

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Udział osteopontyny we wpływie kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie komórek Th17 u młodych i starych myszy obciążonych rakiem gruczołu mlekowego.

2. Czas trwania projektu 01.10.2020-30.09.2024

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) witamina D, rak piersi, osteopontyna, Th17, przerzutowanie, starzenie się

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.

Pacjenci dotknięci chorobą nowotworową z przerzutami mają ogólnie złe rokowanie. Podczas wieloetapowego procesu przerzutowania, komórki nowotworowe muszą unikać ataku ze strony układu odpornościowego. Jednak rozwijający się proces zapalny, jako reakcja układu odpornościowego towarzysząca nowotworowi, powszechnie uznawany jest za sprzyjający rozwojowi nowotworu pierwotnego i jego przerzutowaniu. Jedną z cytokin wydzielanych przez komórki układu odpornościowego w przebiegu procesu zapalnego, jest interleukina 17 (IL-17). IL-17 wytwarzana głównie przez komórki Th17 (limfocyty T pomocnicze), jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, gdy jej poziom wzrasta u pacjentek z rakiem piersi.

Nasze wstępne dane dotyczące wpływu aktywnej postaci witaminy D₃ (kalcytriolu) i jej metabolitu takalcytolu na komórki Th17 podczas progresji mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1 wykazały zwiększoną liczbę tych komórek w śledzionie młodych myszy, u których zaobserwowano pro-przerzutowe i pro-angiogenne działanie kalcytriolu i jego analogu. Z drugiej strony u starych myszy z usuniętymi jajnikami (model post-menopauzalny) przejściowemu efektowi anty-przerzutowemu tych związków towarzyszyło zmniejszenie wydzielania IL-17 przez komórki Th17. Proces różnicowania komórek Th17 jest stymulowany przez osteopontynę (OPN), a OPN jest białkiem, którego wydzielanie może być regulowane przez witaminę D.

Dwa główne tematy naszych badań skupią się więc na zbadaniu zależnego od wieku wpływu podawania kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję receptorów dla OPN i komórki Th17/Treg (limfocyty Treg – regulatorowe) w czasie progresji nowotworu. Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem nowotworów o różnej zdolności do tworzenia przerzutów dadzą odpowiedź na temat udziału komórek Th17/Treg w uprzednio obserwowanym pro- lub przeciw-przerzutowym działaniu pochodnych witaminy D (VDCs; kalcytriol i tacalcitol) w zależności od wieku organizmu obciążonego nowotworem. Ponadto, przeanalizujemy jak bardzo działanie VDCs różni się między modelami siostrzanymi nowotworów o różnej zdolności do tworzenia przerzutów (4T1 – przerzuty odległe, 168FARN – przerzuty do węzłów chłonnych, 67NR – nieprzerzutuujący), a także między dwoma różnymi przerzutującymi liniami komórkowymi (4T1 i E0771). Przeanalizujemy również zależny od wieku wpływ OPN na różnicowanie komórek Th17 pod wpływem kalcytriolu lub takalcytolu przy użyciu modeli myszy knock-out (z nokautem receptora dla witaminy D, VDR: *Vdr*^{-/-} i receptora dla OPN: *Spp1*^{-/-}). Eksperymenty te, wykonane w całości *ex vivo*, odpowiedzą na pytanie dotyczące wpływu czynników pochodzących od komórek nowotworowych na proces różnicowania limfocytów Th17 po ekspozycji na VDCs i mogą wskazać, jak ważny jest wpływ witaminy D bezpośrednio na komórki Th17 i na ile za pośrednictwem komórek dendrytycznych.

W tym celu myszy zostaną zaszczepione w/w komórkami (w przypadku myszy starych wcześniej zostanie wykonany zabieg usunięcia jajników dla odzwierciedlenia stanu menopauzy), następnie będą traktowane kalcytriolem i takalcytolem (doustnie, 8 podań), obserwowane przez 24 dni od momentu wszczepienia nowotworu, po czym zostaną poddane eutanazji (procedura 1 myszy młode, procedura 4 i 7 myszy stare poddane ovariectomii). U części myszy zostanie wykonane obrazowanie naczyń krwionośnych w guzach 2 metodami (Procedury 2 i 3 – młode oraz 5 i 6 – stare poddane ovariectomii). W drugiej części badań, w/w myszy knock-out po pobraniu krwi w znieczuleniu zostaną poddane eutanazji (procedura 8). Dalsze analizy będą wykonywane na komórkach/tkankach pobranych od zwierząt.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa szczepu BALB/c – 375 szt.; szczepu C57BL/6 – 165 szt.; szczepu B6.129S6(Cg)-*Spp1*^{tm1Blh}/J – 40 szt.; szczepu B6.129S4-*Vdr*^{tm1Mbd}/J – 40 szt.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Immunomodulacyjne właściwości witaminy D₃ sprawiają, że jej (lub jej analogów) 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: vitamin D, breast cancer, osteopontin, Th17, metastasis, angiogenesis, aging). Zaproponowane badania są pionierskie, zaś przez swój poznawczy charakter przyczynią się do dyskusji na temat bezpieczeństwa stosowania witaminy D₃ w rakach piersi o różnym stadium zaawansowania. Jedyną publikacją wskazującą na potencjalną rolę komórek Th17 w niekorzystnym (przerzutowym i proangiogennym) oddziaływaniu witaminy D lub jej analogów na myszy młode i stare jest nasza własna praca. Inni autorzy badali wpływ witaminy D na poszczególne komórki układu odpornościowego, w tym komórki Th17 u myszy z rozwiniętymi innymi schorzeniami, jak np. choroby autoimmunologiczne.

Hipoteza badawcza, którą planujemy zweryfikować została ugruntowana na bazie własnych doświadczeń przeprowadzonych na materiale biologicznym (tkanka nowotworowa, śledziona, węzły chłonne, krew) zgromadzonym od zwierząt wykorzystywanych w ramach wcześniejszych badań prowadzonych pod nieco innym kierunkiem. Wyniki tych badań opublikowano dotąd w 4 publikacjach naukowych, a piąta znajduje się w ocenie w redakcji czasopisma. Złożoność interakcji zachodzących pomiędzy komórkami układu odpornościowego (w tym przypadku limfocytami T CD4+, w tym ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów Th17 oraz Treg), a komórkami nowotworowymi nie może być w pełni odwzorowana w warunkach *in vitro*, wymaga więc zastosowania w badaniach immunokompetentnych modeli zwierzęcych.

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

W celu udoskonalenia i ograniczenia, w doświadczeniach zaplanowano szereg badań *ex vivo*, które wykonywane będą na komórkach izolowanych z tkanek prawidłowych i nowotworowych. Przewidziana liczebność grup związana jest z małą ilością komórek jakie można uzyskać od jednej myszy (np. około 0,5 mln komórek CD4+ z płuca zdrowej myszy), co zostało szczegółowo omówione w innej części wniosku. 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 każdym z tych badań dla użytych zwierząt doświadczalnych. Wyniki naszych dotychczasowych doświadczeń *in vivo*, pozwalają stwierdzić, że przewidziane minimalne liczebności zwierząt przypadających na każdą grupę są wystarczające do wiarygodnego oszacowania parametrów będących przedmiotem badań w niniejszym eksperymencie. Zaplanowano także zakup urządzenia do automatycznych analiz western blot, co znacznie ograniczyło ilość komórek potrzebnych do tego typu analiz.

Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan zwierząt. Utrzymywane będą w pomieszczeniach klimatyzowanych ze stałym dostępem do wody i paszy, ze wzbogaceniami takimi jak materiał gniazdowy, domki dla schronienia, tunele, trapezy do wspinania się. 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. Skrócono do minimum czas obserwacji zwierząt, aby nie narażać ich na cierpienie wynikające z nadmiernego rozwoju przerzutów, zwłaszcza w płucach. W przypadku czynności mogących wywołać ból, zaplanowano użycie środków przeciwbólowych. W przypadku zaobserwowania pogorszenia stanu zdrowia zwierząt (z powodu rozwoju nowotworu lub z powodu wieku myszy) zostanie zastosowane wczesne, humanitarne zakończenie procedury. Także myszy z wyraźnym guzem nowotworowym (powyżej 1000 mm³) 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 na podawanie kalcyriolu i takalcytolu w zależności od rodzaju rozwijającej się choroby nowotworowej (przerzutujące, nieprzerzutujące) (opisane szczegółowo w innej części wniosku).

Planuje się przeprowadzenie tych eksperymentów w kilku etapach, w grupach po 5 myszy, tak aby procedury izolacji komórek z tkanek były możliwe do wykonania w sposób optymalny. Taki sposób prowadzenia eksperymentów umożliwi także wykorzystanie tylko niezbędnej liczby zwierząt.

Ponadto, dużą część badań zaplanowano *ex vivo* na komórkach pobranych od zwierząt modyfikowanych genetycznie (jedyną czynnością, oprócz eutanazji, będzie pobranie krwi od tych zwierząt). Te badania będą rozwinięciem badań *in vivo* i pozwolą na zagłębienie się w konkretne mechanizmy działania badanych pochodnych witaminy D: kalcyriolu i takalcytolu u myszy obciążonych rakiem gruczołu mlekowego.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.