

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu *Czy wiek organizmu wpływa na indukcję limfocytów T i B regulatorowych pod wpływem witaminy D3 - badania wstępne*

2. Czas trwania projektu 0.1.11.2017-30.09.2018

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) limfocyty T i B regulatorowe, witamina D, kalcytriol, starzenie się, układ immunologiczny.

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.

Starzeniu się organizmu towarzyszą liczne zmiany funkcjonalne i fenotypowe w limfocytach T, limfocytach B oraz monocytych/makrofagach; ponadto u osób w podeszłym wieku odnotowuje się zwiększone występowanie chorób autoimmunologicznych, infekcyjnych i nowotworowych. Niedobór witaminy D jest powszechnym zjawiskiem na całym świecie, ale bardziej powszechny i nasilony jest u osób starszych. Pomimo wielu badań wskazujących na różnice w odpowiedzi immunologicznej występujące w starszym wieku, badania doświadczalne dotyczące aktywności biologicznej różnych substancji z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych wciąż prowadzone są na zwierzętach młodych (np. myszach 6-8 tygodniowych). Na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz własnych wyników badań, możemy zakładać, że witamina D wykazuje odmienny efekt na komórki układu odpornościowego i produkcję cytokin, w zależności od wieku zwierząt.

Dysponując modelem doświadczalnym, jakim są myszy C57Bl/FoxP3-GFP wykazujące ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP) pod kontrolą promotora genu *Foxp3*, chcielibyśmy ocenić wpływ kalcytriolu na limfocyty T i B regulatorowe u zdrowych, młodych i starych myszy C57Bl/FoxP3-GFP. Przy użyciu cytometrii przepływowej analizować można u tych myszy intensywność fluorescencji GFP, która jest proporcjonalna do poziomu transkrypcji *Foxp3*, umożliwiając identyfikację różnych populacji komórek Treg.

Wpływ witaminy D na limfocyty T regulatorowe (w modelach młodych zwierząt) jest dość dobrze poznany, natomiast analiza danych literaturowych w poszukiwaniu informacji o wpływie witaminy D na limfocyty Breg dostarczyła 1 publikację z 2017 roku. Nie ma natomiast danych literaturowych dotyczących różnic w odpowiedzi immunologicznej młodych i starych osobników na traktowanie witaminą D.

Zaplanowane badania pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy kalcytriol wpływa na różnicowanie się limfocytów B regulatorowych, a także wyjaśnić istnienie różnic we wpływie kalcytriolu na odpowiedź immunologiczną w kierunku immunosupresji w zależności od wieku organizmu.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

36 myszy C57Bl/FoxP3-GFP; 30 myszy BALB/FoxP3-GFP

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: __EBSCO; __PUBMED; __Google Scholar; __ScienceDirect; __Web of Science (JCR); Wykorzystałam słowa kluczowe: CALCITRIOL/VITAMIN D/REGULATORY T CELLS/REGULATORY B CELLS/AGING/IMMUNOSUPPRESSION/ELDERLY. Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam że: Pomimo wielu badań wskazujących na różnice w odpowiedzi immunologicznej występujące w starszym wieku, wciąż badania doświadczalne dotyczące aktywności biologicznej różnych substancji z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych prowadzone są na zwierzętach młodych np. myszach 6-8 tygodniowych. Na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz własnych wyników badań, możemy zakładać, że kalcytriol wykazuje odmienny wpływ na komórki układu odpornościowego i produkcję cytokin, w zależności od wieku zwierząt. Prowadzi to m.in. do nasilenia przerzutowania raka sutka u myszy młodych i obniżenia liczby przerzutów u myszy starych. Wpływ witaminy D na limfocyty T regulatorowe (w modelach młodych zwierząt) jest dość dobrze poznany, natomiast analiza danych literaturowych w poszukiwaniu informacji o wpływie witaminy D na limfocyty Breg dostarczyła 1 publikację z 2017 roku (Xie Z, Chen J, Zheng C, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing Th1, Th17 cells. *Immunology*. July 2017;0-2.) Autorzy stwierdzili m.in., że kalcytriol zwiększa proporcje regulatorowych komórek B w obwodowych narządach limfatycznych, co powoduje zahamowanie rozwoju eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u myszy młodych. Nie ma natomiast danych literaturowych dotyczących różnic w odpowiedzi immunologicznej młodych i starych osobników na traktowanie witaminą D.

Dysponując modelem doświadczalnym, jakim są myszy C57Bl/FoxP3-GFP wykazujące ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP) pod kontrolą promotora genu *Foxp3*, chcielibyśmy ocenić wpływ kalcytriolu na limfocyty T i B regulatorowe u zdrowych, młodych i starych myszy C57Bl/FoxP3-GFP. Przy użyciu cytometrii przepływowej analizować można u tych myszy intensywność fluorescencji GFP, która jest proporcjonalna do poziomu transkrypcji *Foxp3*, umożliwiając identyfikację różnych populacji komórek Treg. W innym przypadku, analiza komórek Treg wymaga permeabilizacji komórek, co często zakłóca ekspresję cząsteczek powierzchniowych.

Zaplanowane badania pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy kalcytriol wpływa na różnicowanie się limfocytów B regulatorowych, a także wyjaśnić istnienie różnic we wpływie kalcytriolu na odpowiedź immunologiczną w kierunku immunosupresji w zależności od wieku organizmu. Ponieważ niedobór witaminy D

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

w wieku starszym jest powszechny, jednocześnie wiązany jest z możliwością rozwoju wielu chorób, w tym nowotworowych, uważamy, że uzyskane wyniki pozwolą stworzyć podstawę do dalszych badań nad odpowiedzią immunologiczną, również w chorobie nowotworowej, w kontekście bezpieczeństwa suplementowania witaminy D u osób starszych i w młodym wieku, chorych na nowotwory. Zaplanowano pobranie i zabezpieczenie wszystkich tkanek limfatycznych, krwi i tkanki tłuszczowej, tak aby uzyskać możliwie najszerszy obraz odpowiedzi immunologicznej myszy. Jednocześnie wykorzystanie modelu myszy transgenicznych pozwala ograniczyć liczbę zwierząt w eksperymencie, gdyż dzięki fluorescencji komórek Treg FoxP3 pozytywnych, większa liczba analiz możliwa jest do przeprowadzenia na 1 próbce tkanki. Jednocześnie pracujemy nad wyhodowaniem szczepu myszy BALB/c z genem GFP wprowadzonym pod promotorem genu FoxP3. Uzyskanie takiego szczepu myszy umożliwi szersze badania odpowiedzi immunologicznej u myszy z chorobą nowotworową, ponieważ większość stosowanych w badaniach mysich linii nowotworowych wywodzi się ze szczepu myszy BALB/c.