun 2;31(9):107701.
176. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011 Mar 12;1(4):482–97.
177. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016 Sep;16(9):582–98.
178. Gentric G, Mechta-Grigoriou F. Tumor Cells and Cancer-Associated Fibroblasts: An Updated Metabolic Perspective. *Cancers*. 2021 Jan;13(3):399.
179. Martinez-Outschoorn UE, Goldberg A, Lin Z, Ko YH, Flomenberg N, Wang C, et al. Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2011 Nov 15;12(10):924–38.

180. Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and Interleukin-6 Promote Survival of Human CD11b+ Peripheral Blood Mononuclear Cells and Induce M2-type Macrophage Polarization \*. *J Biol Chem.* 2009 Dec 4;284(49):34342–54.
181. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2019 Jul 12;12(1):76.
182. Hargadon KM. Dysregulation of TGF $\beta$ 1 Activity in Cancer and Its Influence on the Quality of Anti-Tumor Immunity. *J Clin Med.* 2016 Sep;5(9):76.
183. Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, Hagerling C, Salari K, Werb Z, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. *Nat Commun.* 2016 Oct 11;7(1):13050.
184. Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol.* 2003;33(5):1311–20.
185. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Karolina Palucka A. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):510–4.
186. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell.* 2014 Jun 16;25(6):719–34.
187. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, et al. Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2014 Jun 16;25(6):735–47.
188. Tao Q, Wang B, Zheng Y, Jiang X, Pan Z, Ren J. Vitamin D Prevents the Intestinal Fibrosis Via Induction of Vitamin D Receptor and Inhibition of Transforming Growth Factor-Beta1/Smad3 Pathway. *Dig Dis Sci.* 2015 Apr 1;60(4):868–75.
189. Shany S, Sigal-Batikoff I, Lamprecht S. Vitamin D and Myofibroblasts in Fibrosis and Cancer: At Cross-purposes with TGF- $\beta$ /SMAD Signaling. *Anticancer Res.* 2016 Dec 1;36(12):6225–34.
190. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2015 Jun 8;6:272.
191. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
192. Slominski A, Janjetovic Z, Tuckey RC, Nguyen MN, Bhattacharya KG, Wang J, et al. 20S-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, Noncalcemic Product of CYP11A1 Action on Vitamin D<sub>3</sub>, Exhibits Potent Antifibrogenic Activity in Vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb;98(2):E298–303.

193. Rostkowska-Nadolska B, Sliupkas-Dyrda E, Potyka J, Kusmierz D, Fraczek M, Krecicki T, et al. Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures. *Adv Med Sci.* 2010 Jan 1;55(1):86–92.
194. Jin A, Tang X, Zhai W, Li Y, Sun Q, Liu L, et al. TSLP-induced collagen type-I synthesis through STAT3 and PRMT1 is sensitive to calcitriol in human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2021 Sep 1;1868(10):119083.
195. Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, et al. Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma. *PLoS ONE.* 2012 Jul 24;7(7):e41994.
196. Tsai TH, Lin CJ, Hang CL, Chen WY. Calcitriol Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction and Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Mice. *Cells.* 2019 Aug 9;8(8):865.
197. Terao M, Yang L, Matsumura S, Yutani M, Murota H, Katayama I. A vitamin D analog inhibits Th2 cytokine- and TGF $\beta$  -induced periostin production in fibroblasts: a potential role for vitamin D in skin sclerosis. *Dermatoendocrinol.* 2015 Apr 2;7(1):e1010983.
198. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Tov AB, Brazowski E, et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut.* 2011 Dec 1;60(12):1728–37.
199. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response. *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):601–13.
200. Potter JJ, Liu X, Koteish A, Mezey E. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its nuclear receptor repress human  $\alpha$ 1(I) collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2013 May;33(5):10.1111/liv.12122.
201. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2006 Dec;17(12):3382–93.
202. Arfian N, Muflikhah K, Soeyono SK, Sari DCR, Tranggono U, Anggorowati N, et al. Vitamin D Attenuates Kidney Fibrosis via Reducing Fibroblast Expansion, Inflammation, and Epithelial Cell Apoptosis. *Kobe J Med Sci.* 2016 Jul 5;62(2):E38-44.
203. Xiong M, Gong J, Liu Y, Xiang R, Tan X. Loss of vitamin D receptor in chronic kidney disease: a potential mechanism linking inflammation to epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Oct;303(7):F1107-1115.
204. Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriack H, et al. Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell.* 2014 Sep 25;159(1):80–93.

205. 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 May 1;68(5):950–1.
206. Mukai Y, Yamada D, Eguchi H, Iwagami Y, Asaoka T, Noda T, et al. Vitamin D Supplementation is a Promising Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Conjunction with Current Chemoradiation Therapy. *Ann Surg Oncol*. 2018 Jul 1;25(7):1868–79.
207. Gorchs L, Ahmed S, Mayer C, Knauf A, Fernández Moro C, Svensson M, et al. The vitamin D analogue calcipotriol promotes an anti-tumorigenic phenotype of human pancreatic CAFs but reduces T cell mediated immunity. *Sci Rep*. 2020 Oct 15;10(1):17444.
208. Ferrer-Mayorga G, Niell N, Cantero R, González-Sancho JM, del Peso L, Muñoz A, et al. Vitamin D and Wnt3A have additive and partially overlapping modulatory effects on gene expression and phenotype in human colon fibroblasts. *Sci Rep*. 2019 May 30;9:8085.
209. Campos LT, Brentani H, Roela RA, Katayama MLH, Lima L, Rolim CF, et al. Differences in transcriptional effects of  $1\alpha,25$  dihydroxyvitamin D3 on fibroblasts associated to breast carcinomas and from paired normal breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Jan 1;133:12–24.
210. Lefebvre MF, Guillot C, Crepin M, Saez S. Influence of tumor derived fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1995 Mar 1;33(3):189–97.
211. Gache C, Berthois Y, Cvitkovic E, Martin PM, Saez S. Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 May;55(1):29–39.
212. Johnstone CN, Smith YE, Cao Y, Burrows AD, Cross RSN, Ling X, et al. Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Dis Model Mech*. 2015 Mar;8(3):237–51.
213. Le Naour A, Koffi Y, Diab M, Le Guennec D, Rougé S, Aldekwer S, et al. EO771, the first luminal B mammary cancer cell line from C57BL/6 mice. *Cancer Cell Int*. 2020 Jul 20;20(1):328.
214. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011 Aug 12;13(4):215.
215. Measuring cell fluorescence using ImageJ — The Open Lab Book v1.0 [Internet]. Available from: <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>
216. Jones JCR. Reduction of Contamination of Epithelial Cultures by Fibroblasts. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008 Jun;2008(6):pdb.prot4478.

217. True LD, Zhang H, Ye M, Huang CY, Nelson PS, von Haller PD, et al. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol*. 2010 Oct;23(10):1346–56.
218. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors Chur Switz*. 2011 Oct;29(5):196–202.
219. Stuelten CH, Zhang YE. Transforming Growth Factor- $\beta$ : An Agent of Change in the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol [Internet]*. 2021 [cited 2022 Jun 11];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.764727>
220. Yoon H, Tang CM, Banerjee S, Delgado AL, Yebra M, Davis J, et al. TGF- $\beta$ 1-mediated transition of resident fibroblasts to cancer-associated fibroblasts promotes cancer metastasis in gastrointestinal stromal tumor. *Oncogenesis*. 2021 Feb 6;10(2):1–12.
221. Shangguan L, Ti X, Krause U, Hai B, Zhao Y, Yang Z, et al. Inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling by BAMBI blocks differentiation of human mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts and abolishes their protumor effects. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2012 Dec;30(12):2810–9.
222. Lynch CC, Vargo-Gogola T, Matrisian LM, Fingleton B. Cleavage of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase-7 Promotes Cellular Proliferation in Nontransformed Cell Lines via Activation of RhoA. *J Oncol*. 2010;2010:530745.
223. Płudowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska J, 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. *Endokrynol Pol*. 2013;64(4):319–27.
224. Nagler C, Hardt C, Zänker KS, Dittmar T. Co-cultivation of murine BMDCs with 67NR mouse mammary carcinoma cells give rise to highly drug resistant cells. *Cancer Cell Int*. 2011 Jun 28;11:21.
225. Holen I, Saleh L, Ottewell PD, Lawson MA. Chapter 4 - In vivo models used in studies of bone metastases. In: Heymann D, editor. *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition) [Internet]*. Academic Press; 2022. p. 35–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128216668000438>
226. Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, Trump DL. A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1339–45.
227. Swami S, Krishnan AV, Williams J, Aggarwal A, Albertelli MA, Horst RL, et al. Vitamin D mitigates the adverse effects of obesity on breast cancer in mice. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Apr 1;23(4):251–64.



228. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol*. 2007 Oct;88(5):351–60.
229. Łabędź N, Stachowicz-Suhs M, Psurski M, Anisiewicz A, Banach J, Piotrowska A, et al. Modulation of Fibroblast Activity via Vitamin D3 Is Dependent on Tumor Type—Studies on Mouse Mammary Gland Cancer. *Cancers*. 2022 Jan;14(19):4585.
230. Maj E, Papiernik D, Wietrzyk J. Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). *Int J Oncol*. 2016 Nov 1;49(5):1773–84.
231. Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, et al. Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stroma. *PLoS ONE*. 2012 Feb 20;7(2):e30563.
232. Raja R, Kale S, Thorat D, Soundararajan G, Lohite K, Mane A, et al. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 $\alpha$ -mediated VEGF-dependent angiogenesis. *Oncogene*. 2014 Apr;33(16):2053–64.
233. Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV. CCL2 Regulates Angiogenesis via Activation of Ets-1 Transcription Factor. *J Immunol*. 2006 Aug 15;177(4):2651–61.
234. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The Role of CC-Chemokines in the Regulation of Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016 Nov;17(11):1856.
235. Butti R, Nimma R, Kundu G, Bulbule A, Kumar TVS, Gunasekaran VP, et al. Tumor-derived osteopontin drives the resident fibroblast to myofibroblast differentiation through Twist1 to promote breast cancer progression. *Oncogene*. 2021 Mar 18;40(11):2002–17.
236. Shevde LA, Das S, Clark DW, Samant RS. Osteopontin: An Effector and an Effect of Tumor Metastasis. *Curr Mol Med*. 2010 Feb;10(1):71–81.
237. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF $\beta$  in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2013 Nov;13(11):788–99.
238. Shi A, Wang T, Jia M, Dong L, Shi H. Effects of SDF-1/CXCR7 on the Migration, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition of Gastric Cancer Cells. *Front Genet*. 2021;12:760048.
239. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 16;107(46):20009–14.
240. Wang Z, Liu J, Huang H, Ye M, Li X, Wu R, et al. Metastasis-associated fibroblasts: an emerging target for metastatic cancer. *Biomark Res*. 2021 Jun 10;9(1):47.

241. Liu X, Das AM, Seideman J, Griswold D, Afuh CN, Kobayashi T, et al. The CC Chemokine Ligand 2 (CCL2) Mediates Fibroblast Survival through IL-6. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Jul;37(1):121–8.
242. Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, Balliet R, Lin Z, Pestell RG, et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- $\beta$  drives tumor growth. *Cell Cycle.* 2012 Aug 15;11(16):3019–35.
243. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2004 Jun;18(9):1016–8.
244. Casey TM, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, et al. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Jul 1;110(1):39–49.
245. Gunaydin G. CAFs Interacting With TAMs in Tumor Microenvironment to Enhance Tumorigenesis and Immune Evasion. *Front Oncol.* 2021;11:668349.
246. Guo W, Shan B, Klingsberg RC, Qin X, Lasky JA. Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Nov;297(5):L864-870.
247. Jones DL, Haak AJ, Caporarello N, Choi KM, Ye Z, Yan H, et al. TGF $\beta$ -induced fibroblast activation requires persistent and targeted HDAC-mediated gene repression. *J Cell Sci.* 2019 Oct 18;132(20):jcs233486.
248. Bordignon P, Bottoni G, Xu X, Popescu AS, Truan Z, Guenova E, et al. Dualism of FGF and TGF- $\beta$  Signaling in Heterogeneous Cancer-Associated Fibroblast Activation with ETV1 as a Critical Determinant. *Cell Rep.* 2019 Aug 27;28(9):2358-2372.e6.
249. Baranyi U, Winter B, Gugerell A, Hegedus B, Brostjan C, Laufer G, et al. Primary Human Fibroblasts in Culture Switch to a Myofibroblast-Like Phenotype Independently of TGF Beta. *Cells.* 2019 Jul 13;8(7):721.
250. Pelon F, Bourachot B, Kieffer Y, Magagna I, Mermet-Meillon F, Bonnet I, et al. Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat Commun.* 2020 Jan 21;11(1):404.
251. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-court D, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM Int J Med.* 2002 Dec 1;95(12):787–96.
252. Wasse H, Cardarelli F, De Staercke C, Hooper C, Veledar E, Guessous I. 25-hydroxyvitamin D concentration is inversely associated with serum MMP-9 in a cross-sectional study of African American ESRD patients. *BMC Nephrol.* 2011 May 22;12(1):24.

253. Kim SH, Baek MS, Yoon DS, Park JS, Yoon BW, Oh BS, et al. Vitamin D Inhibits Expression and Activity of Matrix Metalloproteinase in Human Lung Fibroblasts (HFL-1) Cells. *Tuberc Respir Dis.* 2014 Aug;77(2):73–80.
254. 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 D<sub>3</sub> receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 1990 Dec;87(24):9995–9.
255. Han C, Liu T, Yin R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts. *Biomark Res.* 2020 Nov 11;8(1):64.
256. Friedman G, Levi-Galibov O, David E, Bornstein C, Giladi A, Dadiani M, et al. Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome. *Nat Cancer.* 2020 Jul;1(7):692–708.
257. Cremasco V, Astarita J, Grauel AL, Keerthivasan S, MacIsaac K, Woodruff MC, et al. FAP delineates heterogeneous and functionally divergent stromal cells in immune-excluded breast tumors. *Cancer Immunol Res.* 2018 Dec;6(12):1472–85.
258. Hong HH, Hong A, Wang CC, Huang EW, Chiang CC, Yen TH, et al. Calcitriol exerts a mineralization-inductive effect comparable to that of vitamin C in cultured human periodontium cells. *Am J Transl Res.* 2019 Apr 15;11(4):2304–16.
259. Muchlińska A, Nagel A, Popęda M, Szade J, Niemira M, Zieliński J, et al. Alpha-smooth muscle actin-positive cancer-associated fibroblasts secreting osteopontin promote growth of luminal breast cancer. *Cell Mol Biol Lett.* 2022 Jun 11;27(1):45.
260. Neri S, Ishii G, Hashimoto H, Kuwata T, Nagai K, Date H, et al. Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts lead and enhance the local invasion of cancer cells in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2015;137(4):784–96.
261. Yang C ming, Ji S, Li Y, Fu L ye, Jiang T, Meng F dong.  $\beta$ -Catenin promotes cell proliferation, migration, and invasion but induces apoptosis in renal cell carcinoma. *OncoTargets Ther.* 2017 Feb 20;10:711–24.
262. Bresson L, Faraldo MM, Di-Cicco A, Quintanilla M, Glukhova MA, Deugnier MA. Podoplanin regulates mammary stem cell function and tumorigenesis by potentiating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Dev Camb Engl.* 2018 Feb 21;145(4):dev160382.
263. Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol Cancer.* 2013 Dec 20;12(1):168.
264. Niemiec J, Adamczyk A, Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, Majchrzyk K, et al. Podoplanin-positive Cancer-associated Stromal Fibroblasts in Primary Tumor and Synchronous Lymph Node Metastases of HER2-overexpressing Breast Carcinomas. *Anticancer Res.* 2018 Apr 1;38(4):1957–65.

265. Suchanski J, Tejchman A, Zacharski M, Piotrowska A, Grzegorzolka J, Chodaczek G, et al. Podoplanin increases the migration of human fibroblasts and affects the endothelial cell network formation: A possible role for cancer-associated fibroblasts in breast cancer progression. *PLOS ONE*. 2017 Sep 22;12(9):e0184970.
266. O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 20;108(38):16002–7.
267. Duda DG, Duyverman AMMJ, Kohno M, Snuderl M, Steller EJA, Fukumura D, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Dec 14;107(50):21677–82.
268. Cai H ping, Wang J, Xi S yan, Ni X rong, Chen Y sheng, Yu Y jiao, et al. Tenascin-c mediated vasculogenic mimicry formation via regulation of MMP2/MMP9 in glioma. *Cell Death Dis*. 2019 Nov 21;10(12):1–14.
269. Webb AH, Gao BT, Goldsmith ZK, Irvine AS, Saleh N, Lee RP, et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma. *BMC Cancer*. 2017 Jun 20;17:434.
270. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 2000 Jan 15;14(2):163–76.
271. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The Degradation of Human Endothelial Cell-derived Perlecan and Release of Bound Basic Fibroblast Growth Factor by Stromelysin, Collagenase, Plasmin, and Heparanases (\*). *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):10079–86.
272. Chen S, Morine Y, Tokuda K, Yamada S, Saito Y, Nishi M, et al. Cancer-associated fibroblast-induced M2-polarized macrophages promote hepatocellular carcinoma progression via the plasminogen activator inhibitor-1 pathway. *Int J Oncol*. 2021 Aug;59(2):59.
273. Raskov H, Orhan A, Gaggar S, Gögenur I. Cancer-Associated Fibroblasts and Tumor-Associated Macrophages in Cancer and Cancer Immunotherapy. *Front Oncol*. 2021;11:668731.
274. Rotondo R, Barisione G, Mastracci L, Grossi F, Orengo AM, Costa R, et al. IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2009 Aug 15;125(4):887–93.
275. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Jan 15;168(2):689–95.
276. Talts JF, Wirl G, Dictor M, Muller WJ, Fassler R. Tenascin-C modulates tumor stroma and monocyte/macrophage recruitment but not tumor growth or metastasis in a mouse strain with spontaneous mammary cancer. *J Cell Sci*. 1999 Jun 15;112(12):1855–64.

277. Suzuki J, Aokage K, Neri S, Sakai T, Hashimoto H, Su Y, et al. Relationship between podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts and the immune microenvironment of early lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer Amst Neth*. 2021 Mar;153:1–10.
278. Jachetti E, Caputo S, Mazzoleni S, Brambillasca CS, Parigi SM, Grioni M, et al. Tenascin-C Protects Cancer Stem-like Cells from Immune Surveillance by Arresting T-cell Activation. *Cancer Res*. 2015 May 15;75(10):2095–108.
279. Song X, Si Q, Qi R, Liu W, Li M, Guo M, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1: A Promising Therapeutic Target in Malignant Tumor. *Front Immunol*. 2021;12:800630.
280. Heng B, Lim CK, Lovejoy DB, Bessede A, Gluch L, Guillemin GJ. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. *Oncotarget*. 2015 Dec 4;7(6):6506–20.
281. Bilir C, Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller? *J Oncol Sci*. 2017 Jul 1;3(2):52–6.
282. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med*. 2001 Oct;7(10):1118–22.
283. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res*. 2001 Jan 1;61(1):237–42.
284. Tie Y, Tang F, Wei Y quan, Wei X wei. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2022 May 18;15(1):61.
285. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Mar 1;49(3):187–98.
286. Cheng G, Fan X, Hao M, Wang J, Zhou X, Sun X. Higher levels of TIMP-1 expression are associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer*. 2016 Apr 30;15:30.
287. Song G, Xu S, Zhang H, Wang Y, Xiao C, Jiang T, et al. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Sep 20;35(1):148.
288. Shou Y, Liu Y, Xu J, Liu J, Xu T, Tong J, et al. TIMP1 Indicates Poor Prognosis of Renal Cell Carcinoma and Accelerates Tumorigenesis via EMT Signaling Pathway. *Front Genet*. 2022;13:648134.
289. Ando T, Charindra D, Shrestha M, Umehara H, Ogawa I, Miyauchi M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes cell proliferation through YAP/TAZ activation in cancer. *Oncogene*. 2018 Jan;37(2):263–70.

290. Wang T, Yamashita K, Iwata K, Hayakawa T. Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 9;296(1):201–5.
291. Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HRC. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 2006 Sep 6;25(17):3934–42.
292. LAMBERT E, BOUDOT C, KADRI Z, SOULA-ROTHHUT M, SOWA ML, MAYEUX P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J.* 2003 Jun 15;372(3):767–74.
293. Petitfrère E, Kadri Z, Boudot C, Sowa ML, Mayeux P, Haye B, et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced erythroid differentiation. *FEBS Lett.* 2000;485(2–3):117–21.
294. Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6267–75.
295. Ma DM, Luo DX, Zhang J. SDF-1/CXCR7 axis regulates the proliferation, invasion, adhesion, and angiogenesis of gastric cancer cells. *World J Surg Oncol.* 2016 Oct 6;14:256.
296. Cun Y, Diao B, Zhang Z, Wang G, Yu J, Ma L, et al. Role of the stromal cell derived factor-1 in the biological functions of endothelial progenitor cells and its underlying mechanisms. *Exp Ther Med.* 2021 Jan 1;21(1):1–1.
297. Li X, Ma Q, Xu Q, Liu H, Lei J, Duan W, et al. SDF-1/CXCR4 signaling induces pancreatic cancer cell invasion and epithelial–mesenchymal transition in vitro through non-canonical activation of Hedgehog pathway. *Cancer Lett.* 2012 Sep 28;322(2):169–76.
298. Fang WB, Jokar I, Zou A, Lambert D, Dendukuri P, Cheng N. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 2012 Oct 19;287(43):36593–608.
299. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000 Oct;2(10):737–44.
300. Liu X, Bi L, Wang Q, Wen M, Li C, Ren Y, et al. miR-1204 targets VDR to promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Oncogene.* 2018 Jun;37(25):3426–39.
301. Wu HT, Zhong HT, Li GW, Shen JX, Ye QQ, Zhang ML, et al. Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor ZEB1 in breast cancer. *J Transl Med.* 2020 Feb 3;18(1):51.
302. Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001 Oct;6(4):419–29.

303. Khongsti K, Das B. Osteopontin and breast cancer metastasis: Possible role of genistein on the regulation of osteopontin. *Phytomedicine Plus*. 2021 Nov 1;1(4):100138.
304. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019 Sep 20;8(10):1118.
305. Matsumura Y, Ito Y, Mezawa Y, Sulidan K, Daigo Y, Hiraga T, et al. Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial–mesenchymal plasticity. *Life Sci Alliance*. 2019 Jul 22;2(4):e201900425.

**SPIS RYCIN I TABEL**

- Rycina 1. Klasyfikacja molekularna nowotworów złośliwych gruczołu sutkowego. Opracowanie własne.
- Rycina 2. Mechanizmy aktywności kalcytriolu w komórkach raka gruczołu sutkowego. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.
- Rycina 3. Skład mikrośrodowiska nowotworowego. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.
- Rycina 4. Pochodzenie fibroblastów towarzyszących nowotworom. Opracowanie własne za pomocą Bioender, na podstawie [119].
- Rycina 5. Funkcje CAFs. Opracowanie własne.
- Rycina 6. Schemat eksperymentu in vivo. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.
- Rycina 7. Schemat eksperymentu ex vivo. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.
- Rycina 8. Porównanie poziomu wybranych białek w mysich guzach za pomocą testów ELISA.
- Rycina 9. Ocena wpływu diety o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> oraz podań kalcytriolu na stężenie wybranych białek w mysich guzach za pomocą testów ELISA.
- Rycina 10. Strategia bramkowania podczas analizy cytometrycznej mysich CAFs.
- Rycina 11. Przykładowe wykresy poziomu analizowanych białek typowych dla mysich CAFs.
- Rycina 12. Porównanie poziomu wybranych białek między CAFs pochodzącymi z guzów myszy obciążonych komórkami różnych mysich raków gruczołu sutkowego.
- Rycina 13. Strategia bramkowania podczas analizy cytometrycznej NFs płuc myszy obciążonych nowotworem. Przykładowe wykresy poziomu wybranych białek dla NFs myszy obciążonych nowotworem.
- Rycina 14. Porównanie poziomu wybranych białek między NFs płuc myszy obciążonych rakami gruczołu sutkowego.
- Rycina 15. Wpływ karmienia dietą z różną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w CAFs izolowanych z guzów raków gruczołu sutkowego.
- Rycina 16. Wpływ karmienia dietą z różną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i podawania kalcytriolu na poziom wybranych białek w NFs izolowanych z płuc myszy obciążonych rakami gruczołu sutkowego.



Rycina 17. Przykładowe wykresy obrazujące poziom analizowanych białek na NFs płuc myszy zdrowych.

Rycina 18. Porównanie poziomu wybranych białek między NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c i C57BL/6.

Rycina 19. Porównanie poziomu wybranych białek między NFs pochodzącymi z płuc myszy zdrowych karmionych dietą z różną zawartością witaminy D<sub>3</sub> i lub traktowanych kalcytriolem.

Rycina 20. Porównanie poziomu wybranych białek na aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem.

Rycina 21. Porównanie poziomu wybranych białek na aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu C57BL/6 karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem.

Rycina 22. Porównanie poziomu receptora witaminy D<sub>3</sub> (VDR) metodą immunofluorescencji w aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c (A) i C57BL/6 (B) karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem.

Rycina 23. Porównanie poziomu białka aktywacji fibroblastów (FAP) metodą immunofluorescencji w aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c (A) i C57BL/6 (B) karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem.

Rycina 24. Porównanie ekspresji mRNA wybranych genów w aktywowanych NFs płuc myszy zdrowych karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem.

Rycina 25. Porównanie żywotności komórek linii 4T1, 67NR i E0771 stymulowanych medium kondycjonowanym (CM) znad NFs płuc myszy zdrowych karmionych dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych doustnie kalcytriolem.

Rycina 26. . Porównanie zdolności komórek 4T1 do tworzenia kolonii po stymulacji medium kondycjonowanym (CM) znad aktywowanych TGFβ1 NFs płuc myszy zdrowych szczepu BALB/c karmionych dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych kalcytriolem doustnie.

Rycina 27. Porównanie zdolności komórek 67NR do tworzenia kolonii po stymulacji medium kondycjonowanym (CM) znad aktywowanych TGFβ1 NFs płuc myszy

zdrowych szczepu BALB/c karmionych dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych kalcytriolem doustnie.

Rycina 28. Porównanie zdolności komórek E0771 do tworzenia kolonii po stymulacji medium kondycjonowanym (CM) znad aktywowanych TGFβ1 NFs płuc myszy zdrowych szczepu C57BL/6 karmionych dietą o zróżnicowanej zawartości witaminy D<sub>3</sub> i traktowanych kalcytriolem doustnie.

Rycina 29. Porównanie poziomu OPN i TGFβ1 w guzach pacjentek o różnym statusie menopauzalnym, poziomie 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu, obecności przerzutów.

Rycina 30. Ekspresja wimentyny w cytoplazmie CAFs (n=24). Niestymulowane kalcytriolem komórki oceniono pod kątem ekspresji wimentyny przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX81 (Olympus, Warszawa, Polska) i oprogramowania CellSense (Olympus, Warszawa, Polska).

Rycina 31. Strategia bramkowania wyseparowanych ludzkich CAFs podczas analiz z zastosowaniem cytometrii przepływowej.

Rycina 32. Przykładowe wykresy poziomu białek typowych dla ludzkich CAFs. Analizie poddano komórki o fenotypie CD31<sup>-</sup> EpCAM<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>.

Rycina 33. Porównanie poziomu wybranych białek w świeżo wyseparowanych CAFs pochodzących z guzów od pacjentek.

Rycina 34. Ocena aktywności antyproliferacyjnej kalcytriolu w hodowlach ludzkich CAFs.

Rycina 35. Wpływu kalcytriolu na żywotność CAFs z hodowli pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych.

Rycina 36. Wpływ kalcytriolu na poziom białek typowych dla CAFs oceniony za pomocą cytometrii przepływowej (n=51).

Rycina 37. Wpływ kalcytriolu na poziom białek typowych dla CAFs od pacjentek przed (n=18) i po menopauzie (n=33) oceniony za pomocą cytometrii przepływowej.

Rycina 38. Wpływ kalcytriolu na poziom receptora witaminy D<sub>3</sub> (VDR) w CAFs (n=53) oceniony metodą immunofluorescencji.

Rycina 39. Wpływ kalcytriolu na poziom białka aktywacji fibroblastów (FAP) w CAFs (n=53) oceniony metodą immunofluorescencji.

Rycina 40. Macierz ekspresji 61 genów dla wybranych 19 hodowli CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem przez 72h.

Rycina 41. Wpływ kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów w lizatach CAFs (n=44).

Rycina 42. Wpływ kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów w lizatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych.

Rycina 43. Wpływ kalcytriolu na produkcję wybranych białek przez CAFs (n=51) oceniony przy pomocy testów ELISA.

Rycina 44. Wpływ kalcytriolu na produkcję wybranych białek przez CAFs pochodzące od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych oceniony przy pomocy testów ELISA.

Rycina 45. Wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek w lizatach CAFs (n=35). CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h.

Rycina 46. Wpływu kalcytriolu na poziom wybranych białek w lizatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych.

Rycina 47. Wpływ kalcytriolu na aktywność metaloproteinazy 2 (MMP2) i metaloproteinazy 9 (MMP9) w lizatach CAFs.

Rycina 48. Wpływ kalcytriolu na aktywność metaloproteinazy 2 (MMP2) i metaloproteinazy 9 (MMP9) w lizatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych.

Rycina 49. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem na migrację ludzkich komórek nowotworowych linii MCF-7 (A) i MDA-MB-231 (B).

Rycina 50. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na migrację ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MCF-7.

Rycina 51. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem na poziom E-kadheryny, OPN i ZEB1 w lizatach komórek linii MCF-7.

Rycina 52. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na poziom wybranych białek w ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MCF-7.

Rycina 53. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem na poziom E-kadheryny, OPN i ZEB1 w lizatach komórek linii MDA-MB-231.

Rycina 54. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na poziom wybranych białek w ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231.

Tabela 1. Odczynniki zastosowane w badaniach oraz ich pochodzenie.

Tabela 2. Charakterystyka komórek raka gruczołu sutkowego zastosowanych w eksperymentach.

Tabela 3. Skład medium hodowlanych dla poszczególnych hodowli komórkowych.

Tabela 4. Lista zestawów ELISA wykorzystanych do analizy poziomu białek w lizatach z mysich guzów.

Tabela 5. Zastosowane markery do analizy fenotypu fibroblastów mysich. Wykorzystane przeciwciała, pochodzenie i producent.

Tabela 6. Zastosowane sondy do analizy ekspresji genów w komórkach fibroblastów płuc myszy zdrowych stymulowanych TGF $\beta$ 1 oraz mediami kondycjonowanymi znad komórek nowotworowych.

Tabela 7. Spis odczynników i ich objętości niezbędnych do przygotowania 10% żelu poliakryloamidowego.

Tabela 8. Spis przeciwciał zastosowanych w analizie poziomu białka w lizatach guzów pacjentek metodą Western-blot, ich producenci i zastosowane rozcieńczenia.

Tabela 9. Zastosowane markery do analizy fenotypu ludzkich CAFs. Wykorzystane przeciwciała, pochodzenie i producent.

Tabela 10. Spis genów i odpowiadającym im sond wykorzystanych do przesiewowej analizy ekspresji mRNA CAFs za pomocą macierzy PCR.

Tabela 11. Lista genów i odpowiadających im sond zastosowanych celem analizy ekspresji mRNA w CAFs stymulowanych kalcytriolem metodą Real-time PCR.

Tabela 12. Lista zestawów ELISA wykorzystanych do analizy poziomu białek wydzielanych przez CAFs.

Tabela 13. Spis przeciwciał zastosowanych w analizie poziomu białka w lizatach CAFs metodą Western-blot, ich producenci i zastosowane rozcieńczenia.

Tabela 14. Spis odczynników i ich objętości niezbędnych do przygotowania 7% żelu poliakryloamidowego.

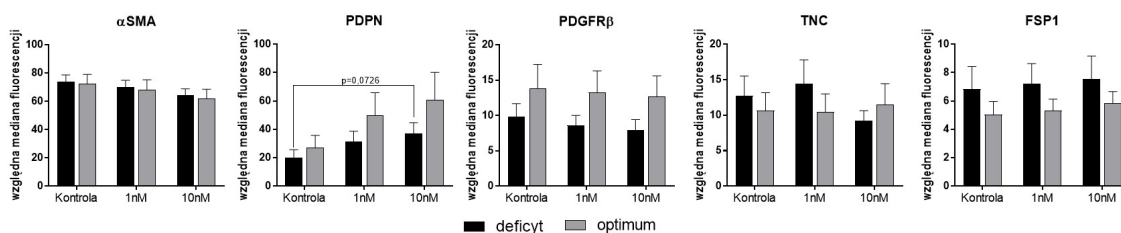
Tabela 15. Spis przeciwciał zastosowanych w analizie poziomu białka w lizatach MDA-MB-231 oraz MCF-7 metodą Western-blot, ich producenci i zastosowane rozcieńczenia.

Tabela 16. Charakterystyka kliniczna pacjentek włączonych do poszczególnych eksperymentów.

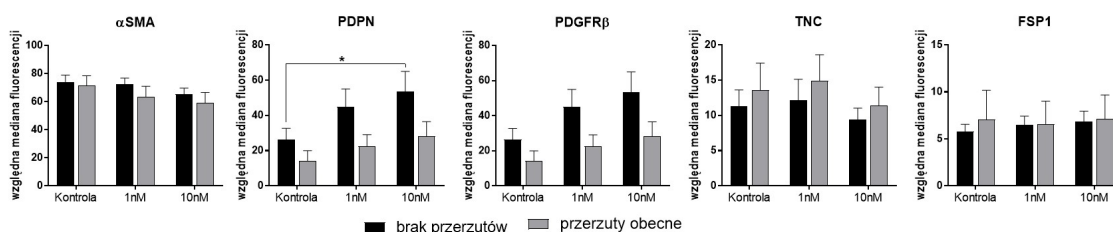
Tabela 17. Podsumowanie wyników dla fibroblastów płuc myszy zdrowych stymulowanych TGF $\beta$ 1 i medium znad komórek nowotworowych. Dane dotyczą porównania wobec komórek niestymulowanych.

Tabela 18. Podsumowanie wyników dla fibroblastów płuc myszy zdrowych stymulowanych TGF $\beta$ 1 i medium znad komórek nowotworowych. Dane dotyczą porównania wobec fibroblastów myszy z grupy 1000IU.

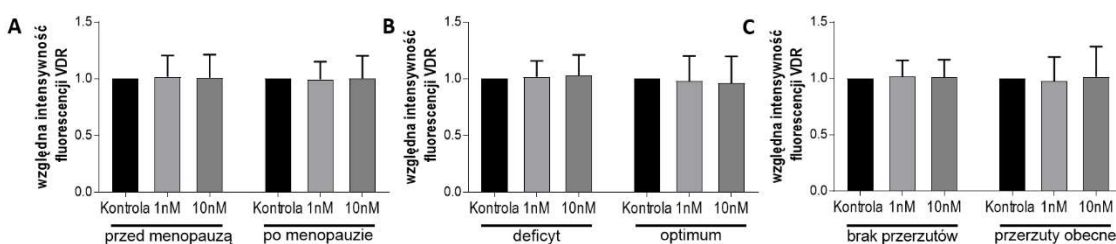
## ZAŁĄCZNIK DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ



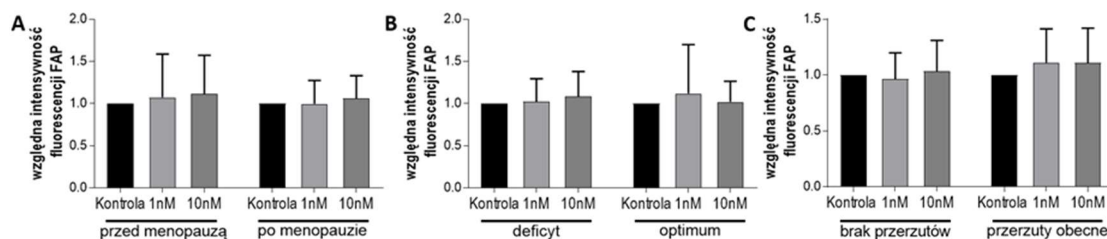
**Rycina Z 1.** Wpływ kalcytriolu na poziom białek typowych dla CAFs od pacjentek z deficytem ( $n=33$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=18$ ) witaminy D<sub>3</sub> w osoczu oceniony za pomocą cytometrii przepływowej. Poziom badanych białek przedstawiono jako względną medianę fluorescencji. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>.  $\alpha$ SMA -  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, PDPN - podoplanina, PDGFR $\beta$  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ , TNC - tenascyna C, FSP1 – białko specyficzne dla fibroblastów. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy w oparciu o stężenie "metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu, <30ng/ml klasyfikowało pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”. CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



**Rycina Z 2.** Wpływ kalcytriolu na poziom białek typowych dla CAFs od pacjentek z przerzutującym ( $n=16$ ) i nieprzerzutującym ( $n=35$ ) nowotworem oceniony za pomocą cytometrii przepływowej. Poziom badanych białek przedstawiono jako względną medianę fluorescencji. Analizie poddano komórki EpCAM<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>.  $\alpha$ SMA -  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich, PDPN - podoplanina, PDGFR $\beta$  - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu  $\beta$ , TNC - tenascyna C, FSP1 – białko specyficzne dla fibroblastów. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy w oparciu o obecność dowolnych przerzutów - obecność przerzutów odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N) – klasyfikowało pacjentkę do grupy „przerzuty obecne”. CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. Medianę fluorescencji próby barwionej normalizowano względem kontroli izotypowej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



**Rycina Z 3.** Wpływ kalcytriolu na poziom receptora witaminy D (VDR) oceniany metodą immunofluorescencji w CAFs pacjentek zróżnicowanych cechach klinicznych. A – porównanie hodowli od pacjentek przed ( $n=18$ ) i po menopauzie ( $n=33$ ). B – pacjentek z deficytem ( $n=36$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=15$ ) witaminy D<sub>3</sub>. C – pacjentek z nowotworem przerzutującym ( $n=16$ ) i nieprzerzutującym ( $n=36$ ). Poziom VDR przedstawiono jako względną intensywność fluorescencji. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikowało pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$ ng/ml do grupy „optimum”, w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. komórki utrwalano w 4% formaldehydzie i barwiono przy pomocy przeciwciała: pierwszorzędowego króliczego anti-VDR i drugorzędowego anti-króliczego skoniugowanego z fluorochromem Alexa Fluor 488. Względna intensywność fluorescencji obliczona na podstawie średniej fluorescencji (CTCF) dla hodowli stymulowanej kalcytriolem znormalizowanej do kontroli średniej fluorescencji kontroli niestymulowanej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

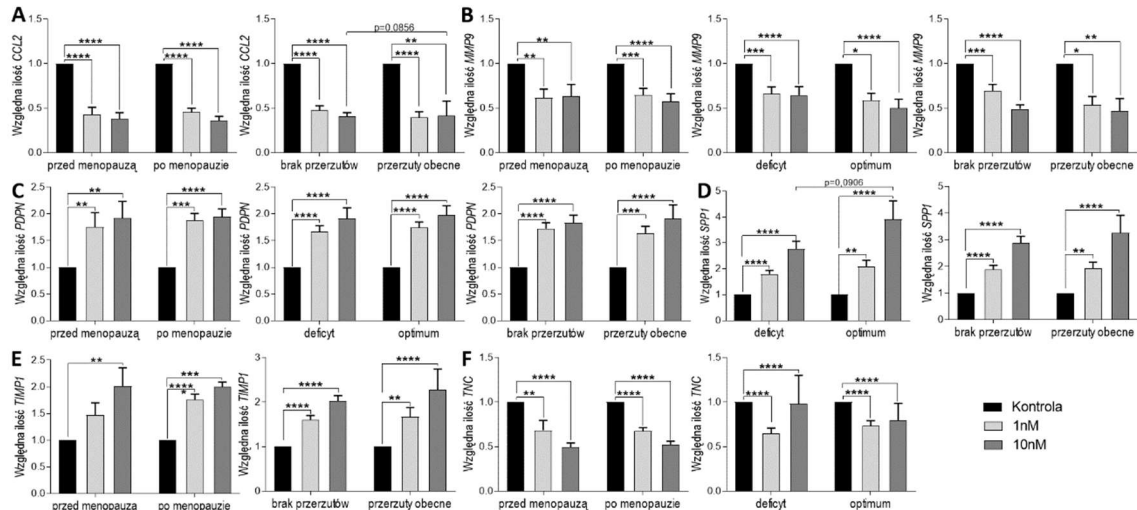


**Rycina Z 4.** Wpływ kalcytriolu na ekspresję białka aktywności fibroblastów (FAP) oceniony metodą immunofluorescencji w CAFs pacjentek o różnorodnych cechach klinicznych. A – porównanie hodowli od pacjentek przed (n= 18) i po menopauzie (n=33). B – pacjentek z deficytem (n=36) i prawidłowym poziomem (n=15) witaminy D<sub>3</sub>. Poziom FAP przedstawiono jako względną intensywność fluorescencji. Pacjentki zostały podzielone na grupy: A. w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”. B. w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> <30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”. C. w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano kalcytriolem (1nM i 10nM) przez 72h. komórki utrwalano w 4% formaldehydzie i barwiono przy pomocy przeciwciał: pierwszorzędowego króliczego anti-FAP i drugorzędowego anti-króliczego skoniugowanego z fluorochromem Alexa Fluor 488. Względna intensywność fluorescencji obliczona na podstawie średniej fluorescencji (CTCF) dla hodowli stymulowanej kalcytriolem znormalizowanej do kontroli średniej fluorescencji kontroli niestymulowanej. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± odchylenie standardowe. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań. \* ≤ 0,05, \*\* ≤ 0,01, \*\*\* ≤ 0, 001 i \*\*\*\* ≤ 0,0001.

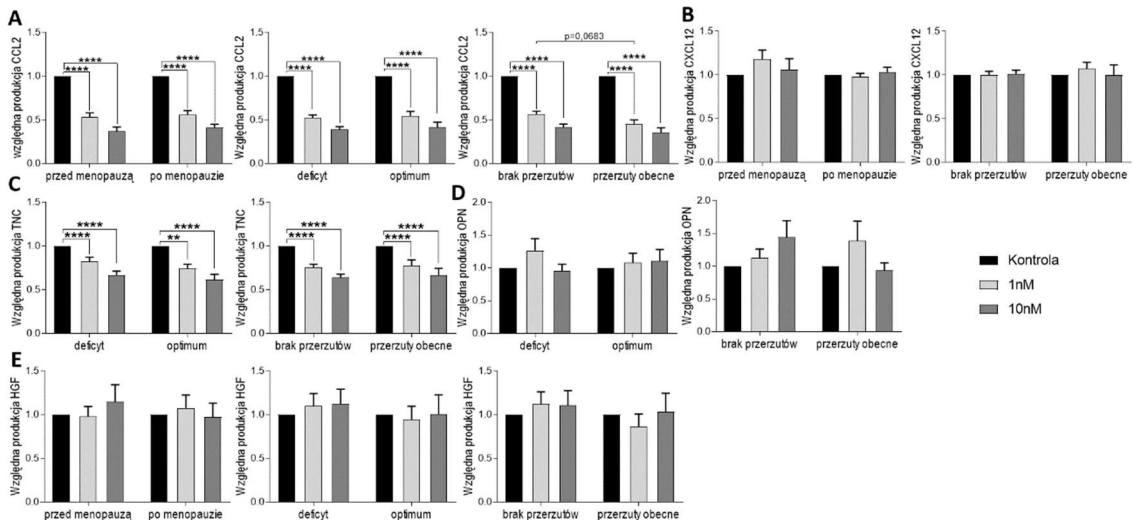
geny	po menopauzie										przed menopauzą										geny	po menopauzie										przed menopauzą									
	CAFs 067	CAFs 063	CAFs 051	CAFs 043	CAFs 040	CAFs 006	CAFs 016	CAFs 023	CAFs 024	CAFs 032	CAFs 036	CAFs 041	CAFs 047	CAFs 048	CAFs 065	CAFs 088	CAFs 093	CAFs 094	CAFs 097	CAFs 067		CAFs 063	CAFs 051	CAFs 043	CAFs 040	CAFs 006	CAFs 016	CAFs 023	CAFs 024	CAFs 032	CAFs 036	CAFs 041	CAFs 047	CAFs 048	CAFs 065	CAFs 088	CAFs 093	CAFs 094	CAFs 097		
ACTA2	1,02	1,21	0,77	0,90	0,99	0,84	1,18	0,87	1,10	1,21	0,85	1,72	1,04	1,30	1,09	1,14	1,00	0,92	1,18	MMP9	1,04	1,02	0,98	0,85	1,20	0,81	1,58	1,09	1,14	1,07	1,03	1,11	0,82	0,81	1,15	0,84	0,79	2,30			
ACTB	0,44	0,88	1,60	0,41	0,76	0,89	0,42	1,16	0,94	2,05	0,58	0,88	0,56	0,60	0,46	0,81	0,80	0,57	0,72	MMP9	33,98	0,69	0,40	0,08	0,51	0,18	1,19	0,59	1,45	1,66	0,33	1,69	0,29	0,32	0,48	35,57	0,21	0,25			
CAV1	0,85	1,21	1,20	0,85	0,89	1,05	0,88	1,17	0,80	1,56	0,87	0,92	0,96	0,86	1,04	1,01	0,78	1,01	0,98	MMP11	0,48	0,72	0,97	0,57	1,56	0,79	0,99	1,04	0,76	0,66	1,09	1,07	0,98	1,53	1,37	1,31	0,66	1,35	0,92		
CCL2	0,46	0,75	0,47	0,34	0,10	0,65	0,35	0,53	2,02	1,35	0,53	0,31	0,47	0,48	0,23	0,40	0,23	0,32	0,93	NFKB1	1,01	0,91	1,63	0,71	0,90	0,42	0,79	0,90	0,87	2,19	0,84	0,96	0,45	0,75	0,75	0,34	0,84	0,76	1,60		
CDH1	31,06	30,51	1,97	33,30	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	30,75	0,45	0,45	34,53	23,26	0,66	1,11	0,45	0,45	0,45	PDGFA	0,85	1,26	1,79	0,77	0,81	0,60	0,60	0,63	1,11	1,11	0,85	1,93	0,84	0,64	0,54	2,07	0,84	0,81	0,20		
CDKN1A	0,75	0,87	1,23	0,87	0,69	1,12	0,68	0,87	1,16	1,60	0,88	1,01	1,29	1,01	0,97	0,97	0,84	0,99	1,00	PDGFB	26,44	33,66	0,90	35,54	35,34	35,54	35,50	35,53	34,14	34,03	34,03	34,03	34,03	34,03	34,03	34,03	34,03	34,03	34,03		
CDKN2A	0,57	1,00	1,24	0,78	0,53	0,80	0,49	0,71	0,80	2,32	0,77	1,73	0,66	0,57	0,75	0,90	0,73	0,72	0,58	PDPN	1,76	2,10	1,67	1,43	2,16	1,54	1,84	1,40	0,73	1,71	1,70	1,69	1,29	2,36	2,25	1,65	1,70	1,46	2,38		
CSF1	1,09	1,95	1,57	1,04	1,02	0,74	0,81	0,79	1,15	1,17	0,90	0,89	0,61	1,19	1,08	0,97	1,32	0,93	1,08	PECAM1	0,67	1,16	1,22	0,93	0,67	1,07	2,04	1,23	0,76	1,04	1,39	1,09	1,25	1,87	1,24	0,44	0,83	0,85	1,82		
CTGF	1,41	1,24	0,89	0,61	1,32	0,68	0,77	0,87	0,95	2,01	1,05	0,65	1,03	0,62	0,48	1,41	1,30	1,14	1,06	PI3K	1,27	1,75	1,04	0,90	2,20	1,13	1,23	2,29	0,80	0,40	2,01	0,55	1,60	2,11	2,71	1,34	1,56	1,47	2,70		
CXCL1	1,09	1,13	1,06	0,84	1,59	0,65	0,70	1,72	1,10	1,36	1,04	1,41	1,30	1,17	0,73	1,48	0,94	1,06	0,85	PTEN	0,56	1,54	1,51	0,67	0,88	0,48	0,73	1,27	0,72	2,31	0,87	1,04	0,61	1,17	0,84	0,91	0,73	0,90	0,87		
CXCL2	0,90	1,05	1,37	0,80	0,94	0,36	0,91	0,95	0,89	1,71	0,86	1,00	1,08	1,21	1,17	1,32	0,76	1,01	1,31	PTGS2	0,64	0,98	1,63	0,85	0,87	0,90	0,97	0,86	1,12	1,49	0,76	1,15	1,73	0,67	0,53	2,49	1,05	0,85	0,72		
CXCL12	0,87	1,52	1,73	1,05	1,27	0,57	1,67	1,53	0,74	1,78	1,10	2,15	0,85	1,10	1,55	1,56	1,20	0,80	0,93	RARA	0,80	1,58	1,26	0,63	0,83	0,71	0,71	0,92	0,79	1,45	0,85	1,15	0,80	0,84	1,27	1,05	1,02	0,94	1,38		
CYP2A1	10,76	22,34	22,21	23,85	24,86	26,68	19,74	27,58	23,08	25,11	0,72	10,24	24,57	21,70	26,35	24,18	25,02	24,93	1,28	RXRα	0,94	1,43	1,34	0,87	0,99	0,77	0,66	0,81	0,95	1,00	0,87	0,83	1,01	0,92	0,91	1,18	1,04	0,90	0,82		
CYP27B1	1,16	1,37	0,75	0,92	0,98	0,84	0,81	0,92	0,83	1,12	1,19	0,70	1,35	0,55	0,97	0,82	0,63	0,77	1,28	S100A4	0,90	81/23	1,08	1,05	1,01	1,59	0,76	1,30	0,90	0,30	0,74	0,38	1,56	1,22	1,03	0,87	0,60	0,95	1,26		
CYR61	1,03	1,58	1,31	0,62	1,22	0,55	0,71	0,83	1,40	1,85	0,95	0,87	0,94	0,89	0,59	1,13	1,07	0,90	0,74	SDHA	0,81	1,16	0,98	0,70	0,93	0,98	0,95	1,12	0,99	1,35	0,98	1,13	0,78	0,69	0,84	0,98	0,88	0,82	1,01		
DES	1,16	0,67	1,26	0,25	35,26	0,64	1,77	1,28	0,38	2,00	1,63	0,45	0,68	0,50	0,36	1,20	0,31	0,47	34,84	SHH	35,03	0,41	0,20	34,45	34,62	1,55	35,47	34,71	2,15	35,47	33,95	30,53	33,11	34,66	33,49	35,49	32,05	33,49	33,49		
FAP	0,92	1,02	1,14	0,78	0,98	0,78	1,12	1,24	1,01	2,47	0,98	1,22	1,14	0,82	0,71	1,05	0,73	0,89	1,12	SPARC	0,99	1,25	1,07	0,88	1,26	1,43	1,10	1,28	1,11	1,99	1,02	1,38	0,83	0,98	1,06	0,93	0,95	1,00	1,15		
FGF2	0,70	1,41	1,41	0,57	0,77	0,36	0,58	0,69	0,67	1,41	0,74	1,29	0,84	1,13	0,72	0,89	0,72	0,82	0,98	SPP1	1,00	1,04	1,11	2,61	2,35	0,77	2,01	0,74	0,47	29,43	30,04	31,17	31,41	2,73	1,86	2,10	2,28	1,55	1,63		
FGF7	0,77	1,81	0,82	0,64	0,90	0,21	0,55	1,08	0,56	0,71	0,94	0,78	1,49	1,18	0,98	0,88	0,77	0,85	1,29	TGFB1	0,98	1,20	0,81	0,88	1,12	0,70	1,08	1,07	0,93	0,80	1,07	0,80	1,07	1,00	1,37	1,07	1,11	0,91	1,15		
FN1	1,21	1,52	1,02	0,98	1,31	0,63	1,35	1,26	0,56	1,58	1,29	1,33	1,28	0,97	1,47	1,04	1,01	1,03	1,16	TGFB2	0,85	1,20	1,13	0,78	0,98	1,30	1,11	1,15	0,81	1,28	0,84	0,84	1,06	0,94	1,50	1,15	0,95	1,08	1,52		
HAS2	0,99	1,92	1,36	0,88	1,19	0,91	1,17	1,00	0,69	1,56	1,15	1,14	1,10	1,00	1,49	1,35	1,15	1,25	1,72	THBS1	0,90	1,48	1,02	0,39	1,86	0,56	0,50	0,47	1,29	1,78	0,56	0,96	1,38	0,41	0,34	1,35	1,51	1,27	1,61		
HGF	0,45	1,28	1,03	0,48	0,72	0,35	0,47	1,01	0,66	0,34	0,56	0,33	0,89	0,60	0,68	0,79	0,51	0,96	1,17	THY1	0,80	1,21	1,38	0,72	1,04	0,85	1,08	1,02	1,10	0,96	0,94	1,22	0,81	0,66	0,96	1,49	0,79	0,90	1,51		
IDO1	0,26	35,22	0,21	0,14	34,41	0,10	34,11	2,22	0,14	35,06	0,79	0,48	0,19	0,20	0,60	0,48	0,19	0,20	0,60	TIMP1	1,55	2,27	1,59	2,13	1,73	1,34	2,91	2,48	0,47	1,11	2,37	1,51	2,09	1,95	1,66	1,63	1,58	1,55	1,79		
IGF2	0,30	1,10	0,31	0,74	0,28	0,98	0,98	0,98	0,98	32,04	0,84	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	TNC	0,69	0,93	0,49	0,61	0,85	0,33	0,90	0,88	1,43	0,55	0,68	0,67	0,69	0,61	0,87	0,64	0,54	0,58	0,58		
IL1B	0,65	0,53	0,95	0,51	0,86	0,53	0,51	0,79	2,13	0,74	1,98	0,89	0,75	0,58	0,80	0,72	0,69	0,84	TP53	0,85	1,21	1,33	0,58	0,81	0,67	0,68	0,72	1,47	2,17	0,89	1,03	1,07	0,90	0,68	1,37	1,10	0,93	0,89			
IL6	0,95	0,96	0,93	0,25	0,73	0,17	0,93	0,63	1,59	1,05	0,83	1,39	0,93	0,53	1,74	1,15	1,18	0,93	0,86	TSP1	0,62	1,41	1,14	1,44	0,69	0,22	1,20	1,18	0,60	2,53	1,04	2,63	0,91	2,51	1,50	1,11	1,01	0,60	0,44		
LAMA1	1,72	1,37	1,54	0,68	0,85	0,82	0,61	0,81	0,82	1,02	0,79	0,51	0,60	0,51	0,66	0,93	0,86	0,92	1,29	VDR	0,69	0,89	1,22	0,66	0,78	0,84	0,58	0,83	1,17	2,68	0,80	1,09	0,76	1,05	0,91	0,89	0,94	0,81	0,73		
LOX	1,20	1,94	0,90	0,77	1,18	0,82	1,10	1,16	0,63	1,44	1,50	1,18	0,91	1,41	1,05	1,08	1,16	0,86	VEGFA	1,04	1,82	1,04	0,85	0,85	0,66	1,05	1,11	0,67	1,41	1,24	1,01	0,88	1,04	1,39	0,97	1,04	0,92	1,37			
MMP1	0,69	2,16	0,89	0,76	0,92	0,76	1,81	0,83	0,90	0,25	1,43	0,16	0,91	0,85	0,95	1,38	1,11	0,75	0,35																						

**Rycina Z 5.** Macierz ekspresji 61 genów dla wybranych 19 hodowli CAFs stymulowanych 10nM kalcytriolem przez 72h: od pacjentek przed menopauzą (n=14), od pacjentek po menopauzie (n=5). W tabeli zamieszczono wartości RQ (krotność zmian ekspresji, względną ilość mRNA) które policzono za pomocą metody porównawczej ΔΔCt względem kontroli endogennych – GAPDH i RPLP0 – oraz kalibratora – CAFs niestymulowanych kalcytriolem w oprogramowaniu QuantStudio™ Real-Time PCR Software oraz ExpressionSuite Software. Dla CAFs, dla których RQ było nieobliczalne ze względu z wartości Ct (wartość progowa cyklu) dla komórek niestymulowanych lub stymulowanych, przedstawiono wartości Ct, które zostały oznaczone - na rycinie zaznaczono kolorami żółtym (Ct obliczone tylko dla CAFs niestymulowanych) lub zielonym (Ct oznaczone tylko dla CAFs stymulowanych kalcytriolem). Czarny kolor reprezentuje próbki, dla których nie udało się wyznaczyć żadnej wartości Ct (ani dla komórek niestymulowanych ani dla stymulowanych).



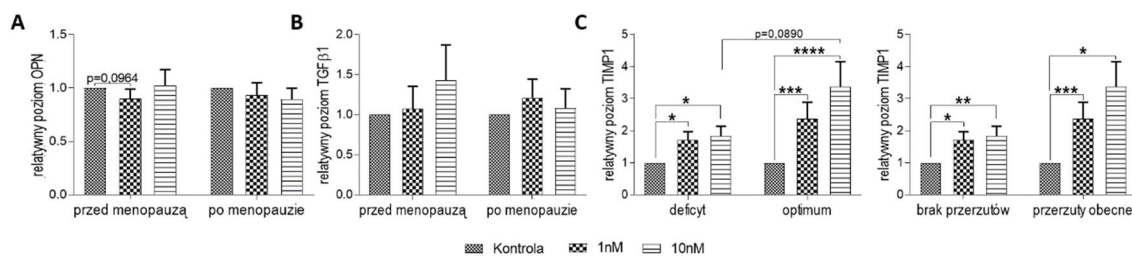


**Rycina Z 6. Wpływ kalcytriolu na ekspresję mRNA wybranych genów w lizatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych:** pacjentek przed ( $n=16$ ) i po menopauzie ( $n=28$ ), pacjentek z deficytem ( $n=29$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=15$ ) witaminy  $D_3$  oraz pacjentek z nowotworem przerzutowującym ( $n=15$ ) i nieprzerzutowującym ( $n=29$ ). A - CCL2 (ligand 2 chemokiny motywu C-C), B - MMP9 (metaloproteinaza 9), C - PDPN (podoplanina), D - SPP1 (wydzielana fosfoproteina 1), E - TIMP1 (tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1) i E - TNC (tenascyna C). Ekspresję mRNA przedstawiono jako względną ilość mRNA – wyniki analizowano metodą porównawczą  $\Delta\Delta Ct$  i normalizowano względem kontroli niestymulowanej. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu:  $FSH > 25,8$  mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy  $D_3$  –  $25(OH)D_3$  w osoczu:  $25(OH)D_3 < 30$  ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$  ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney’a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

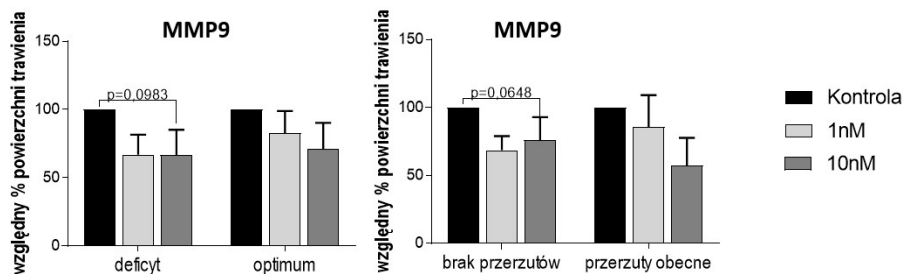


**Rycina Z 7. Wpływ kalcytriolu na produkcję wybranych białek przez CAFs pochodzące od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych przy pomocy testów ELISA:** przed ( $n=18$ ) i po menopauzie ( $n=33$ ), z deficytem ( $n=33$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=17$ ) witaminy  $D_3$  oraz z nowotworem przerzutowującym ( $n=16$ ) i nieprzerzutowującym ( $n=35$ ). A - CCL2 (ligand chemokiny motywu C-C 2), B - TNC (tenascyna C), C - CXCL12 (ligand chemokiny motywu C-X-C 12), D - OPN (osteopontyna) i E - HGF (czynnik wzrostu hepatocytów). Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu:  $FSH > 25,8$  mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy  $D_3$  –  $25(OH)D_3$  w osoczu:  $25(OH)D_3 < 30$  ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30$  ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Poziom wydzielanych białek obliczono w oparciu o krzywą za pomocą oprogramowania CutveExpert 1.4. Poziom wydzielanych białek normalizowano wobec kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney’a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .

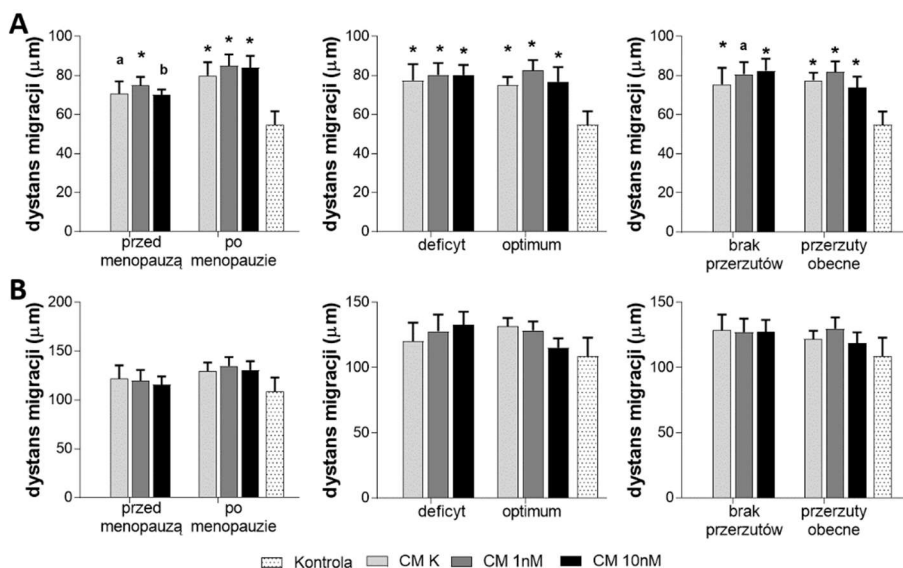




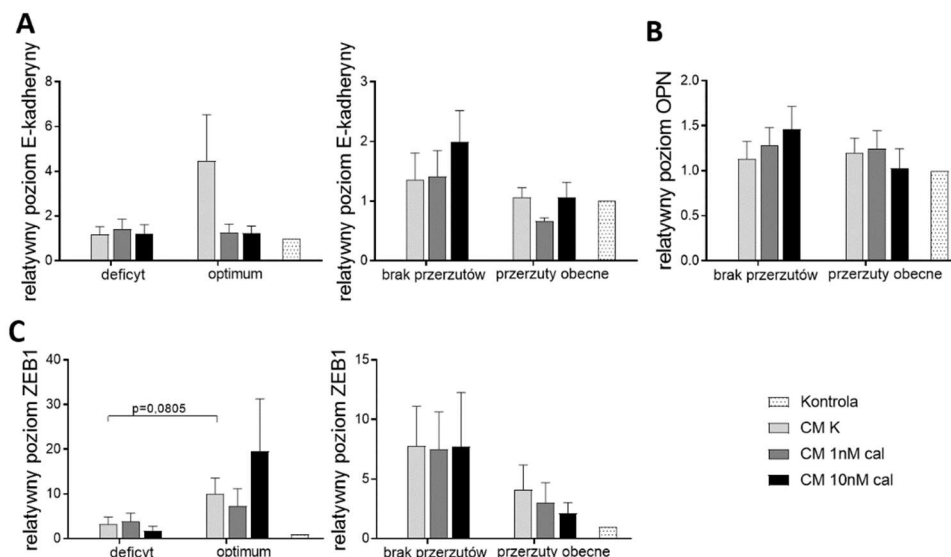
**Rycina Z 8. Wpływ kalcytriolu na poziom wybranych białek w lisatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych:** pacjentek przed ( $n=12$ ) i po menopauzie ( $n=23$ ), pacjentek z deficytem ( $n=20$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=14$ ) witaminy  $D_3$  oraz pacjentek z nowotworem przerzutującym ( $n=12$ ) i nieprzerzutującym ( $n=23$ ). A - IDO1 (idolamina 1), B - OPN (osteopontyna), C - TIMP1 (tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1), C - TGFβ (transformujący czynnik wzrostu β). Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”, w oparciu o stężenie metabolitu witaminy  $D_3 - 25(OH)D_3$  w osoczu:  $25(OH)D_3 < 30\text{ng/ml}$  klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30\text{ng/ml}$  do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Analizowano prążki na następującej wysokości: IDO1: 40kDa, TIMP1: 25kDa, OPN: 40kDa, TGFβ1: 35 kDa. Ekspresję białek normalizowano podwójnie do β-aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



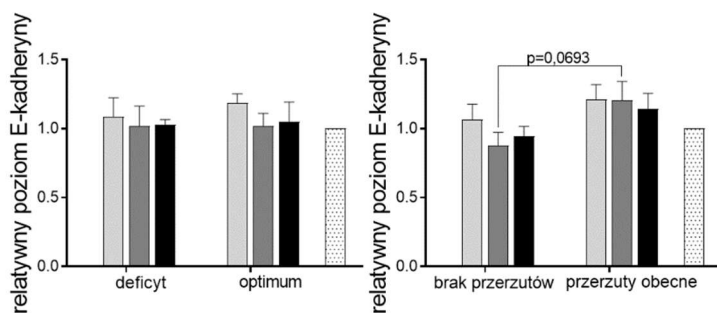
**Rycina Z 9. Wpływ kalcytriolu na aktywność metaloproteinazy 9 (MMP9) w lisatach CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych:** pacjentek z deficytem ( $n=9$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=8$ ) witaminy  $D_3$  oraz pacjentek z nowotworem przerzutującym ( $n=6$ ) i nieprzerzutującym ( $n=10$ ). Aktywność metaloproteinaz wyrażono jako procent kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie metabolitu witaminy  $D_3 - 25(OH)D_3$  w osoczu:  $25(OH)D_3 < 30\text{ng/ml}$  klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30\text{ng/ml}$  do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs stymulowano 1nM lub 10nM kalcytriolem przez 72h. Analizowano prążki na następującej wysokości: MMP9 – około 100 kDa. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney'a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\leq 0,001$  i \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ .



**Rycina Z 10. Wpływ medium CAFs znad stymulowanych kalcytriolem od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na migrację ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231.** A – po 3h, B – po 6h od rozpoczęcia stymulacji. Zastosowano media od pacjentek przed menopauzą (n=7), po menopauzie (n=9), pacjentek z deficytem (n=10) i prawidłowym poziomem (n=6) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem nieprzerzutuującym (n=9) i przerzutuującym (n=7). Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie hormonu FSH w osoczu: FSH > 25,8 mIU/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „po menopauzie”; w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. CAFs hodowano 72h z kalcytriolem, następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24h, zebrane CM nałożono na konfluentne MDA-MB-231 (na płytce 24-dolkowej) po wykonaniu rysy. Zdjęcia wykonano za pomocą oprogramowania Stream Start 1.6.1. Wyniki przedstawiono w postaci średniego dystansu migracji ± błąd standardowy średniej. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney’a dla pojedynczych porównań. „\*”, „a”, „b” nad słupkami wskazuje na porównanie do kontroli niestymulowanej kalcytriolem. „a” p<0,06. „b” p<0,07. \* ≤ 0,05.



**Rycina Z 11. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na poziom wybranych białek w ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MCF7.** A - E-kadheryna, B - OPN (osteopontyna) i C - ZEB1 (homeobox 1 wiążący E-box z palcem cynkowym). Zastosowano media kondycjonowane (CM) znad CAFs od pacjentek z deficytem (n=10) i prawidłowym poziomem (n=6) witaminy D<sub>3</sub> oraz pacjentek z nowotworem nieprzerzutuującym (n=9) i przerzutuującym (n=7). Analizowano prążki na następującej wysokości: E-kadheryna: 120 kDa, OPN: 44 kDa, Zeb1: 130 kDa. CAFs stymulowano 72h godziny kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24 godziny, zebrane CM nałożono na komórki linii MCF7 i MDA-MB-231: CM K – CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem, CM 1nM – stymulowanych 1nM kalcytriolem, CM 10nM – stymulowanych 10nM kalcytriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> – 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu: 25(OH)D<sub>3</sub> < 30ng/ml klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”, ≥ 30ng/ml do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. Wyniki normalizowano względem ekspresji β-aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej ± błąd standardowy średniej. Analizę wykonano dla 18 CM. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney’a dla pojedynczych porównań. \* ≤ 0,05.



**Rycina Z 12. Wpływ medium znad CAFs stymulowanych kalcytriolem pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych na poziom E-kadheryny w ludzkiej linii raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231.** Zastosowano media od pacjentek z deficytem ( $n=10$ ) i prawidłowym poziomem ( $n=6$ ) witaminy  $D_3$  oraz pacjentek z nowotworem nieprzerzutującym ( $n=9$ ) i przerzutującym ( $n=7$ ). Analizowano prąжки na następującej wysokości: E-kadheryna: 40 kDa (domena wewnątrzkomórkowa). CAFs stymulowano 72h godziny kalcytriolem (1nM i 10nM), następnie komórki kondycjonowano w medium bez surowicy przez 24 godziny, zebrane CM nałożono na komórki linii MCF7 i MDA-MB-231: CM K – CM znad CAFs niestymulowanych kalcytriolem, CM 1nM – stymulowanych 1nM kalcytriolem, CM 10nM – stymulowanych 10nM kalcytriolem. Pacjentki zostały podzielone na grupy: w oparciu o stężenie metabolitu witaminy  $D_3$  –  $25(OH)D_3$  w osoczu:  $25(OH)D_3 < 30\text{ng/ml}$  klasyfikował pacjentkę do grupy „deficyt”,  $\geq 30\text{ng/ml}$  do grupy „optimum”; w oparciu o występowanie dowolnych przerzutów: odległych (parametr M w klasyfikacji TNM), do węzłów chłonnych (parametr N): „przerzuty obecne” lub „brak przerzutów”. Wyniki normalizowano względem ekspresji  $\beta$ -aktyny i kontroli niestymulowanej kalcytriolem. Wyniki przedstawiono za pomocą wartości średniej  $\pm$  błąd standardowy średniej. Analizę wykonano dla 18 CM. Analizy statystyczne zostały wykonane przy użyciu testów: One-way ANOVA lub Kruskal-Wallis test dla wielokrotnych porównań oraz test t-studenta lub Mann-Whitney’a dla pojedynczych porównań. \*  $\leq 0,05$ .