

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: OCENA WPŁYWU SUPLEMENTACJI WITAMINĄ D<sub>3</sub> NA POLARYZACJĘ FENOTYPU MAKROFAGÓW I FIBROBLASTÓW W MODELU MYSIEGO RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

2. Czas trwania projektu 01.10.2018 – 30.09.2021

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): tumor associated macrophages, cancer associated macrophages, vitamin D, calcitriol, breast cancer metastasis

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

## 5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Celem naszych badań jest ocena fibroblastów (CAFs) i makrofagów (TAMs) towarzyszących przerzutującym (4T1; E0771.LMB) i nieprzerzutującym (67NR), dobrze scharakteryzowanym nowotworom gruczołu sutkowego rosnącym u myszy narażonych na normalną (1000 j.m.), niską (100j.m.) i wysoką (5000 j.m.) podaż w diecie witaminy D<sub>3</sub>. Eksperymenty zostały zaplanowane tak, aby ocenić, czy poziom witaminy D<sub>3</sub> w organizmie w momencie wszczepienia nowotworu ma wpływ na jego mikrośrodowisko, oraz jakie są skutki dodatkowego doustnego podawania kalcytriolu (od momentu gdy guzy są już wyczuwalne) w zależności od aktualnego poziomu witaminy D<sub>3</sub> w organizmie. Ukierunkowanie pro- lub przeciw-nowotworowe CAFs i TAMs, jako skutek wysokich stężeń lub niedoboru witaminy D będzie korelowane z właściwościami komórek nowotworowych, które determinują skład i funkcjonowanie swojego mikrośrodowiska. Przebieg doświadczenia: Myszy karmione będą w/w paszami. W trakcie trwania eksperymentu pobierana będzie krew w celu oceny poziomu witaminy D, następnie komórki nowotworowe będą wszczepiane do podściółki tłuszczowej gruczołu sutkowego. Dodatkowo myszy w grupach z normalną i niską zawartością witaminy D w paszy otrzymają doustnie kalcytriol. Myszy będą

obserwowane codziennie, 3x w tygodniu wazone i mierzone będą rozwijające się guzy nowotworowe. Około 21 dnia po wszczepieniu nowotworu oceniona zostanie angiogeneza w guzach. W końcowym etapie rozwoju nowotworu pobierane będą krew, tkanka nowotworowa, gruczoł sutkowy i płuca do dalszych analiz wykonywanych przy użyciu technik takich jak real-time PCR, cytometria przepływowa, ELISA, immunohistochemia. Zaproponowane badania są pionierskie, zaś przez swój poznawczy charakter przyczynią się do dyskusji na temat bezpieczeństwa suplementacji witaminy D3 w zaawansowanym stadium inwazyjnego raka piersi, biorąc pod uwagę nasze dotychczasowe wyniki wskazujące na zwiększony potencjał przerzutowy komórek 4T1 podczas jej podawania w modelu in vivo.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

180 samic myszy BALB/c oraz 120 samic myszy C57BL/6

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Immunomodulacyjne właściwości witaminy D3 sprawiają, że jej potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej wymaga szczegółowej analizy dotyczącej jej wpływu na komórki mikrośrodowiska nowotworowego.

Przygotowując projekt badawczy sprawdzony został stan istniejącej wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych PubMed, Google Scholar, ScienceDirect, Web of Science (przykładowe słowa kluczowe: tumor associated macrophages, cancer associated fibroblasts, tumor microenvironment, breast cancer metastasis, vitamin D, calcitriol, immunosuppression). Zaproponowane badania są pionierskie, zaś przez swój poznawczy charakter przyczynią się do dyskusji na temat bezpieczeństwa suplementacji witaminy D3 w zaawansowanym stadium inwazyjnego raka piersi.

Hipoteza badawcza, którą planujemy zweryfikować została ugruntowana na bazie doświadczeń przeprowadzonych na materiale biologicznym (głównie tkanka nowotworowa) zgromadzonym od zwierząt wykorzystywanych w ramach wcześniejszych badań (zgoda nr 40/2014) prowadzonych pod innym kierunkiem. Ponadto przeprowadziliśmy badania in vitro na liniach komórkowych makrofagów i fibroblastów, które potwierdziły wstępnie nasze założenia. Jednakże złożoność interakcji zachodzących pomiędzy komórkami zrębu guza a komórkami nowotworowymi nie może być w pełni odwzorowana w warunkach in vitro, wymaga więc zastosowania w badaniach immunokompetentnych modeli zwierzęcych.

W doświadczeniach zaplanowano szereg badań ex vivo, które wykonywane będą na fibroblastach i makrofagach izolowanych z tkanki prawidłowej bądź nowotworowej. Przewidziana liczebność grup związana jest z małą ilością materiału jaką można uzyskać od jednej myszy, stąd też 12 myszy na grupę pozwoli na wykonanie 6 izolacji w kierunku makrofagów oraz 6 izolacji w kierunku fibroblastów. Co więcej, założona liczebność grup pozwoli na pojedyncze wykorzystanie 6 myszy z grupy w zaplanowanej analizie USG perfuzji guza oraz 6 kolejnych do obrazowania guza za pomocą sond anty-EGFR, dzięki czemu możliwe będzie zmniejszenie obciążenia dla użytych zwierząt doświadczalnych. Wyniki naszych dotychczasowych doświadczeń in vivo (zgoda nr 40/2014; Anisiewicz A. et al. Int. J. Oncol. 52, 103–126, 2018), pozwalają stwierdzić, że przewidziane minimalne liczebności zwierząt

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

przypadających na każdą grupę są wystarczające do wiarygodnego oszacowania parametrów będących przedmiotem badań w niniejszym eksperymencie.

Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Utrzymywane będą w pomieszczeniach klimatyzowanych z stałym dostępem do wody i paszy, ze wzbogaceniami takimi jak materiał gniazdowy czy domki. Ponadto będą miały zapewniony stały nadzór weterynaryjny, a ich stan zdrowia będzie codziennie monitorowany. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by ograniczyć ból, cierpienie i dystres wykorzystywanych zwierząt. W przypadku zaobserwowania znacznego pogorszenia stanu zdrowia zwierząt zostanie zastosowane wczesne, humanitarne zakończenie procedury. Także myszy z wyraźnym guzem nowotworowym (powyżej 2000 mm<sup>3</sup>) poddane zostaną eutanazji. Wszystkie procedury przeprowadzane będą przez wykwalifikowany personel, także z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury, np. umożliwiającej kontrolowane dozowanie izofluranu. Ponadto, zaplanowano cały szereg wielokierunkowych analiz tkanek pobranych po zakończeniu eksperymentu od zwierząt, aby uzyskać możliwie najszerszą wiedzę na temat odpowiedzi organizmu.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

☒ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

☐ NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.