

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт имени С. И. Георгиевского

На правах рукописи

Аблякимов Эльмар Тофикович

**ЛИГАНД-АССОЦИИРОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ
ВИТАМИНА D И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТОЧКИ ПРИЛОЖЕНИЯ ЕЕ
ЭФФЕКТОВ В МОРФОГЕНЕЗЕ ИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

Диссертация
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Кривенцов Максим Андреевич
доктор медицинских наук, доцент

Симферополь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Современные представления о структурно-функциональной организации гена и рецептора витамина D	12
1.2. Синтез, метаболизм и физиологическая роль витамина D.....	17
1.3. «Неклассические» эффекты витамина D: особенности лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D в регуляции иммунной системы и её компонентов.....	21
1.4. Потенциальная взаимосвязь комплекса, состоящего из рецептора витамина D и витамина D, с рецепторами иммунных контрольных точек.....	29
1.5. Современные представления о продуктивном гранулематозном воспалении и роли VDR в его реализации.....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Экспериментальная модель и дизайн исследования	37
2.2. Обоснование выбора парикальцитола, супероксиддисмутазы А и дизайна исследования	40
2.3. Условия содержания животных и этические аспекты.....	43
2.4. Методы исследования гранулематозного инфильтрата.....	44
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НА ФОНЕ СУПЕРОКСИДДИСМУАЗЫ А-ИНДУЦИРОВАННОГО ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ КРЫС ДО И ПОСЛЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПАРИКАЛЬЦИТОЛА.....	49
3.1. Структурно-функциональные особенности гранулематозного инфильтрата контрольных крыс (без коррекции).....	49
3.2. Структурно-функциональные особенности гранулематозного инфильтрата экспериментальных крыс.....	60
3.3. Экспрессия рецепторов витамина D в гранулематозном инфильтрате	70

3.4. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 68.....	72
3.5. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 1a.....	80
3.6. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 3.....	85
3.7. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 20.....	89
3.8. Анализ уровня экспрессии маркера лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1	95
3.9. Анализ уровня экспрессии мРНК.....	99
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	127
ВЫВОДЫ.....	129
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время выделяют более 140 различных аутоиммунных заболеваний и синдромов, среди которых можно выделить гранулематозные (например, саркоидоз, болезнь Крона, первичный билиарный холангит, гранулематоз Вегенера и др.) [74; 105; 114; 209], и не гранулематозные заболевания различных органов и систем (например, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, системная склеродермия, синдром Шегрена и др.) [106; 118; 143; 245]. За последние десятилетия частота различных аутоиммунных заболеваний имеет четкую тенденцию к увеличению [159] на фоне распространённого дефицита витамина D (VD), который достиг уровня пандемии [102], в том числе в России [7], что может предполагать потенциальную роль дефицита витамина D в развитии аутоиммунных заболеваний [1; 26; 27; 110; 256].

Лечение большинства иммунных патологий, лежащих в основе аллергических и аутоиммунных заболеваний, включая гранулематозные, является неспецифичным и включает высокие дозы глюкокортикостероидов и/или цитостатиков [91; 109; 181], что обусловлено недостаточным пониманием их патогенеза, включая взаимодействия основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в очаге иммунного воспаления. Все это повышает актуальность экспериментального изучения воспалительного процесса.

Таким образом, рост аутоиммунных заболеваний и недостаточное понимание их патогенеза стимулирует поиск эффективных и безопасных (предпочтительно, природных) средств лечения и, главным образом, профилактики аутоиммунных процессов. Одним из таких подходов, который подтвердил свою эффективность по данным многочисленных экспериментальных и клинических исследований (включая многоцентровые рандомизированные клинические исследования, например, исследование VITAL [97]), является применение витамина D и его производных.

Степень разработанности темы исследования

Значительная часть исследований посвящена клиническим аспектам аутоиммунных заболеваний, однако фундаментальные вопросы патогенеза остаются недостаточно изученными. Биологическая роль витамина D (VD) – одного из ключевых витаминов организма – раскрыта не полностью, что связано с полиморфизмом гена рецептора витамина D (VDR) [69; 218]. Современные исследования подтверждают значимую связь между VD и различными иммунными клетками [25; 47; 37], а также белковыми компонентами иммунных контрольных точек (ИКТ) [30; 42; 76; 215; 124; 254]. Это указывает на важность витамина D в роли регулятора в межклеточных взаимодействиях.

Актуальность исследования проявляется в совмещении двух ключевых направлений: выявления механизмов взаимодействия различных иммунокомпетентных клеток как на клеточном, так и на молекулярном уровнях, и изучении биологических функций VD. Применение методов морфологии, иммуно-гистохимического и молекулярно-генетического анализа способствует более глубокому пониманию влияния межклеточных сигналов на иммунную систему. Одновременно рассматривается возможность использования VD для коррекции, включая определение профиля безопасности и оценку биологических эффектов в очаге воспаления при проведении экспериментальных исследований.

Фундаментальный аспект исследования включает изучение взаимодействий антигенпрезентирующих клеток (АПК) и лимфоидных клеток на клеточном и генетическом уровнях в условиях иммунного воспаления, сопровождающегося активацией VDR. Кроме того, изучается потенциальная связь между белками ИКТ (PD-L1 – programmed death ligand-1) и VDR, что открывает новые пути для решения проблемы неспецифического лечения иммунных заболеваний и минимизации их негативных последствий.

Цель исследования – установить эффекты лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D на морфогенез экспериментально индуцированного иммунного неспецифического гранулематозного воспаления.

Задачи исследования:

1. Установить морфогенез неспецифического гранулематозного воспаления, индуцированный супероксиддисмутазой А (SOD A), с использованием описательного гистопатологического и иммуногистохимического (ИГХ) анализа экспрессии антигенов ключевых субпопуляций иммунокомпетентных клеток;

2. Изучить морфологические особенности экспериментального иммунного гранулематозного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D, в том числе с позиций описательного гистологического анализа и распределения антиген-презентирующих клеток (дендритных клеток [CD1a; CD – cluster of differentiation] и макрофагов [CD68]) и клеток лимфоидного ряда (Т-лимфоцитов [CD3] и В-клеток [CD20]);

3. Установить особенности экспрессии рецепторов витамина D и программируемого лиганда клеточной гибели 1 (PD-L1) в очаге экспериментального иммунного гранулематозного воспаления в контрольной группе и на фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D;

4. Изучить особенности экспрессии мРНК генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в гомогенизатах ткани при иммунном гранулематозном воспалении в контрольной группе и на фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D;

5. Установить особенности эффектов парикальцитола в зависимости от начала его введения согласно стадиям морфогенеза гранулематозного воспаления;

6. Изучить патофизиологические механизмы лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D в регуляции системы межклеточных взаимодействий и медиаторных каскадов при иммуновоспалительных процессах.

Объект исследования – особенности морфогенеза экспериментального иммунного гранулематозного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D.

Предмет исследования – закономерности межклеточных взаимодействий в реализации иммунного воспаления.

Научная новизна

Научная новизна исследования выражается в первичном выявлении патофизиологических основ морфологических изменений, которые вызываются лиганд-опосредованной активацией VDR и влияют на межклеточные контакты между антиген-презентирующими – дендритными клетками (ДК) и макрофагами – и лимфоидными клетками (Т- и В-лимфоциты) в условиях экспериментально моделируемого саркоидоз-подобного иммунного воспаления.

Используя совокупность методов — гистологию, иммуногистохимию и молекулярно-генетический анализ — впервые выявлены характерные изменения в распределении этих клеточных популяций. Показано, что они сопряжены с модуляцией экспрессии ключевых генов и активности сигнальных путей PD-1/PD-L1, а также со сдвигами в уровнях провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов в условиях индуцированного иммунного гранулематозного воспаления. Эти результаты расширяют понимание патогенеза иммунного воспаления на клеточном и молекулярном уровнях.

Впервые проведен анализ эффективности применения парикальцитола в дозе 200 нг/животное с точки зрения нивелирования гистопатологических трансформаций в коже после саркоидоз-подобного индуцированного иммунного воспаления. На основании морфологических и молекулярно-генетических методов исследования получены новые данные о роли лиганд-ассоциированной активации VDR в контексте гранулематозного воспаления.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе экспериментального исследования данные существенно расширяют современные представления о патогенетических механизмах морфогенеза иммунного гранулематозного воспаления в мягких тканях, фокусируясь на динамике субпопуляций иммунокомпетентных клеток и регуляции экспрессии ключевых таргетных генов под воздействием синтетического агониста рецептора витамина D — парикальцитола.

Результаты исследования дают представления о закономерностях биологических эффектов парентерального введения парикальцитола на возникновение и/или прогрессирование иммунного гранулематозного воспаления с изменением распределения антиген-представляющих клеток и клеток лимфоидного ряда за счёт изменения экспрессии, по меньшей мере, одного из «таргетных» генов или сигнальных путей (PD-1/PD-L1), а также модуляции экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при экспериментально вызванном иммунном гранулематозном воспалении, что раскрывает патофизиологические механизмы влияния парикальцитола на иммунную регуляцию. Полученные результаты позволяют глубже понять иммуномодулирующее действие парикальцитола и обосновать его терапевтический потенциал для смягчения патологических проявлений воспалительных процессов, связанных с нарушением баланса цитокиновой среды, и коррекции неблагоприятных последствий иммунного воспаления. Полученные результаты обосновывают с морфологической точки зрения использования VD и его аналогов в качестве средства коррекции негативных последствий иммунного воспаления.

Экспериментально полученные результаты и обобщенные данные литературы, позволили сформулировать концепцию иммуннорегуляторного воздействия витамина D и оценить его место в межклеточной интеграции, что открывает перспективы дальнейших исследований в этой области.

Методология и методы исследования

В этом исследовании применён комплекс методик, обеспечивающий всесторонний анализ ключевых структурно-функциональных изменений в очаге иммунного гранулематозного воспаления, вызванного экспериментально, при парентеральном (внутрибрюшинном) введении парикальцитола. Исследовательский комплекс ориентирован на изучение специфики межклеточных взаимодействий на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях и включает:

1. Гистологический метод (окраска гистологических препаратов гематоксилином и эозином) – для проведения качественной оценки и описательного анализа морфологических преобразований в тканях;

2. Иммуногистохимический метод, предусматривающий как описательный анализ, так и полуколичественную оценку уровня экспрессии маркеров VDR, PD-L1, CD1a, CD3, CD20 и CD68, применяется для выявления локализации иммунных клеток в очаге гранулематозного воспаления;

3. Молекулярно-генетический метод – для выявления взаимосвязи экспрессии мРНК генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в гомогенизатах ткани на фоне экспериментального иммунного гранулематозного воспаления;

4. Статистические методы применялись для выполнения сравнительного анализа полученных данных и определения значимости выявленных различий в количественных показателях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Парентеральное введение искусственно синтезированного пептида супероксиддисмутазы А крысам приводит к формированию в тканях иммунного неспецифического гранулематозного воспаления, который морфологически коррелирует с саркоидозом с преобладанием макрофагов (CD68⁺) и Т-лимфоцитов (CD3⁺).

2. Парентеральное введение парикальцитола приводит к структурно-функциональным преобразованиям в очаге гранулематозного воспаления с тенденцией к созреванию иммунной гранулемы за счет эпителиоидной и гигантоклеточной трансформации, сопровождающихся уменьшением доли клеток макрофагального и лимфоцитарного ряда (CD3⁺ клеток).

3. При парентеральном введении парикальцитола структурно-функциональные преобразования в очаге гранулематозного воспаления до и в момент сенсibilизации к антигену наиболее выражены по сравнению с контролем. Изменения характеризуются увеличением количества зрелых иммунных гранулем,

изменением их клеточного состава и цитокинового профиля, выраженной реакцией сосудов микроциркуляторного русла и разрастанием фиброзной капсулы.

4. Парентеральное введение парикальцитола оказывает иммуномодулирующее воздействие на морфогенез иммунной гранулемы, проявляющееся в изменении распределения популяций клеток макрофагального и лимфоидного ряда, увеличении экспрессии PD-L1 и мРНК генов противовоспалительного IL-10 при одновременном снижении относительной экспрессии мРНК гена IL-1 β .

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных данных обеспечивается многократными независимыми измерениями ключевых экспериментальных параметров, что позволяет добиться воспроизводимости результатов с относительным отклонением не более 5 %. Применённые статистические методы подтверждают наличие значимых различий между экспериментальными и контрольными группами (при уровне значимости $p < 0,05$).

Дополнительная апробация методики на экспериментальных моделях (с использованием достаточного числа объектов наблюдения – крыс, стекловидных и сетчаточных) демонстрирует применимость и надёжность полученных результатов.

Выбор количества крыс обоснован с учётом этических принципов 3R (Reduction, Replacement, Refinement).

Основные результаты исследования, научные положения и выводы данного исследования доложены и обсуждены на:

1. Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 150-летию со дня рождения Н.А. Семашко «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 2024);

2. LXIV международной научно-практической конференции «Advances in Science and Technology» (Москва, 2024);

3. II научно-практической конференции «Наука-Крыма: от истоков к современности» (Симферополь, 2024).

Научная продуктивность и публикационная активность

В рамках проведенного исследования основные теоретические положения, полученные результаты и сформулированные выводы нашли отражение в десяти научных публикациях. Из них 6 статей опубликованы в рецензируемых изданиях, включенных в базы данных Scopus и перечень ВАК Российской Федерации. Пять из этих работ выполнены без соавторства. Дополнительно 3 публикации представлены в сборниках материалов научных форумов — конгрессов, съездов и конференций.

Структура и объем диссертационного исследования

Кандидатская диссертация оформлена в соответствии с действующими нормативами, включая положения ГОСТ Р 7.0.11–2011. Общий объем работы составляет 166 страниц машинописного текста. В состав диссертации входят: вступительная часть, аналитический обзор научных источников, описание примененных методик, интерпретация полученных результатов, заключение, основные выводы, перспективы дальнейших исследований, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, а также библиографический список. В работе представлены 10 таблиц и 50 иллюстративных материалов. Список литературы включает 12 источников отечественного происхождения и 260 зарубежных публикаций.

Степень самостоятельности выполненного исследования

Все представленные в диссертации результаты получены автором лично в ходе экспериментальной работы, проведенной на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института им. С.И. Георгиевского. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, доктору медицинских наук Кривенцову Максиму Андреевичу, за всестороннюю поддержку, критическое обсуждение результатов и методологические рекомендации, оказанные на всех этапах подготовки научного исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о структурно-функциональной организации гена и рецептора витамина D

Широкое распространение и увеличение частоты различных аутоиммунных заболеваний, включая гранулематозные (например, саркоидоз, болезнь Крона, первичный билиарный холангит, гранулематоз Вегенера и др.) [74; 105; 114; 209] и негранулематозные заболевания различных органов и систем (например, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, системная склеродермия, синдром Шегрена и др.) [106; 118; 143; 245], ставят перед исследователями задачу выяснения механизмов регуляции иммунного ответа и разработки новых методов его коррекции.

Неспецифичность лечения, основанного на использовании высоких доз глюкокортикостероидов и/или цитостатиков [91; 109; 181], обусловлена недостаточным пониманием патогенеза заболеваний с иммунным компонентом, в том числе с позиции взаимодействия основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления на клеточном и генетическом (молекулярном) уровнях. Актуальность исследования также определяется приоритетом поиска инновационных терапевтических стратегий, основанных на естественных регуляторных механизмах организма, в частности, с использованием биологически активных веществ, таких как витамин D.

До недавнего времени роль VD рассматривалась лишь с позиций его влияния на обмен кальция и фосфора в организме, так как исторически витамин D был связан с регуляцией метаболизма в костной ткани [21; 219]. Однако в течение последних 15 лет выявили новые эффекты VD, такие как нейропротективный, нейростероидный и иммуномодуляторный [4; 8; 23; 130; 161; 194].

Растёт число исследований, доказывающих, что VD активно взаимодействует с иммунокомпетентными клетками [10; 46; 72; 108; 128], а также

участвует в патогенезе аутоиммунных заболеваний [63; 133; 256]. Это позволяет считать его важным звеном в сети межклеточных регуляторных механизмов.

Наличие рецептора витамина D (VDR) на иммунокомпетентных клетках моноцитарно-макрофагального и лимфоидного ряда (субпопуляции Т- и В-лимфоцитов) [25; 37; 47] приписывает витамину D новую роль в модуляции иммунологических процессов и в развитии или профилактике аутоиммунных заболеваний, в том числе гранулематозных. Тем не менее, эффекты витамина D в морфогенезе иммунного воспаления с позиций влияния на ключевые межклеточные взаимодействия в очаге иммунного воспаления следует считать недостаточно изученными.

С другой стороны, исследования последних десятилетий также выявили значимую взаимосвязь белков ИКТ с иммунными клетками [30; 42; 76; 124; 215; 254], которая проявляется в тонкой регуляции баланса между толерантностью и иммунопатологией. Поскольку белки ИКТ и VDR экспрессируются на поверхности иммунных клеток, не исключено, что данные звенья иммунной регуляции взаимосвязаны. Особый интерес представляет изучение возможных точек приложения этой взаимосвязи в рамках иммунного воспаления. Вместе с тем, доступные в литературе данные не позволяют точно охарактеризовать динамику межклеточных взаимодействий, что подтверждает актуальность данной проблемы и требует проведения дополнительных исследований в этой области.

Таким образом, фундаментальные вопросы выяснения механизмов взаимодействия АПК и клеток лимфоидного ряда на рецепторном, молекулярном и генетическом уровне при иммунном воспалении на фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D остаются недостаточно изученными. Исходя из этого, в данном литературном обзоре представлены ключевые сведения, касающиеся современных представлений о структурно-функциональной организации гена и кодирующегося им рецептора витамина D, эффектах витамина D и роли комплекса VDR-VD в реализации межклеточных взаимодействий и морфогенезе иммунного воспаления, а также потенциальной взаимосвязи белков ИКТ и VDR.

Фармакогеномика, уже широко используемая в онкологии, лечении ВИЧ и аутоиммунных расстройствах, заслуживает внимания. Особое значение в настоящее время уделяется гену VDR и VD из-за его участия в транскрипционной регуляции более сотни генов [25; 48; 52; 54; 93]. В недавних исследованиях изучалась возможность использования генетических вариантов в пути VD для прогнозирования восприимчивости и потенциальных исходов при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях [213].

Ген VDR (также известный как NR1I1) находится в 12-й хромосоме (12q12-q14), содержит 60 тысяч пар нуклеотидов и состоит из 14 экзонов. В гене выделяют некодирующую и кодирующую области. Некодирующая область находится на 5'-конце гена и включает 6 экзонов: 1A–1F. Последующие 8 экзонов кодируют структурную часть белкового продукта гена VDR, которая состоит из 5 доменов [86].

Функционал гена VDR включает в себя как геномный (ядерный), так и внегеномный (на цитоплазматической мембране клеток и в цитоплазме клеток) механизм реализации своих эффектов.

Геномный путь, ведущий к изменениям в генной транскрипции, занимает от нескольких часов до нескольких дней. При проникновении в цитоплазму VD связывается со своим рецептором VDR, образуя комплекс VDR–VD, который затем транспортируется в ядро. В ядре комплекс, обладая ДНК-связывающим доменом, распознаёт специфические участки генома и активирует транскрипцию мишеных генов. В результате синтезируются новые молекулы мРНК и соответствующие белки, обеспечивающие физиологический ответ на VD [51]. Таким образом, VD реализует свои эффекты через лиганд-зависимую активацию VDR, через активный комплекс VDR–VD.

Хотя эффект кальцитриола в клетках-мишенях, прежде всего, отражает геномную активность, последние данные свидетельствуют о наличии дополнительного внегеномного механизма сигнализации через мембраны, ассоциированные со стероид-связанным рецептором быстрого реагирования (MARRS), что приводит к более стремительному ответу – от секунд до нескольких

минут. Внегеномные эффекты опосредуются синтезом вторичных мессенджеров (цАМФ, инозитолтрифосфат, арахидоновая кислота) [260]. Таким образом, внегеномные эффекты реализуются гораздо быстрее, чем геномные, однако являются менее стойкими.

Ген VDR экспрессируется как в неиммунных клетках, участвующих в поддержании кальциевого гомеостаза (энтероцитах ЖКТ, паратироцитах паращитовидных желёз, эпителиоцитах почечных канальцев), так и в иммунных клетках (макрофагах, Т- и В-лимфоцитах, дендритных клетках), а также в других типах клеток [25; 37; 48].

Семейство ядерных рецепторов (NR) можно разделить на два подсемейства. В первую группу относят рецепторы эстрогена, андрогена, прогестерона и минералокортикоидов [187]. Во вторую группу входят рецептор витамина D (VDR), рецептор щитовидной железы (TR), рецептор ретиноевой кислоты (RAR), рецептор ретиноида X (RXR) и рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом гетеродимеры друг с другом, а также может функционировать за счет взаимодействия с соответствующими лигандами на рецепторном уровне [187]. Таким образом, VDR является членом суперсемейства ядерных рецепторов и фактором регуляции транскрипции.

Многообразие эффектов лиганд-ассоциированной активации VDR объясняется тем, что рецепторы VDR обнаружены более чем в 40 типах клеток человека [2]. В этих клетках-мишенях комплекс VDR-VD работает в клеточных ядрах – в качестве фактора, влияющего на транскрипцию около 3 % всего человеческого генома и в плазматических мембранах – как модулятор экспрессии генов и координатор ряда важнейших биохимических процессов. В результате связывания кальцитриола с VDR образуется комплекс VDR-VD, который проникает в ядро [51; 52]. Далее VDR-VD образует еще более сложный комплекс с другими рецепторами, в основном с ядерными рецепторами второй группы (RAR, PPAR), но чаще всего с одним из трех ретиноид X-рецепторов (RXR α , RXR β , RXR γ) [89]. Далее образовавшийся комплекс VDR-VD-RXR находит и связывается с так называемыми Vitamin D Response Elements (VDRE) – особыми

последовательностями в ДНК, отвечающими за реакцию на витамин D [73]. VDRE представляет собой участки генома, работа которых регулируется кальцитриолом. После связывания комплекса VDR-VD-RXR с VDRE происходит активация или, наоборот, угнетение экспрессии соответствующих генов-мишеней [197].

Описано множество генов, экспрессия которых регулируется лиганд-ассоциированной активацией VDR. Например, гены DEFB4A и CAMP, кодирующие кателицидин и дефензин- β 2, обладают выраженной противомикробной активностью. Это природные антибиотики широкого спектра действия, активные в отношении многих бактерий и грибов [58].

Другим примером может служить ингибирование гена IL-22 в активированных Th-22 лимфоцитах. напрямую подавляя транскрипцию IL-22 без участия других факторов. Активная форма витамина D₃ связывается с рецептором VDR, образуя комплекс, который связывается с RXR и попадает непосредственно в ядро клетки-мишени. Комплекс VDR-VD-RXR связывается со специфическими репрессивными VDRE в промоторе гена IL-22, напрямую подавляя транскрипцию IL-22 без участия других факторов [146]. Также в организме человека комплекс VDR-VD-RXR подавляет активность генов IFN- γ (interferon- γ), центрального цитокина Th1-клеток, используя механизм конкурентного ингибирования, в первую очередь, с NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [242].

Таким образом, ген VDR кодирует внутриядерный рецептор VD, функционирующий как фактор транскрипции. Белок VDR локализуется преимущественно в ядре, цитозоле и на цитоплазматической мембране. Специфическое связывание VDR с витамином D формирует активный комплекс VDR-VD, опосредующий биологические эффекты витамина D. Этот комплекс взаимодействует с «положительными» или «отрицательными» VDRE (VDREs и nVDREs, соответственно) последовательностями ДНК в промоторных, энхансерных и супрессорных областях генов-мишеней, модулируя их транскрипцию. Включая или отключая данные гены, комплекс VDR-VD реализует как классические, так и неклассические эффекты VD.

Данный комплекс VDR-VD нельзя рассматривать отдельно, поскольку он функционирует как единый механизм. Отсутствие любого из компонентов комплекса (VD или VDR) нарушает функционирование всего комплекса и реализацию его эффектов, как геномных, так и внегеномных. Дефекты в этом механизме, например, редкие наследственные мутации гена VDR, приводят к развитию витамин D-резистентного рахита у детей [19], проявляющегося мышечной слабостью, задержкой роста, деформациями костей и вторичным гиперпаратиреозом. У взрослых дефицит VD, как правило, ассоциирован с развитием остеопороза и остеомалации [160].

1.2. Синтез, метаболизм и физиологическая роль витамина D

В литературе достаточно широко представлены данные о роли витамина D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] и его рецепторов в развитии различных патологических состояний. Витамин D был впервые описан в начале XX века [3; 119], и, несмотря на свое название, в последние годы его больше не относят к собственно витаминам, поскольку витамин D [62]:

- 1) может эндогенно синтезироваться в организме из холестерина, аналогично стероидным гормонам;
- 2) трансформируется в активную – гормональную форму, имеющую эндокринные свойства (эффекты проявляются вдали от места синтеза);
- 3) биологически неактивен в первоначальной форме;
- 4) не является кофактором ферментов, в отличие от большинства витаминов;
- 5) проявляет биологические эффекты после взаимодействия со специфическими рецепторами (VDR), располагающимися на соответствующих таргетных клетках.

Учитывая вышесказанное, правильнее относить витамин D не к собственно витаминам, а к стероидным гормонам, а патологию со стороны метаболизма витамина D – к эндокринным нарушениям.

На сегодняшний день существует две основные формы витамина D, известные как D₂ (эргокальциферол, растительная форма) и D₃ (холекальциферол), которые содержатся в продуктах животного происхождения: печень трески, тунца, рыбий жир, в меньшей степени – яичный желток, молоко [178].

В организм человека VD поступает двумя основными путями: экзогенно или алиментарно (30 %) и эндогенно (70 %). Всасывание экзогенного витамина D происходит в основном в тонкой кишке, а именно на энтероцитах двенадцатиперстной и тощей кишки при обязательном наличии желчных кислот, поскольку это жирорастворимый витамин. Далее витамин D из энтероцитов транспортируется в лимфатическую систему в виде хиломикронов [178].

Синтез эндогенного витамина D в кератиноцитах эпидермиса кожи происходит в несколько этапов. Под воздействием ультрафиолетового (УФ) излучения типа В (с длиной волны 290–320 нм) на кератиноциты, около 10 % отражается, а 90 % проникает в эпидермис кожи, обеспечивая превращение 7-дегидрохолестерола, содержащегося в основном в базальном и шиповатом слое кератиноцитов, в превитамин D₃, который превращается в холекальциферол. Данный процесс в организме человека занимает от 1,5 до 2 суток [178]. Таким образом, главный источник витамина D – это его синтез в коже, а диета играет лишь незначительную роль. Сам витамин D также чувствителен к УФ-лучам. Весь холекальциферол, который образовался в эпидермисе кожи и не поступил в системный кровоток, при дальнейшем облучении превращается в неактивные соединения (люмистерол, тахистерол) [178].

Синтезированный в эпидермисе кожи и поступивший в лимфу из энтероцитов с хиломикронами VD транспортируется белками плазмы крови, такими как альбумин и липопротеины (причем большая часть этого витамина перемещается в неактивной форме), с помощью витамин D-связывающего протеина (DBP – vitamin D Binding Protein) к местам дальнейшего метаболизма. DBP также выполняет иммуномодулирующие функции и участвует в процессах ремоделирования и минерализации костной ткани [71; 178].

Основное количество витамина D транспортируется через системный кровоток в гепатоциты печени, где происходит первый этап трансформации – гидроксирование в позиции C25 с образованием кальцидиола – $25(\text{OH})\text{D}_3$. В гепатоцитах печени витамин D превращается в 25-гидроксивитамин D ($25(\text{OH})\text{D}$) – промежуточную инертную форму VD [16; 71]. При этом часть VD выводится гепатоцитами с экскрецией желчи в двенадцатиперстную кишку [170].

Превращение витамина D в 25-гидроксикальциферол (кальцидиол) катализируется ферментом 25-гидроксилазой, представленной несколькими основными изоформами: CYP2R1, CYP27A1, CYP3A4 и CYP2J3. Данный фермент локализуется на внутренней мембране митохондрий гепатоцитов печени. Кальцидиол – основная транспортная форма витамина D, полупериод жизни которого в крови составляет 20–30 суток [16; 71].

Синтезированный в гепатоцитах печени $25(\text{OH})\text{D}_3$ транспортируется с помощью DBP в нефроциты почек, где в проксимальных извитых канальцах нефрона осуществляется второй этап его эндогенной трансформации, приводящий к формированию биологически активной формы витамина D – 1,25-дигидроксиголекальциферола, он же кальцитриол – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Более того, кроме кальцитриола также синтезируется альтернативный метаболит витамина D_3 – $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [16; 71; 178].

Синтез кальцитриола катализируется ферментом $\alpha 1$ -гидроксилазой (CYP27B1), локализованной, как и 25-гидроксилаза, на внутренней мембране митохондрий, только уже в нефроцитах проксимальных почечных канальцев нефрона почек, а также во многих других клетках (что выяснилось в последние годы) – эпителии толстой кишки, эпителии бронхов, в железистых клетках предстательной и поджелудочной железы, клетках плаценты, клетках иммунной системы – прежде всего в моноцитах и дендритных клетках, в остеобластах, кератиноцитах и других клетках [16; 71; 178]. Кроме того, имеются данные, что у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и на фоне различных аутоиммунных состояний имеет место экстраренальная продукция кальцитриола новообразованной лимфоидной тканью (например, при саркоидозе) [186].

Исследования показывают, что образование биологически активного витамина D находится под контролем нескольких сигнальных путей. При снижении концентрации Ca^{2+} и PO_4^{3-} в крови паратироциты активируют секрецию паратиреоидного гормона, который непосредственно стимулирует синтез активной формы витамина D путем активации $\alpha 1$ -гидроксилазы в нефроцитах. Одновременно паратиреоидный гормон ингибирует активность фермента 24-гидроксилазы, инактивирующего как $25(\text{OH})\text{D}$, так и $1,25$ -гидроксивитамин D [178].

Определение концентрации биологически активного витамина D не обладает особой диагностической ценностью, поскольку $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ имеет короткий период полувыведения, в отличие от $25(\text{OH})\text{D}_3$, чей период составляет 2–3 недели. При дефиците Ca^{2+} синтезируется активная форма, а при норме – альтернативный метаболит ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) [178]. Следовательно, $25(\text{OH})\text{D}_3$ имеет большее практическое значение.

Таким образом, можно заключить, что метаболизм эндогенного VD состоит из трёх этапов: эпидермального, печеночного и почечного, а также экстраренального (лимфоидной тканью). В конечном итоге, экзогенный и синтезированный в организме витамин D, как жирорастворимый витамин, депонируется преимущественно в адипоцитах жировой ткани и жировых клетках печени [169].

Биологические эффекты витамина D делятся на «классические» (кальцитропные, регулирующие фосфорно-кальциевый обмен) и «неклассические». К «неклассическим» эффектам относят регуляцию обмена веществ и клеточного цикла, активацию синтеза инсулина, противовоспалительные, антибактериальные, противоопухолевые и антигипертензивные эффекты, а также участие в регуляции функционирования иммунной системы и её компонентов [145; 235].

1.3. «Неклассические» эффекты витамина D: особенности лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D в регуляции иммунной системы и её компонентов

Витамин D, часто рассматриваемый исключительно в контексте метаболизма костной ткани, на самом деле играет гораздо более значимую роль в организме, влияя на множество физиологических процессов. Его недостаток ассоциируется с широким спектром заболеваний, выходящих далеко за рамки рахита и остеопороза. Дефицит VD, согласно последним данным мировой литературы, стал новой пандемией XXI века, который особенно выражен в северных широтах, что обусловлено дефицитом УФ-облучения у жителей мегаполисов [7; 102; 190]. В частности, в северных широтах распространённость рассеянного склероза и ревматоидного артрита обратно пропорциональна уровню УФ-облучения, что косвенно доказывает о роли VD в патогенезе данных заболеваний [35; 222].

Считается, что VD патогенетически связан с прогрессирующим ростом распространённости различных заболеваний (гипертензия, нейродегенеративные заболевания, инфекции, опухоли и др.) [221; 228; 229; 251], в том числе и аутоиммунных, таких как СД 1-го типа, саркоидоз, болезнь Крона, системная красная волчанка, псориаз и др. [29; 39; 75; 82; 193]. И это далеко не полный список всех заболеваний, которые связаны с дефицитом VD. Однако, существуют исследования, не выявившие такой взаимосвязи, в частности между заболеваемостью COVID-19, РТК и уровнем VD [6; 231]. Кроме того, прием высоких доз VD может наоборот увеличить риск инфекций [226].

Тем не менее, до конца не ясен механизм взаимосвязи дефицита VD и различных болезней, в том числе и аутоиммунных процессов, лежащих в основе вышеперечисленных заболеваний. Не исключено, что это может быть связано с влиянием VD на клетки как врожденного (макрофаги и ДК), так и адаптивного иммунитета (Т- и В-клетки).

Моноциты крови в процессе миграции в ткани трансформируются в макрофаги, которые являются клетками иммунной системы человека, посредством которых происходит взаимодействие и координация врожденного и приобретенного иммунитета. Зрелые макрофаги способны активировать иммунный ответ путем хемотаксиса, фагоцитоза и представления антигена Т-хелперам (Th). В частности, макрофаги, в отличие от моноцитов, могут подвергаться так называемой поляризации, то есть дифференцироваться на два основных фенотипа: M1 или M2, в зависимости от индуцирующих факторов и цитокинов. Например, макрофаги с фенотипом M1 уничтожают бактерии, вирусы и опухолевые клетки и формируются под непосредственным воздействием ЛПС, TNF- α (tumor necrosis factor- α), IFN- γ . В то время как, макрофаги с фенотипом M2 уничтожают внеклеточные патогены, и формируются при стимуляции IL-4 и IL-13 [150; 183; 203]. Имуногенные макрофаги с фенотипом M1 активируют Th1 иммунный ответ в результате синтеза определенного спектра цитокинов [192; 257], тогда как толерогенный M2-фенотип смещает баланс в сторону Th2-клеток [55; 135; 172].

Макрофаги, как и другие иммунные клетки экспрессируют VDR, что делает их восприимчивыми к VD [24; 25; 47]. Более того, сами макрофаги, как и ДК, способны продуцировать активную форму витамина D. Это возможно благодаря экспрессии фермента α 1-гидроксилазы в самих фагоцитах, а активность которой, в отличие от α 1-гидроксилазы нефроцитов, регулируется не паратгормоном, а непосредственно цитокинами, особенно IFN- γ . В отличие от почечной α 1-гидроксилазы, у макрофагов её экспрессия индуцируется провоспалительными сигналами (IFN- γ , LPS) и подавляется противовоспалительными медиаторами, связывая выработку активной формы D с интенсивностью иммунного ответа [147].

Кроме того, активированные M1 макрофаги экспрессировали значительно больше α 1-гидроксилазы, чем активированные M2 макрофаги. Таким образом, M1 фенотип образует больше активной формы витамина D (1,25(OH) $_2$ D $_3$) из 25(OH)D $_3$, чем M2 [147]. Указанные выше данные дают основание полагать, что координация направления поляризации макрофагов в иммунном ответе

осуществляется по аутокринному и паракринному механизмам при участии различных цитокинов, а также витамина D.

Комплекс VDR-VD оказывает в основном подавляющие эффекты на моноциты путем уменьшения экспрессии молекул МНС II, TLR2 и TLR4, что приводит к анергии дальнейших ответов. Также отмечается снижение экспрессии молекул CD40, CD80 и CD86, участвующих в ко-стимуляции иммунного ответа, а также угнетение продукции провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-17, IL-23, IFN- γ и TNF- α [14; 38; 80; 155; 176; 225; 251]. Среди активирующих эффектов комплекса VDR-VD наблюдается усиление синтеза IL-10, являющегося противовоспалительным цитокином [95; 150; 212; 251].

Из вышеперечисленного следует, что комплекс VDR-VD ингибирует иммуногенный, провоспалительный ответ макрофагов с фенотипом M1, способствуя снижению их активности. С другой стороны, комплекс VDR-VD поляризует макрофаги в направлении толерогенного фенотипа M2.

Вместе с тем, другие исследования опровергают теорию о том, что комплекс VDR-VD подавляет макрофаги с фенотипом M1. Так, например, согласно данным Wafa Nouari, воздействие комплекса VDR-VD в присутствии *Pseudomonas aeruginosa* стимулировало синтез IL-1 β , что повышало соотношение M1/M2 [224]. Следовательно, специфическое микроокружение может быть ответственно за особое программирование макрофагов при различных заболеваниях. Возможно, что M1 и M2 – это один и тот же макрофаг, просто на разных «уровнях» своей активности. Также модуляция баланса M1/M2 может предложить новый терапевтический подход для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний. Оценка фенотипа макрофагов в клинике может иметь огромную диагностическую значимость. Смена на противовоспалительный M2 фенотип, может сыграть ключевую роль в верном "терапевтическом" развитии иммунного ответа с целью предупреждения чрезмерного воспаления и повреждения здоровых клеток и тканей организма.

Дендритные клетки (ДК), как и макрофаги, являются мишенью VD [40]. Клетки-предшественники из красного костного мозга вначале дифференцируются

в незрелые ДК, которые в процессе миграции и фагоцитоза различных патогенов трансформируются в зрелые ДК. Незрелые ДК используют фагоцитоз, пиноцитоз, эндоцитоз, а также рецептор-опосредованный захват антигенов для иммунной презентации. Фагоцитирующая способность ДК отличается от способности макрофагов. ДК более селективно поглощают небольшие количества антигенных детерминант (эпитопов), которые связываются с МНС II класса в щели Бьеркмана и экспрессируются на поверхность клетки. В то же время, ДК экспрессируют CD40, CD80 и CD86 (костимуляторные белки) и приобретают способность мигрировать в регионарные лимфатические узлы, где презентуют Th0-клеткам готовый комплекс МНС-II, связанный с эпитопом [238].

Морфологически зрелые дендритные клетки характеризуются наличием множества цитоплазматических отростков, которые способствуют их подвижности и увеличивают контактную площадь с Т-лимфоцитами, а также низкой плотностью цитоплазмы и отсутствием адгезивных свойств. Функционально такие клетки утрачивают способность к фагоцитозу, обработке и презентации антигенов, однако приобретают более высокую эффективность в стимуляции дифференцировки и пролиферации Т-лимфоцитов по сравнению с макрофагами и В-лимфоцитами [66; 121].

При воздействии комплекса VDR-VD на незрелые ДК развиваются эффекты, аналогичные макрофагальным. С одной стороны, угнетается уровень экспрессии костимуляторных белков и МНС II класса, что способствует уменьшению синтеза и секреции IL-12, подавлению презентации антигена на поверхности ДК, а с другой усиливается синтез IL-10 [195; 198].

Лиганд-ассоциированная активация VDR тормозит дифференцировку моноцитов в ДК и их последующее созревание [136; 171]. Вследствие лиганда-опосредованной активации VDR дендритные клетки уменьшали продукцию IL-12 и IL-23, которые в норме усиливают ответы Th1- и Th17-лимфоцитов, принимающих ключевое участие в патогенезе аутоиммунных заболеваний [147].

Главным источником толерогенных ДК (тДК) являются незрелые ДК. Дифференцировка тДК стимулируется IL-2, IL-10, а также VD. Данные клетки

способствуют анергии Т-клеток, стимулируют Treg-лимфоциты и синтез иммуносупрессивных цитокинов (IL-10, TФР-β) [152] (Рисунок 1.1).

Таким образом, ДК, аналогично макрофагам, могут участвовать в презентации антигенов Т-лимфоцитам, служить связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, а также помогать идентифицировать патогены и регулировать баланс между иммуногенностью и иммунной толерантностью.

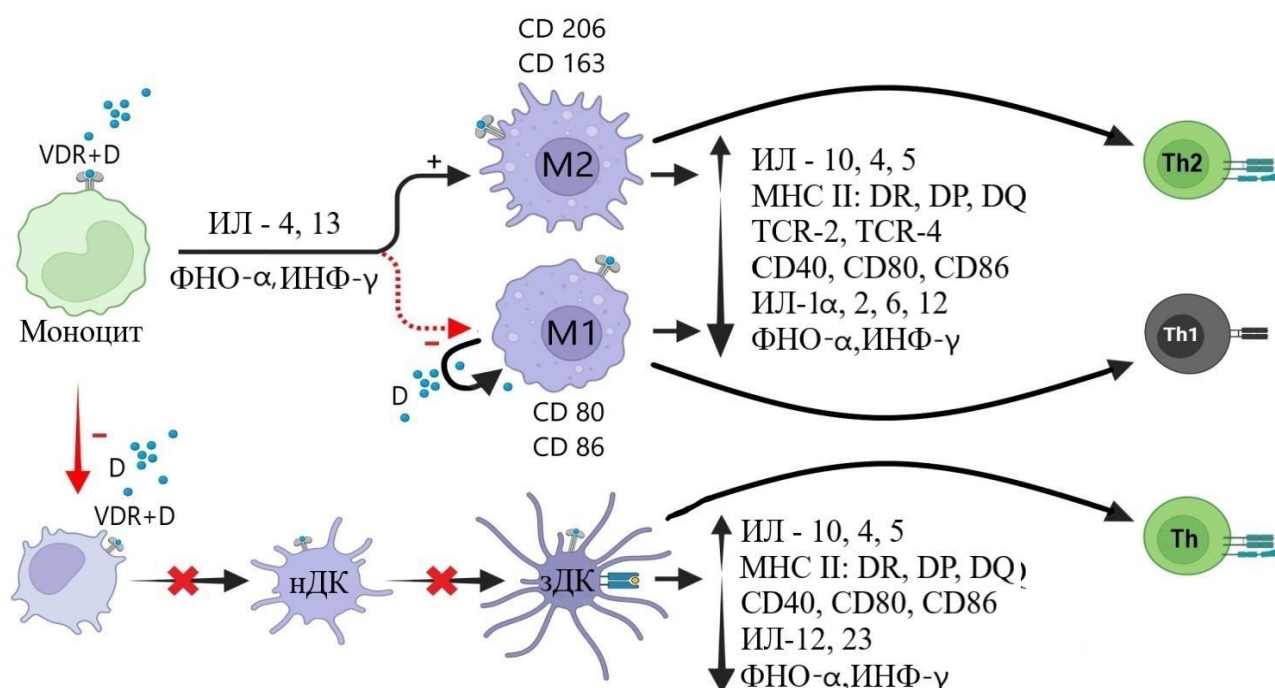


Рисунок 1.1 – Особенности влияния комплекса VDR-VD на макрофаги и ДК [рисунок разработан автором].

Примечания: нДК – незрелые дендритные клетки, зДК – зрелые дендритные клетки, M1 и M2 – фенотипы макрофагов, Th1 и Th2 – Т-хелперы 1 и 2 типа

Адаптивный иммунитет включает клеточный и гуморальный иммунитет, действующие вместе против патогенов, процесс, приводящий к иммунологической памяти после первоначальной встречи с определенным патогеном [148]. Влияние витамина D на адаптивный иммунитет включает его воздействие на популяцию Т- и В-лимфоцитов.

Предшественником Т-лимфоцитов, как и всех форменных элементов крови, является полипотентная стволовая гемопоэтическая клетка, маркером которой служит CD34. Из красного костного мозга ранние пре-Т-лимфоциты мигрируют в тимус, где происходит антиген-независимая дифференцировка Т-лимфоцитов под влиянием эпителиальных клеток тимуса, а также «позитивная» и «негативная» селекция [125]. После селекции Т-лимфоциты, подобно макрофагам, подвергаются поляризации. Незрелые CD4⁺ Т-хелперы (Th0) могут дифференцироваться в четыре основные субпопуляции [246]:

1) Th1-лимфоциты: продуцируют провоспалительные цитокины IL-2, IL-12, IFN- γ и TNF- α , активируя клеточный иммунитет. Эти лимфоциты эффективно уничтожают различные патогены, и в отдельных случаях участвуют в формировании аутоиммунных реакций [45];

2) Th2-лимфоциты: продуцируют противовоспалительные цитокины IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, активируя гуморальный иммунитет [45];

3) Th17-лимфоциты: преимущественно продуцируют IL-17. Они дифференцируются независимо от Th1 и Th2 клеток, рекрутируя нейтрофилы для борьбы с патогенами. Однако, Th17-лимфоциты также могут вызывать повреждение собственных тканей при аутоиммунных заболеваниях [131];

4) Регуляторные Т-лимфоциты (Treg, или Т-супрессоры) вырабатывают IL-10 и TGF- β . Данные цитокины ингибируют функциональную активность Th1-, Th2- и Th17-клеток. Их основная функция – предупреждение аутоиммунных и аллергических реакций. Для них характерен фенотип CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ [131].

Витамин D влияет на Т-клетки, поскольку они экспрессируют VDR [220]. Эффекторные Т-клетки подвергаются прямому и косвенному (через АПК) воздействию витамина D, что приводит к сдвигу баланса Th1/Th2 в сторону Th2 и снижению ответа Th17 [48]. В частности, как указывалось выше, комплекс VDR-VD ингибирует синтез IL-12 макрофагами и ДК. В результате Th0-клетки дифференцируются не в Th1-клетки, а в Th2-клетки.

Лиганд-ассоциированная активация VDR воздействует на Th1 и Th1-клетки, подавляя их пролиферацию, а также экспрессию и продукцию провоспалительных

цитокинов, таких как IL-22, IFN- γ [191]. Кроме того, комплекс VDR-VD напрямую модулирует транскрипцию Th2-клеток раскрывая их иммунную пластичность [81], а также связан с более высоким уровнем противовоспалительного IL-10 в сыворотке крови [79; 233]. Лиганд-ассоциированная активация VDR ингибирует Th17-лимфоциты и соответственно IL-17 [151; 185; 191]. Каким именно путем комплекс VDR-VD осуществляет это влияние, пока до конца не изучено.

Лиганд-ассоциированная активация рецепторов витамина D стимулирует Treg-лимфоциты, которые ответственны за аутоотолерантность и способствуют предотвращению аутоиммунных процессов [151; 202]. Показано, что более высокие уровни витамина D могут вызывать множество различных противовоспалительных функций, включая увеличение количества Treg-лимфоцитов. Так, согласно новым исследованиям, витамина D статистически значимо увеличивал количество Treg-лимфоцитов и снижал количество Th1- и Th17-клеток [116; 227]. Однако взаимосвязь между комплексной терапией витамином D и изменениями количества или функции Treg-клеток четко не определен.

Комплекс VDR-VD действует на В-лимфоциты, также, как и на Т-лимфоциты [37]. Некоторые исследователи считают, что активация VDR, связанная с лигандом, не оказывает прямого влияния на В-лимфоциты, а воздействует косвенно через подавление Т-лимфоцитов и снижение ими секреции IL-2 и IFN- γ , что ведёт к угнетению активности В-клеток, их размножения, дифференцировки и продукции иммуноглобулинов IgM и IgE у людей и животных, а также способствует запуску их апоптоза [87; 132]. Однако последующие работы выявили, что VD может напрямую воздействовать на В-лимфоциты, включая торможение их пролиферации и дифференцировки [87]. В частности, VD способен препятствовать превращению В-клеток в плазматические клетки, ответственные за синтез антител, вызывая их апоптоз [36]. Кроме того, В-клетки участвуют в регуляции иммунного ответа преимущественно через выделение противовоспалительного IL-10 [65].

Подводя итог, на схеме (Рисунок 1.2) показано, что комплекс VDR-VD одновременно модулирует клеточный иммунитет (Th1-клетки) и гуморальный

ответ (Th2-клетки и В-лимфоциты) за счёт перестройки их цитокинового «портрета». Механизм действия включает перенаправление наивных Th0-клеток в Th2- и Treg-направления при одновременной блокаде их дифференцировки в Th1- и Th17-клетки, что смещает баланс Th1/Th2 в сторону преобладания Th2-ответа. Клинически это проявляется снижением воспаления и уменьшением проявлений и/или частоты развития аутоиммунных заболеваний. Однако, влияние комплекса VDR-VD на иммунитет, очевидно, является более сложным, и его еще предстоит исследовать.

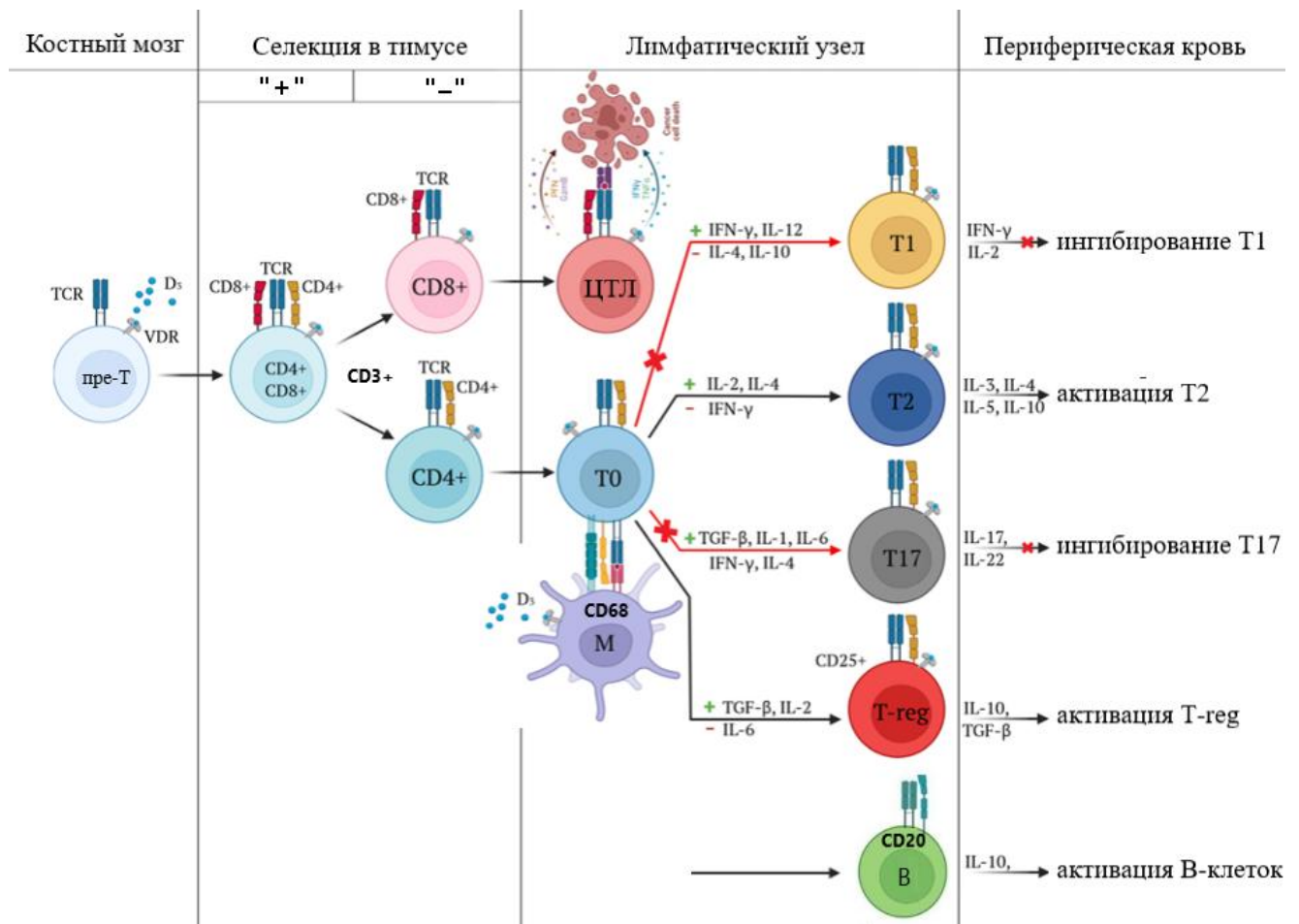


Рисунок 1.2 – Особенности влияния комплекса VDR-VD на лимфоциты [рисунок разработан автором].

Примечание: T0-, T1-, T2-, T17-, T-reg – разновидности Т-лимфоцитов, ЦТЛ – цитотоксический Т-лимфоцит, М – макрофаг

1.4. Потенциальная взаимосвязь комплекса, состоящего из рецептора витамина D и витамина D, с рецепторами иммунных контрольных точек

Семейство иммунных контрольных точек (ИКТ) является одним из ключевых элементов регуляторного звена иммунного ответа. Согласно данным литературы, семейство ИКТ состоит из нескольких основных белков. Это прежде всего рецептор запрограммированной клеточной гибели PD-1 и лиганд запрограммированной клеточной гибели PD-L, а также цитотоксический протеин CTLA-4. С одной стороны, данные рецепторы ИКТ восприимчивы к воздействию разнообразных вирусов, а также неопластических клеток, что в конечном счёте приводит к подавлению противовирусного и противоопухолевого иммунитета соответственно [77; 83; 141; 207]. С другой стороны, сами рецепторы ИКТ и их ингибиторы в виде различных лекарственных препаратов открывают новые перспективы не только в иммунотерапии опухолевых процессов [57; 134; 168; 252], трансплантационного иммунитета [115], аллергии [123], но и контроля аутоиммунных процессов [122].

T-лимфоцит активируется в результате одновременного воздействия двух ключевых сигналов. Прежде всего это связывание и взаимодействие белков, экспрессируемых на поверхности эффекторных клеток, а именно T-клеточного рецептора (TCR, T cell receptor) лимфоцита с MHC антиген-представляющих клеток, что необходимо для специфичности иммунного ответа. В это же время аналогичным образом происходит взаимодействие белка CD28, экспрессируемого на поверхности T-лимфоцита, с CD80 (B7-1) или CD86 (B7-2) на поверхности АПК, в результате которого образуется вторичный костимулирующий сигнал, обеспечивающий поддержание первичного сигнала. Тем не менее, отсутствие вторичного сигнала способствует развитию анергии или апоптозу T-клетки [59; 200; 234].

Белки ИКТ наряду с другими рецепторами и цитокинами обеспечивают тонкий механизм регуляции цитотоксических лимфоцитов во время их активации

при взаимодействии TCR с пептидом, ассоциированным с МНС I класса. В то же время, в результате взаимодействия PD-L на поверхности клетки-мишени с PD-1 на поверхности Т-клеток происходит два важных события. Во-первых, «отключение» или вовсе гибель Т-лимфоцита, а во-вторых, выживание и сохранение клетки-мишени. Данный «спасательный» механизм имеет также два разнонаправленных исхода. Прежде всего, положительный исход связан с подавлением развития аутоиммунной агрессии, в то время как отрицательный исход используется опухолевыми клетками для защиты от противоопухолевого иммунного надзора [122].

Белок PD-1 (CD279) является одним из наиболее известных белков ИКТ, который экспрессируется на иммунокомпетентных клетках, таких как моноциты, макрофаги, ДК, натуральные киллеры, Т- и В-лимфоциты. Белок PD-1 совместно с комплементарными лигандами PD-L1 (CD274 или B7-H1) и/или PD-L2 (CD273 или B7-DC) образует семейство рецепторов B7:CD28, в составе внутриклеточного домена которых присутствуют ингибирующие тирозинсодержащие последовательности аминокислот (ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) [122]. Кроме того, активированный TCR на поверхности Т-лимфоцита потенцирует экспрессию PD-1, в то время как индукция молекулами IFN I и II типа совместно с JAK2- ассоциированными белками увеличивает экспрессию PD-L1 [142]. Таким образом, белок PD-1 и VDR экспрессируются на одних и тех же клетках, что косвенно подтверждает их взаимосвязь.

В результате связывания и взаимодействия рецептора PD-1 со своим лигандом PD-L1 и/или PD-L2 возникает внутриклеточный сигнал, который стимулирует фосфорилирование двух последовательностей – ITIM и ITSM (immune receptor tyrosine-based switch motif) – с последующей активацией двух фосфатаз: SHP-1 и SHP-2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase) [122]. В свою очередь, SHP-1 и SHP-2 подавляют фосфорилирование сигнального пути PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B), ассоциацию ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) и CD3 ζ комплекса, что приводит к «отключению» TCR на поверхности Т-лимфоцита [127; 177]. С одной стороны,

инактивация Т-клеток проявляется снижением их функциональной активности, в виде снижения синтеза IL-2 и IFN- γ , а с другой стороны – происходит их гибель путём апоптоза, что является следствием ингибирования факторов транскрипции NF- κ B и AP-1 (activator protein 1) [122; 248]. Подобные эффекты у Т-клеток вызывает комплекс VDR-VD-RXR. Таким образом, не исключено, что потенциальная взаимосвязь между VD и ИКТ кроется в активации перечисленных внутриклеточных сигнальных путей (Рисунок 1.3).

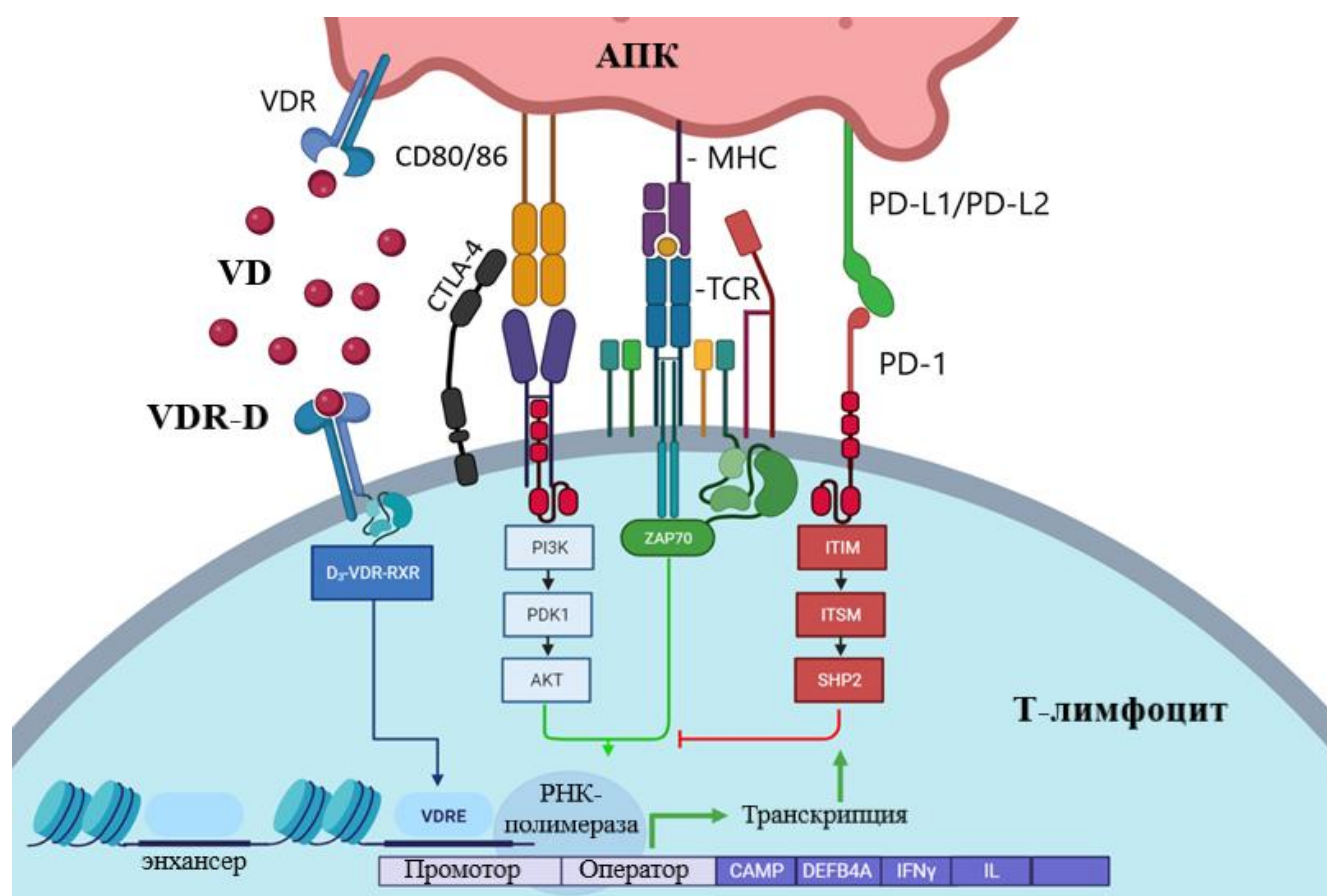


Рисунок 1.3 – Взаимодействие комплекса VDR-VD с иммунной контрольной осью PD-1/PD-L1/PD-L2 [схема выполнена непосредственно самим автором].

Примечание: VD – витамин D, CTLA-4, PD-1 и PD-L1/ PD-L2 – рецепторы иммунных контрольных точек, АПК – антигенпрезентирующая клетка, TCR – Т-клеточный рецептор, MHC – главный комплекс гистосовместимости, VDR – рецептор витамина D

В то же время на поверхности Т-лимфоцита также экспрессируется цитотоксический протеин-4, ассоциированный с Т-лимфоцитами, также известный как CTLA-4 (CD152). CTLA-4 конкурирует с рецептором CD28 за лиганд семейства В7: В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86). Связавшись с лигандом В7, активированный комплекс CTLA-4 ингибирует активацию Т-лимфоцитов [122]. Кроме того, CTLA-4 ведёт к подавлению нижестоящих путей PI3K/Akt, циклина D3, CDK4/CDK6 и NF-κB, изменяя таким образом дифференцировку Т-лимфоцитов [166]. Подобный ингибирующий эффект на NF-κB имеет лиганд-ассоциированная активация VDR. В то же время VD стимулирует путь PI3K/Akt [253], в отличие от CTLA-4.

На основании современных научных данных известно, что помимо ДК, Т- и В-лимфоцитов, PD-1, PD-L1/2 и CTLA-4, также экспрессируются опухолевыми клетками, угнетая таким образом неопластический иммунный надзор [64; 122; 259]. В качестве «антидота» были разработаны соответствующие моноклональные антитела к белкам ИКТ, которые нивелировали негативное влияние злокачественных клеток на функции Т-лимфоцитов в результате функциональной «реанимации» последних. Данные моноклональные антитела широко используются в практической медицине.

Макрофаги экспрессируют PD-1, при этом его экспрессия более специфична для противовоспалительного M2-фенотипа. Блокада PD-1 способна переключать макрофаги из M2 в M1, что приводит к росту активности фагоцитоза и снижению объёма опухоли [50]. В то же время активный комплекс VDR-VD преобразует макрофаги в толерогенный M2-фенотип, что свидетельствует о синергетическом действии витамина D с PD-1.

Потенциальная взаимосвязь комплекса VDR-VD с рецепторами ИКТ, такими как PD-L1 и PD-L2, представляет собой перспективное, но недостаточно изученное направление иммунологии. Поскольку комплекс VDR-VD увеличивает синтез IL-10 и IL-4, вполне вероятно, что он также будет увеличивать экспрессию PD-L1 и PD-L2 соответственно, но, скорее всего, косвенно (через внутриклеточные сигнальные пути), а не напрямую.

Однако влияние VD на экспрессию PD-L1 не является однозначным. В исследовании Augun H. et al. (2022) было показано, что при тяжелом течении COVID-19 назначение VD приводило к ингибированию экспрессии PD-L1 [30]. Это указывает на сложность взаимосвязи и возможность контекстно-зависимого действия VD на ИКТ. В итоге не совсем ясно, каким образом ось VDR-VD-PD-L1 и ось VDR-VD-PD-L2, а также ось VDR-VD-CTLA-4 играют роль контролирующего звена в иммунорегуляции онкологических и аутоиммунных процессов, что требует дальнейших исследований в данной области.

1.5. Современные представления о продуктивном гранулематозном воспалении и роли VDR в его реализации

Патогенез гранулематозного воспаления, приводящего к образованию иммунных гранул, представляет собой сложный процесс, включающий строго регулируемое взаимодействие различных иммунных клеток и медиаторов. Современные представления, основанные на обширных исследованиях, подробно описанных в зарубежной медицинской литературе, указывают на многоэтапный процесс, обусловленный постоянной антигенной стимуляцией и нарушением регуляции иммунных реакций.

Иммунная гранулёма (наиболее распространённый тип гранулёмы) представляет собой гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ IV), в которой участвуют Т-хелперы (CD4⁺) и клетки макрофагального ряда. Макрофаги являются преобладающим типом клеток в гранулемах. На клеточном уровне ключевым в патогенезе гранулёмы является дифференцировка моноцитов в зрелые макрофаги [201]. Данный процесс можно определить гистологически (увеличение в три раза размеров клетки и их органелл, гофрированной цитоплазматической мембраны) и микроскопически (появление везикул и гранул в цитоплазме), а также иммуногистохимически, так как моноциты экспрессируют на своей клеточной поверхности в основном CD14 и CD16 [182; 223], тогда как макрофаги – CD68 [15].

Кроме того, на дифференцировку моноцитов оказывает влияние комплекс VDR-VD, способствуя их дифференцировке в макрофаги M2-фенотипа, на которых экспрессируются PD-L1 [92]. С другой стороны, лиганд-ассоциированная активация VDR подавляет макрофаги с фенотипом M1, хотя эти данные противоречивы.

При встрече с антигеном они фагоцитируют персистирующий антиген, расщепляют его до эпитопов, после чего связывают их с МНС II класса в щели Бьеркмана и мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где представляют их на своей поверхности наивным CD4⁺ лимфоцитам, инициируя адаптивный иммунный ответ. После контакта с эпитопом происходит дифференцировка Th0-лимфоцитов в Th1-лимфоциты под влиянием макрофагов, синтезирующих IL-12. Активированные Th1-лимфоциты синтезируют IFN- γ и TNF- α , ключевые цитокины гранулематозного воспаления. Оба цитокина, а также VD активируют макрофаги, усиливая их бактерицидную активность и способствуют образованию эпителиоидных и многоядерных гигантских клеток, являющиеся отличительным признаком гранулематозного воспаления [20; 140; 165; 174].

В иммунных гранулёмах можно обнаружить несколько субпопуляций T-лимфоцитов: T-хелперы, Treg-клетки и CD8⁺ клетки. В зависимости от этиологии гранулёмы в ней можно выявить различные типы поляризованных эффекторных CD4⁺-клеток, таких как Th1-, Th2-, Th3- или Th17-лимфоциты (например, в туберкулёзных и шистосомных гранулёмах определяются Th1- и Th2-клетки соответственно) [167]. Кроме того, T-лимфоциты наряду с моноцитами экспрессируют VDR [157], а также PD-L1 [122].

Как известно, Treg-клетки играют важную роль в контроле воспалительной реакции и предотвращении чрезмерного повреждения тканей. Они продуцируют IL-10 и TGF- β , подавляющие активность клеток Th1 и Th17, и ограничивающие воспаление [149]. Баланс между клетками Th1/Th17 и Treg критически важен для определения размера и степени образования гранулемы. Лиганд-ассоциированная активация VDR способствует сдвигу баланса в сторону Treg-лимфоцитов [84].

В-клетки встречаются реже, чем макрофаги и Т-клетки, но вырабатывают антитела (АТ) против антигена, что усиливает фагоцитоз макрофагами и общий иммунный ответ [129]. В то же время витамин D модулирует иммунный ответ, подавляя пролиферацию активированных В-клеток и индуцируя их апоптоз [87]. Скопление эпителиоидных макрофагов, гигантских клеток и лимфоцитов формирует гранулему, к которой с созреванием присоединяются фибробласты, образующие фиброзную капсулу, изолирующую антиген и ограничивающую его распространение (Рисунок 1.4).

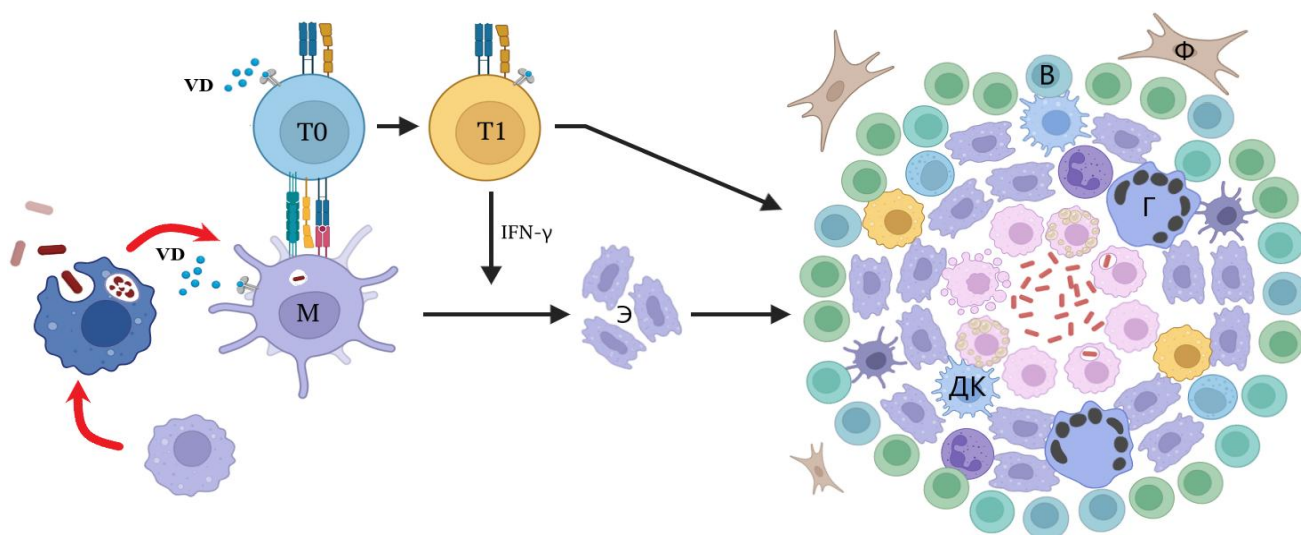


Рисунок 1.4 – Формирование иммунной гранулемы [рисунок разработан автором].

Примечание: М – макрофаг, Э – эпителиоидная клетка, Т – Т-клетки, ДК – дендритные клетки, Ф – фибробласт, Г – гигантская клетка, В – В-клетка, VD – витамин D, INF- γ – гамма интерферон

Лиганд-ассоциированная активация VDR ингибирует продукцию IFN- γ , лимфотоксина, IL-22 и пролиферацию определённых субпопуляций Т-лимфоцитов [146; 204]. Исследования *in vitro* показали, что 1,25(OH) $_2$ D $_3$ стимулирует пролиферацию, дифференцировку и трансформацию моноцитов в эпителиоидные клетки [165]. С другой стороны, VD ингибирует дифференцировку моноцитов в ДК и созревание последних, одновременно стимулируя их апоптоз [171]. Таким

образом, эффекты лиганд-ассоциированной активации VDR на развитие гранулёмы неоднозначны. Кроме того, на сегодняшний день отсутствуют данные о взаимосвязи комплекса VDR-VD и белков иммунных контрольных точек (PD-1, PD-L, CTLA), что требует дальнейших исследований в данной области.

Исходя из этого, морфогенез гранулемы складывается из четырех стадий: накопление моноцитов в очаге повреждения, трансформация в макрофаги, трансформация макрофагов в эпителиоидные клетки и образование незрелой гранулемы, а также слияние эпителиоидных клеток и образование гигантских клеток, что приводит к формированию зрелой гранулемы. Исход гранулематозного воспаления зависит от природы антигена и эффективности иммунного ответа. Если антиген устранен, гранулема может рассосаться, при этом макрофаги подвергаются апоптозу и уничтожаются другими иммунными клетками. Однако, если антиген сохраняется, гранулема может стать хронической, что приведет к фиброзу и повреждению тканей.

Итоги анализа литературы указывают на устойчивый и значимый интерес исследователей к механизмам влияния витамина D на межклеточные взаимодействия в очаге иммунного воспаления, а также его применения в качестве лекарства для уменьшения негативных последствий аутоиммунных заболеваний. В настоящее время взаимодействие витамина D с механизмами иммунных контрольных точек почти не изучено. Между тем его исследование имеет принципиальное значение для выработки базовых теоретических представлений о биологических эффектах витамина D в иммунорегуляции и для создания новых терапевтических подходов при широком спектре заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальная модель и дизайн исследования

Экспериментальное исследование выполнено на 75 самцах белых крыс Wistar, которое проводилось на базе Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского (г. Симферополь, Россия). С целью индуцирования воспаления была создана периферическая (интрадермальная) модель SOD A-инициированного иммунного гранулематозного воспаления путем модификации более ранней модели саркоидоза легких [107]. Выбор данной модели обоснован тем, что:

1. Саркоидоз считается морфологическим «эталонном» для изучения различных неспецифических иммунных гранулем, поскольку многие аутоиммунные заболевания с гранулематозным типом воспаления могут клинически, рентгенологически и гистологически имитировать саркоидоз [94; 120; 173; 184];

2. Иммунное гранулематозное воспаление, индуцированное SOD A в эксперименте на мышах, показало гистологический и иммунофенотипический профили саркоидоза, которые хорошо коррелировали с профилями при саркоидозе у человека [208];

3. Обнаружена обратная зависимость между уровнем витамина D и ростом числа случаев различных гранулематозных заболеваний, в том числе саркоидоза [88; 110].

SOD A (последовательность AAAIAGAFGSFDKFR, чистота > 80 %) синтезирована в 2023 году в AtaGenix Laboratories (Ухань, КНР) и применялась для сенсibilизации животных. Массу SOD A определяли на аналитических весах AXIS (диапазон: 0,01–50,0 г; цена деления: 0,0001 г) [28].

Согласно дизайну исследования, животных случайным образом разделили на 2 серии: контрольную (30 крыс) и экспериментальную (45 крыс). Схема эксперимента изображена на Рисунке 2.1.

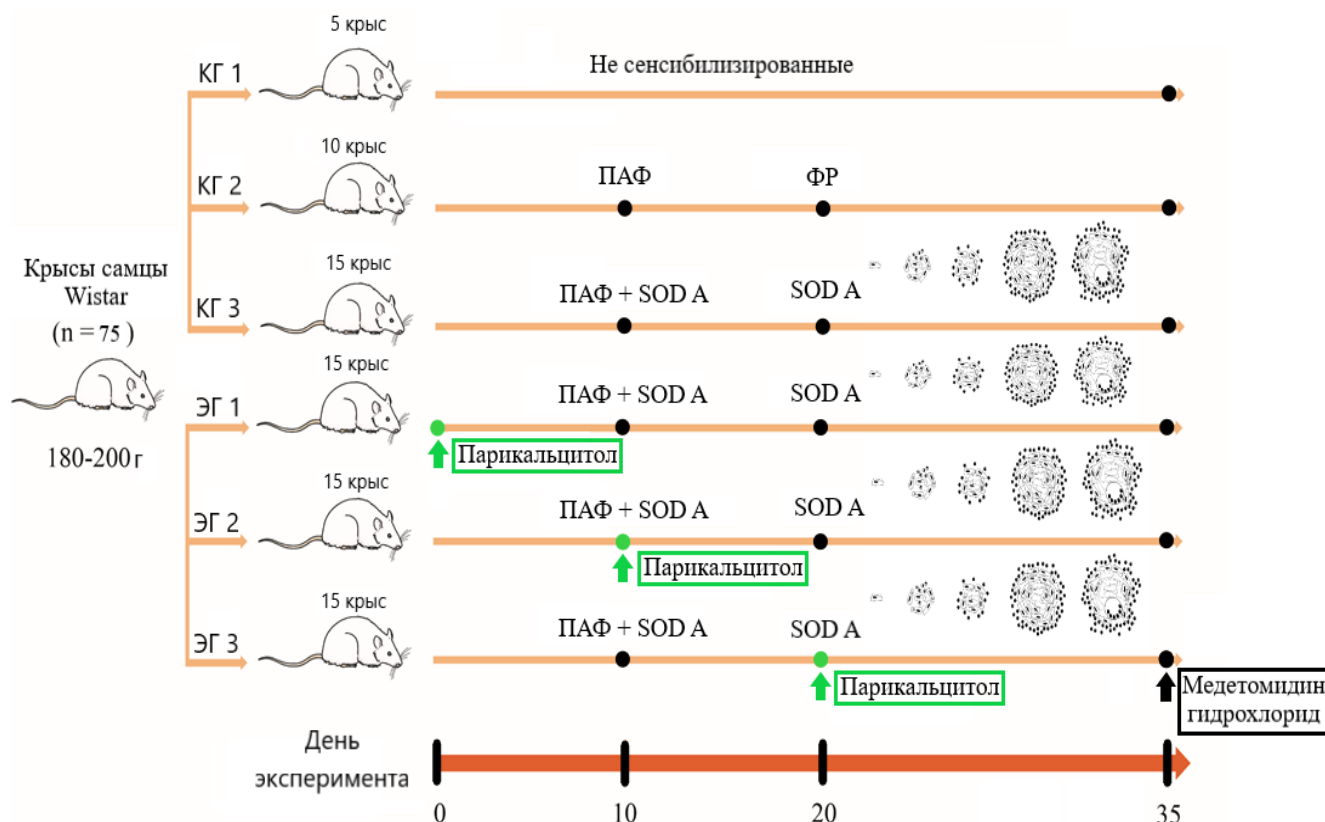


Рисунок 2.1 – Схема эксперимента воспаления, индуцированного SOD A

Примечание: КГ – контрольная и, ЭГ – экспериментальная группа животных, ПАФ – полный адьювант Фрейнда, ФР – физиологический раствор, SOD A – супероксиддисмутаза A

В контрольной серии животных выделили три группы: первая контрольная группа (КГ 1) – нечувствительные животные (5 крыс); КГ 2 – животные, чувствительные к полному адьюванту Фрейнда (ПАФ) без коррекции (10 крыс); КГ 3 – животные, чувствительные к ПАФ и SOD A (15 крыс). В экспериментальной серии животных выделили три экспериментальные группы (ЭГ 1, ЭГ 2 и ЭГ 3) по 15 крыс в каждой.

В соответствии с поставленной целью и задачами изучалось влияние парикальцитола на развитие и морфогенез воспаления, индуцированное SOD A. В первый день животные первой экспериментальной группы начали получать парикальцитол.

На 10-й день эксперимента всех животных, за исключением крыс КГ 1 и КГ 2, парентерально (интрадермально, в область задней поверхности шеи) сенсibilизировали SOD A из расчета 50 мкг SOD A, растворенных в 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда, на каждого животного. В этот же день животные второй экспериментальной группы начали получать парикальцитол (с момента сенсibilизации SOD A).

На 20-й день эксперимента всем животным, кроме КГ 1 и КГ 2, вводили разрешающую дозу SOD A из расчета 50 мкг в 0,25 мл физиологического раствора на каждого животного, а крысы третьей экспериментальной группы начали получать парикальцитол.

Животные всех экспериментальных групп в качестве коррекции получали синтетический аналог VD – парикальцитол (19-нор-1,25-гидрокси-витамин D2) один раз в 3 дня из расчета 200 нг/животное (0,2 мкг), который вводили внутрибрюшинно в область гипогастрия по средней линии живота до завершения эксперимента. Данная схема введения парикальцитола, используемая каждые три дня, ранее показала свою эффективность на животных другой экспериментальной модели [217], несмотря на то, что существуют и другие схемы введения VD [32; 34]. Контрольным крысам с аналогичной кратностью и дозой вводили физиологический раствор.

Всех животных выводили из эксперимента на 35-е сутки с соблюдением биоэтических норм посредством декапитации после введения 0,1 % раствора медетомидина гидрохлорида (объем – 0,2 мл/животное) в область гипогастрия по средней линии живота.

Обоснование выбора парикальцитола, супероксиддисмутазы A и дизайна

исследования

Выбор парикальцитола обусловлен следующими факторами:

1. Парентеральное введение обеспечивает точный контроль дозировки и исключает вариабельность абсорбции, свойственную пероральному приёму;

2. Согласно данным, представленным на сайте <https://rlsnet.ru> (Регистра лекарственных средств России, РЛС), парикальцитол обладает большей селективностью действия на VDR и оказывает минимальное влияние на кальциево-фосфорный обмен по сравнению с другими аналогами витамина D, что снижает риск развития побочных эффектов, связанных с нарушением минерального обмена

3. Синтетический характер парикальцитола обеспечивает стабильность препарата, удобство получения, хранения и применения.

Подбор оптимального режима дозирования и кратности введения парикальцитола опирается на широкий спектр экспериментальных данных, связанных с использованием синтетического VD, который не показал никаких токсикологических побочных эффектов в своих группах животных [60; 67; 240]. В соответствии с преобразованием дозы между человеком и крысой [111] использованное количество парикальцитола соответствует рекомендуемым суточным количествам для взрослого человека весом 60 кг. Выбранная доза недостаточна для достижения максимальной концентрации у крыс, так как исследование не предусматривало анализ гипервитаминоза D и одновременно требовало сохранения физиологической нормы VD во время эксперимента.

При использовании парикальцитола необходимо учитывать возможное развитие побочных реакций, таких как идиосинкразия, гиперчувствительность, гиперкальциемия, сыпь, ангионевротический отек, гипопаратиреоз [9], а также потенциальное повреждение стенки кишки при внутрибрюшинном введении, что важно учитывать при интерпретации полученных результатов.

Выбор внутрибрюшного введения парикальцитола обусловлен следующими

причинами:

1. Простота исполнения и снижение стресса для животных. При внутривенных инъекциях часто возникают трудности с доступом к мелким венам мелких грызунов, что требует дополнительных навыков и может повышать стресс у животных. Интраперитонеальное введение, напротив, обеспечивает менее инвазивный и более быстрый метод введения препарата, а также уменьшает вероятность осложнений, таких как инфицирование [216].

2. Более равномерная абсорбция и стабильное поступление препарата в системный кровоток. Интраперитонеальное введение часто обеспечивает медленную, но более постоянную абсорбцию препарата через перитонеальную мембрану, что позволяет избежать резких пиков концентраций, характерных для внутривенных вводов [236].

3. Снижение риска резких токсических эффектов. Медленная абсорбция (характерная для интраперитонеального введения) снижает вероятность резкого превышения терапевтических концентраций, что уменьшает риск токсических реакций на препарат [163].

4. Удобство проведения массовых экспериментов. Техника внутрибрюшной инъекции проще для одновременной обработки большого числа животных, что особенно важно при выполнении массовых экспериментов с группами лабораторных крыс [22].

SOD A является фактором вирулентности, секретлируемым патогенными видами *Mycobacterium* и *Nocardia* в больших количествах, который превращает свободные радикалы кислорода, генерируемые макрофагами хозяина, в перекись водорода [104; 179]. Выбор данного антигена обусловлен его известной ролью в патогенезе гранулематозного воспаления и возможностью использования в экспериментальных моделях. У животных возникают иммунные реакции против SOD A, в том числе в виде развития гранулем [107; 208].

Экспериментальная часть исследования была разделена на две серии и обусловлена различными целями. Первая серия была направлена на оценку безопасности и влияния парентерального (интрадермального) введения SOD A на

основе морфологического анализа тканей животных одного возраста и массы. Данный этап позволил определить оптимальные дозы и протокол введения антигена для индукции гранулематозного воспаления.

Во второй серии эксперимента, которая включала три экспериментальные группы (ЭГ 1, ЭГ 2, ЭГ 3), изучались морфологические эффекты парикальцитола на конкретной экспериментальной модели с учетом времени введения парикальцитола относительно сенсibilизации антигеном и введения разрешающей дозы SOD A. Такой подход позволил оценить влияние парикальцитола на различные стадии развития гранулематозного воспаления, а также сравнить схемы его применения.

Использование трех экспериментальных групп с различными схемами введения парикальцитола относительно сенсibilизации SOD A позволило проанализировать динамику изменений клеточных популяций и их взаимодействий на различных стадиях развития гранулематозного воспаления: до сенсibilизации (ЭГ 1), в период сенсibilизации (ЭГ 2) и после введения разрешающей дозы антигена (ЭГ 3). Такой подход обеспечил более полное понимание механизмов действия парикальцитола на иммунную систему в условиях экспериментального иммунного воспаления, инициированного по механизму гиперчувствительности замедленного типа IV.

Таким образом, выбранная схема эксперимента позволяет сравнить различные временные режимы введения парикальцитола и оценить его влияние на морфогенез иммунного гранулематозного воспаления, выявляя оптимальные условия для выявления потенциальных точек приложения эффектов лиганд-ассоциированной активации VDR в очаге иммунного гранулематозного воспаления. Такой подход обеспечивает строгий контроль условий эксперимента и позволяет получить объективные данные для дальнейшей интерпретации результатов.

Условия содержания животных и этические аспекты

Крыс всех групп содержали в условиях вивария [12] со стандартным рационом при свободном доступе к пище и воде при естественном световом режиме, уход за ними осуществляли в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МинВУЗа № 724 от 13.11.1984).

Исследование проведено в соответствии с Законом РФ от 14.05.1993 №4979-1 (в ред. От 28.12.2024) «О ветеринарии» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». При проведении исследования соблюдены принципы Хельсинкской декларации, принятые Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.), а выведение животных из эксперимента осуществлялось в соответствии с «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» Международного совета медицинских научных обществ (CIOMS) (1985 г.).

При проведении исследования учтены требования документа «О правовых, законодательных и этических нормах и правилах для научных морфологических исследований». Соблюдение фундаментальных биоэтических принципов подтверждено протоколом № 11 от 21.11.2024 комитета по биоэтике «Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского».

Кроме того, уход за животными включал регулярную уборку и дезинфекцию помещений, что снижало риск развития инфекционных заболеваний. Все мероприятия проводились в строгом соответствии с утвержденными нормативами и под контролем независимого комитета по биоэтике, что подтверждало соблюдение высочайших стандартов безопасности и гуманного обращения с животными.

2.4. Методы исследования гранулематозного инфильтрата

Для всестороннего анализа динамики клеточных популяций и цитокинового профиля в иммунной грануле применен комплекс методов, позволяющий оценить численность, фенотип и взаимодействие клеток, а также проанализировать цитокиновый профиль. Выбор методов обусловлен необходимостью получения максимально полной и объективной информации о структурно-функциональных преобразованиях гранулемы под влиянием парикальцитола.

После эвтаназии и декапитации животных в коже (в месте введения SOD A) определяли местное уплотнение тканей (инфильтрат). Данный участок кожи фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине с последующей гистологической проводкой через батарею спиртов восходящей концентрации по стандартной методике с использованием гибридного гистологического процессора Logos (Milestone Medical, Италия) и модуля Leica EG1150 (Leica Biosystems, Германия), после чего заливали в парафин в соответствии с принятыми методиками. Из парафиновых блоков готовили серийные гистологические срезы толщиной 4–5 мкм с использованием автоматического ротационного микротомы Leica RM2255 (Leica Biosystems, Германия). Для проведения описательного анализа морфологических преобразований использовали окраску гематоксилином и эозином.

С целью идентификации различных клеточных элементов в областях гранулематозного инфильтрата применяли метод ИГХ-окрашивания с использованием поликлональных антител и системы визуализации. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на гистологических срезах толщиной 4 мкм, изготовленных из блоков, залитых в парафин, с использованием полуавтоматического иммуногистейнера BondMax (Leica Biosystems, Германия).

Протокол окрашивания проводился в соответствии со стандартными методами и включал депарафинизацию, термическую демаскировку антигенов с использованием раствора Bond Epitope Retrieval 2 (Leica Biosystems, Германия) при $\text{pH} = 9$ в течение 20 минут при температуре 96°C , блокирование активности пероксидазы, инкубацию с антителами в течение 15 минут при комнатной

температуре и визуализацию с использованием системы детектирования Bond Polymer Refine (Leica Biosystems, Германия).

Для идентификации различных клеточных популяций иммунной гранулемы использовали следующие поликлональные антитела (ПКАТ):

1. ПКАТ против CD1a IgG (кат. #DF13391; Affinity Biosciences ®);
2. ПКАТ против CD3 IgG (кат. #DF6594; Affinity Biosciences ®);
3. ПКАТ против CD20 IgG (кат. #DF13319; Affinity Biosciences ®);
4. ПКАТ против CD68 IgG (кат. #DF7518; Affinity Biosciences ®);
5. ПКАТ против PD-L1 IgG (кат. #DF6526; Cloud-Clone ®);
6. ПКАТ против VDR IgG (кат. #DF6917; Affinity Biosciences ®).

Все гистологические срезы сканировали с помощью гистосканера Aperio CS2 (Leica Biosystems, Германия) с последующим анализом цифровых изображений с использованием программного обеспечения Aperio ImageScope и ImageJ.14 [188].

Интенсивность иммунопозитивного окрашивания (для ядерной, цитоплазматической или мембранной иммуногистохимической экспрессии маркера, если таковая имеется) с использованием диаминобензидиновой метки оценивали полуколичественно как сумму общей интенсивности коричневатого окрашивания: минимальная реакция (или ее отсутствие), слабopоложительная, умеренно положительная или сильно положительная. Образцы небных миндалин использовали в качестве положительного контроля, а образцы, обработанные без применения АТ, – в качестве отрицательного контроля.

Просмотр цифровых изображений микропрепаратов гранулематозного инфильтрата с последующей морфологической оценкой иммунного воспаления осуществляли с помощью гистоморфометрического комплекса на базе микроскопа Olympus CX-33, включающего микроскоп Olympus CX-33 с объективами (4x Plan ∞/-, Plan 10x x/0,25, Plan 40x x/0,65, ∞/0,17), цифровой фотоаппарат Olympus C 5050Z и персональный компьютер.

Для оценки клеточных популяций в очаге саркоидоз-подобного воспаления применяли иммуногистохимическое окрашивание гистопрепаратов с использованием ПКАТ против маркеров CD1a, CD3, CD20, CD68, PD-L1 с

последующим описанием и количественным анализом иммунных клеток. На первом этапе изучали экспрессию CD68 и CD1a (макрофагов и ДК), затем – экспрессию CD3 (Т-клетки), CD20 (В-клетки) и лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1).

Поскольку мембранное и цитоплазматическое окрашивание часто неразличимы из-за высокого ядерно-цитоплазматического соотношения, при анализе уровня экспрессии маркера учитывали только окрашивание лимфоцитов и АПК, а окрашивание нейтрофилов, эозинофилов и плазматических клеток не учитывали. В частности, в количественном анализе не учитывали ложноположительную окраску маркеров, например, окрашивание ядер или ядрышек, с применением мембранного или цитоплазматического маркера.

На ИГХ-срезах, с использованием программного обеспечения ImageJ.1.54g определяли состав клеточных популяций и количество клеток в различных областях гранулематозного инфильтрата (область иммунной гранулёмы, межгранулёмное пространство) [188].

Молекулярно-генетический метод. Для определения относительной экспрессии мРНК таргетных генов осуществляли выделение РНК из срезов, полученных из залитых в парафин гистологических блоков с использованием готовых коммерческих наборов (HiPure FFPE RNA Kit для выделения РНК из FFPE-блоков на колонках с силикагелевой мембраной (Magen IVD4144, Китай)). Количество и чистоту РНК определяли с использованием спектрофотометра Nano-500 (Helicon®) с длиной волны поглощения 260/280 нм. В соответствии с инструкцией производителя с использованием набора HiScript III One Step qRT-PCR Probe Kit для обратной транскрипции и кПЦР в одной пробирке с зондами (Vazyme, Q225-EN01, Китай) осуществляли обратную транскрипцию РНК в кДНК с последующим проведением кПЦР анализа на аппарате CFX 96 TOUCH Real-Time PCR (Bio-Rad®).

Термоциклирование ПЦР включало три этапа:

- этап 1 – при температуре 50°C продолжительностью 2 минуты;
- этап 2 – при температуре 95°C продолжительностью 10 минут;

– этап 3 (заключительный) – 40 циклов, каждый из которых включал фазу при температуре 95°C (15 секунд) и при температуре 60°C (1 минуту).

Относительную экспрессию мРНК оценивали для генов IL-1 β (интерлейкин-1 бета), TNF- α (фактор некроза опухоли альфа) и IL-10. В качестве стандартного (конститутивного) гена использовали мРНК β -актина. Подбор праймеров осуществляли с использованием базы данных Primer-BLAST (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Праймеры, использованные для ПЦР

мРНК	Последовательности прямых (F) и обратных (R) праймеров
β -актин	F: AAGTACCCCATTTGAACACGG
	R: ATCACAATGCCAGTGGTACG
IL-1 β	F: TTGAGTCTGCACAGTTCCSS
	R: GTCCTGGGGAAGGCATTAGG
TNF- α	F: CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA
	R: CTCCTGGTATGAAATGGCAAATC
IL-10	F: CTGGCTCAGCACTGCTATGT
	R: GCAGTTATTGTCACCCCGGA

Кратные изменения экспрессии гена рассчитывали методом Δ СТ [41], где Δ СТ – это разница между значением СТ гена-мишени и значением СТ гена внутреннего контроля. $\Delta\Delta$ СТ – это разница между значением Δ СТ в целевом образце и значением Δ СТ в контрольном образце. $2^{-\Delta\Delta$ СТ – это кратное изменение экспрессии целевого гена в целевом образце по сравнению с контрольным образцом.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel, R и RStudio [5; 11; 90]. Статистический анализ включал в себя построение вариационных рядов, полученных данных, вычисление среднего арифметического значения, среднеквадратического отклонения, ошибки средней, коэффициента

вариации и величины отклонения показателя от контроля в процентах. Полученные количественные данные подвергали предварительному анализу на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова [101]. Оценку статистической достоверности отклонений полученных результатов от контроля осуществляли с использованием параметрического метода сравнения двух независимых выборок (в случае нормального распределения) – критерия Стьюдента, либо с использованием непараметрического метода сравнения двух независимых выборок (в случае случайного распределения) – U-критерия Манна-Уитни. Результаты исследования выражали с помощью медианы (M), первого (Q1) и третьего квартиля (Q3) в виде M [Q1; Q3]. Различие считали статистически достоверным при значении P (вероятность ошибки) $< 0,05$ [5; 11].

Все измерения и исследования производили на сертифицированном оборудовании, прошедшего метрологическую поверку, и на вспомогательном оборудовании, прошедшем аттестацию на базе отдела морфологии с электронной микроскопией Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского».

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НА ФОНЕ СУПЕРОКСИДИСМУЗЫ А-ИНДУЦИРОВАННОГО

ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ КРЫС ДО И ПОСЛЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПАРИКАЛЬЦИТОЛА

3.1. Структурно-функциональные особенности гранулематозного инфильтрата контрольных крыс (без коррекции)

После декапитации животных на фоне парентеральной седации в коже выявляли инфильтрат, который имел плотную консистенцию и располагался в дерме в области задней поверхности шеи, на уровне шейно-грудного отдела позвоночника крыс. Гистологически инфильтрат характеризовался диффузным гранулематозным воспалением. Плотный инфильтрат располагался не только подкожно, но и внутримышечно, что свидетельствовало о распространении патологического процесса в глубже лежащие ткани.

Кроме местного уплотнения, визуально отмечали наличие лимфаденопатии (увеличения регионарных лимфатических узлов), особенно в подмышечной и затылочной области животных. В отличие от контрольных крыс третьей группы (КГ 3), получавших SOD A, у контрольных крыс (не сенсibilизированных – КГ 1 или сенсibilизированных только полным адьювантом Фрейнда – КГ 2) обнаружили отсутствие инфильтрата и гранулематозного воспаления при микроскопии. Таким образом, дальнейшие морфологические особенности диффузного гранулематозного инфильтрата продемонстрированы исключительно в рамках третьей контрольной группы. Патологический гранулематозный инфильтрат подвергли обзорному гистологическому описанию с использованием стандартной окраски гематоксилином и эозином.

Во всех изученных образцах тканей гистологически достоверно определялось диффузное неспецифическое иммунное гранулематозное воспаление с образованием неказеозных гранулем, схожее с саркоидозом. При микроскопии кожи контрольных животных обнаружены пролиферативные воспалительные изменения и повышение количества различных воспалительных клеток с

образованием единичных гигантских клеток в месте сенсibilизации. Помимо клеток лимфоидного и моноцитарно-макрофагального ряда, клеточная популяция была представлена единичными плазмочитами и эозинофилами, а также клетками рыхлой волокнистой соединительной ткани и ассоциированными с ней сосудами микроциркуляторного русла (Рисунок. 3.1).

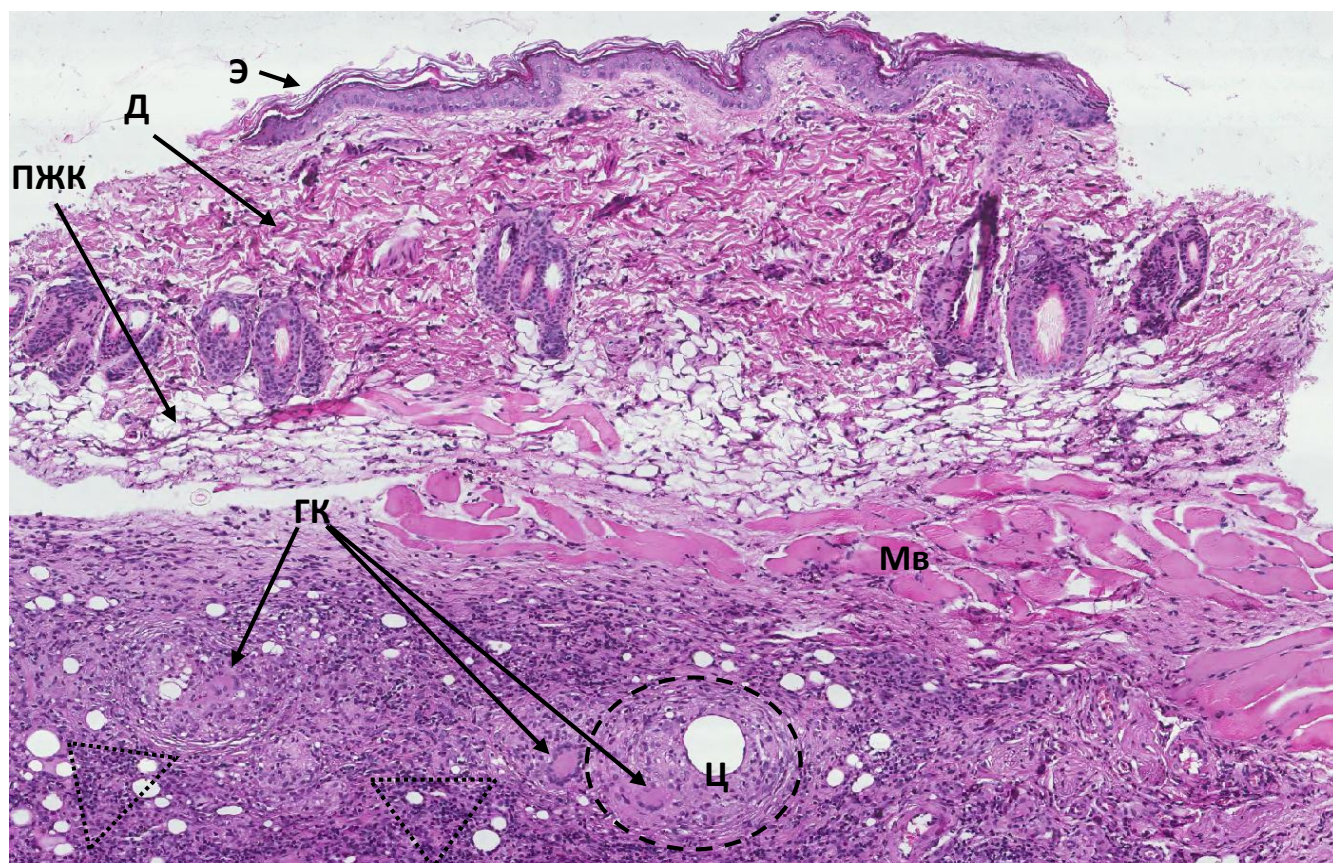


Рисунок 3.1 – Подкожная иммунная гранулема контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х100.

Примечание: пунктирная область – иммунная гранулема, пунктирная треугольная область – лимфоцитарная инфильтрация, Э – эпидерма, Д – дерма, ПЖК – подкожно-жировая клетчатка, ГК – гигантская клетка, Мв – мышечные волокна

В качестве отличительных черт гранулематозного инфильтрата на светооптическом уровне исследования при малом увеличении следует отметить следующие особенности. Во-первых, при рутинном гистологическом

исследовании препаратов окрашенных стандартным методом (гематоксилин и эозин), у животных выявлялись фрагменты фиброзно-жировой ткани и пучки поперечнополосатой мышечной ткани, содержащие множественные липидные вакуоли различного диаметра. Часть вакуолей формировала крупные кистозные полости без эпителиальной выстилки (псевдокисты). Строма и стенки псевдокист обильно инфильтрированы лимфоцитами, эпителиоидными клетками, макрофагами, единичными нейтрофильными гранулоцитами и эозинофилами (Рисунок 3.2).



Рисунок 3.2 – Патологический инфильтрат контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. x100.

Примечание: пунктирная область – гранулематозный инфильтрат, П – псевдокиста, М – мышечная ткань

Во-вторых, часть гранулематозного инфильтрата представляла собой множественные иммунные гранулемы, содержащие центральную липидную вакуоль (по типу кольцевидной гранулемы), окруженную клеточным валом, состоящим из макрофагов, эпителиоидных клеток, лимфоцитов, единичных

фибробластов, эозинофилов и гигантских клеток. Кроме того, в тканях определялся диффузный слабовыраженный фиброз и явления интерстициального отека, особенно на периферии гранулематозного воспаления (Рисунок 3.3).

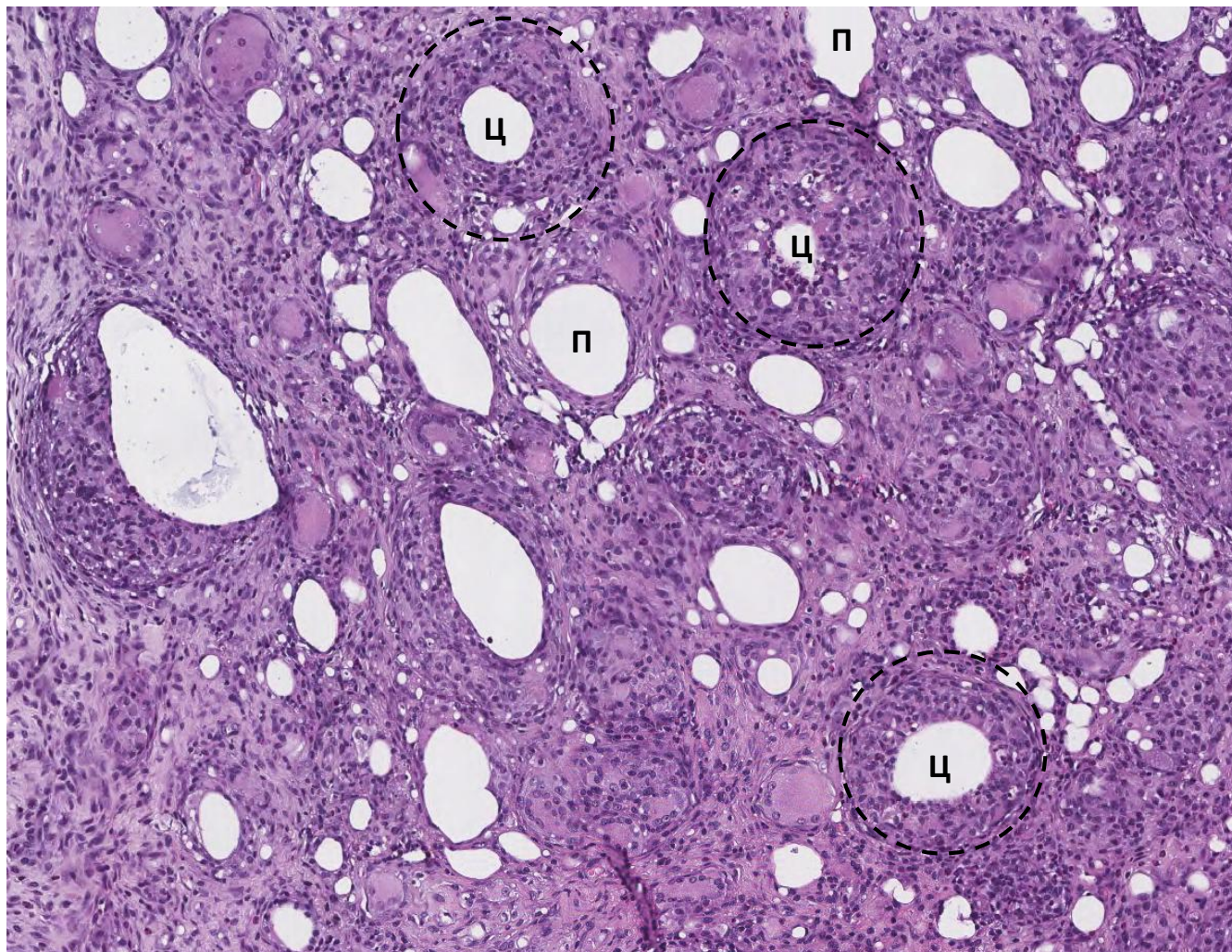


Рисунок 3.3 – Гранулематозный инфильтрат контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. x200.

Примечание: Ц – центральная липидная вакуоль, П – псевдокиста, пунктирная область – «кольцевидные» гранулемы

В-третьих, в строме определялось диффузное гранулематозное воспаление с множественными неказеозными иммунными гранулемами, находящимися на разных стадиях созревания. Иммунную гранулему можно считать структурно-функциональной единицей иммунного гранулематозного воспаления, поскольку она имеет свою особую структуру и выполняет специфические функции. Внешне

иммунная гранулёма представляет узелок размером в среднем 150–300 мкм. Ее условно можно разделить две области: центральную и перифокальную (периферическую).

Области иммунной гранулемы обозначены на Рисунке 3.4.

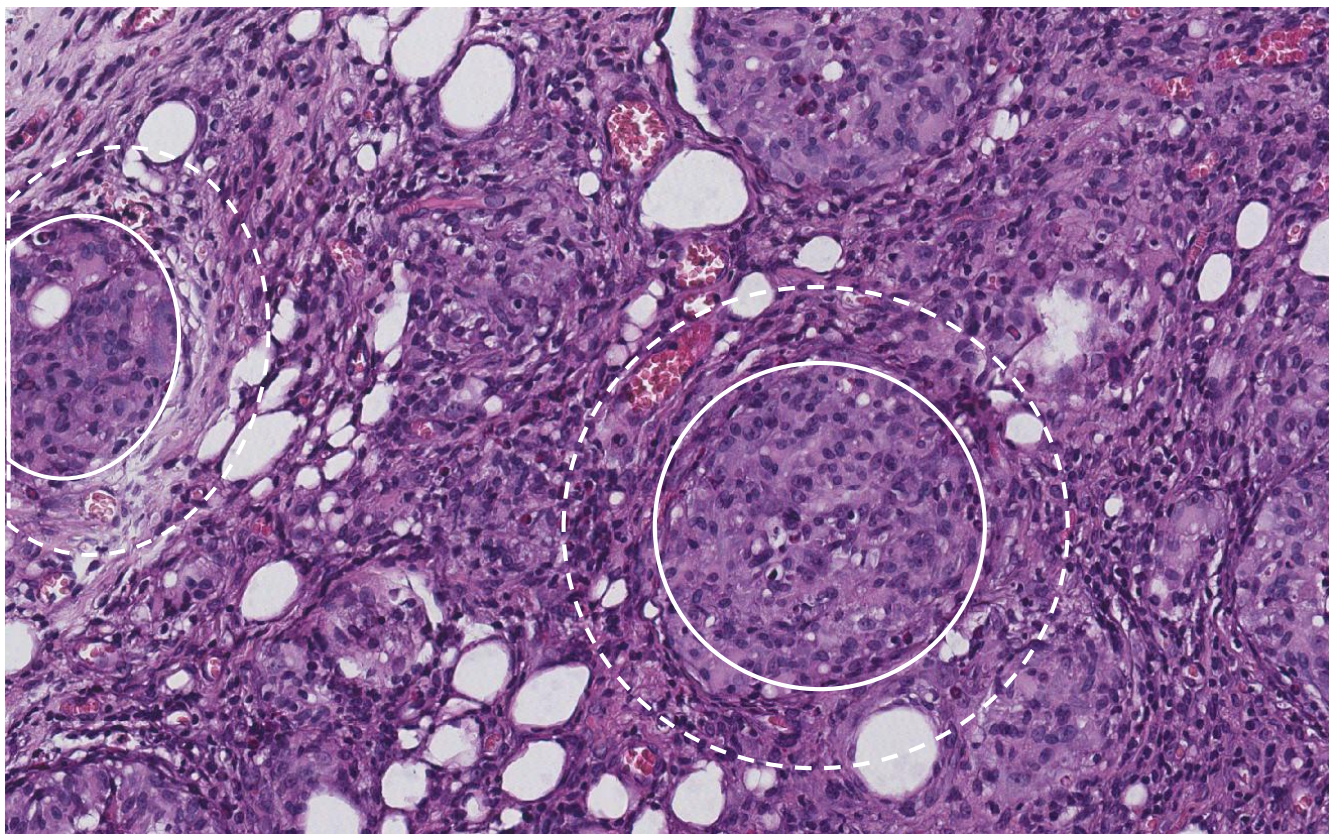


Рисунок 3.4 – Диффузный гранулематозный инфильтрат контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. x400.

Примечание: пунктирная округлая область – перифокальная область незрелой иммунной гранулемы, непрерывная округлая область – центральная область незрелой иммунной гранулемы

В центральной области гранулемы видны макрофаги, имеющие неправильную форму с центрально расположенным округлым (эллипсовидным) ядром, эпителиоидные клетки со слабо-эозинофильной цитоплазмой и центрально расположенным ядром (овоидной или удлинённой формы), менее плотными, чем у лимфоцита. Также видны единичные гигантские клетки по типу Пирогова-Лангханса и одиночные эозинофилы (Рисунок 3.5).

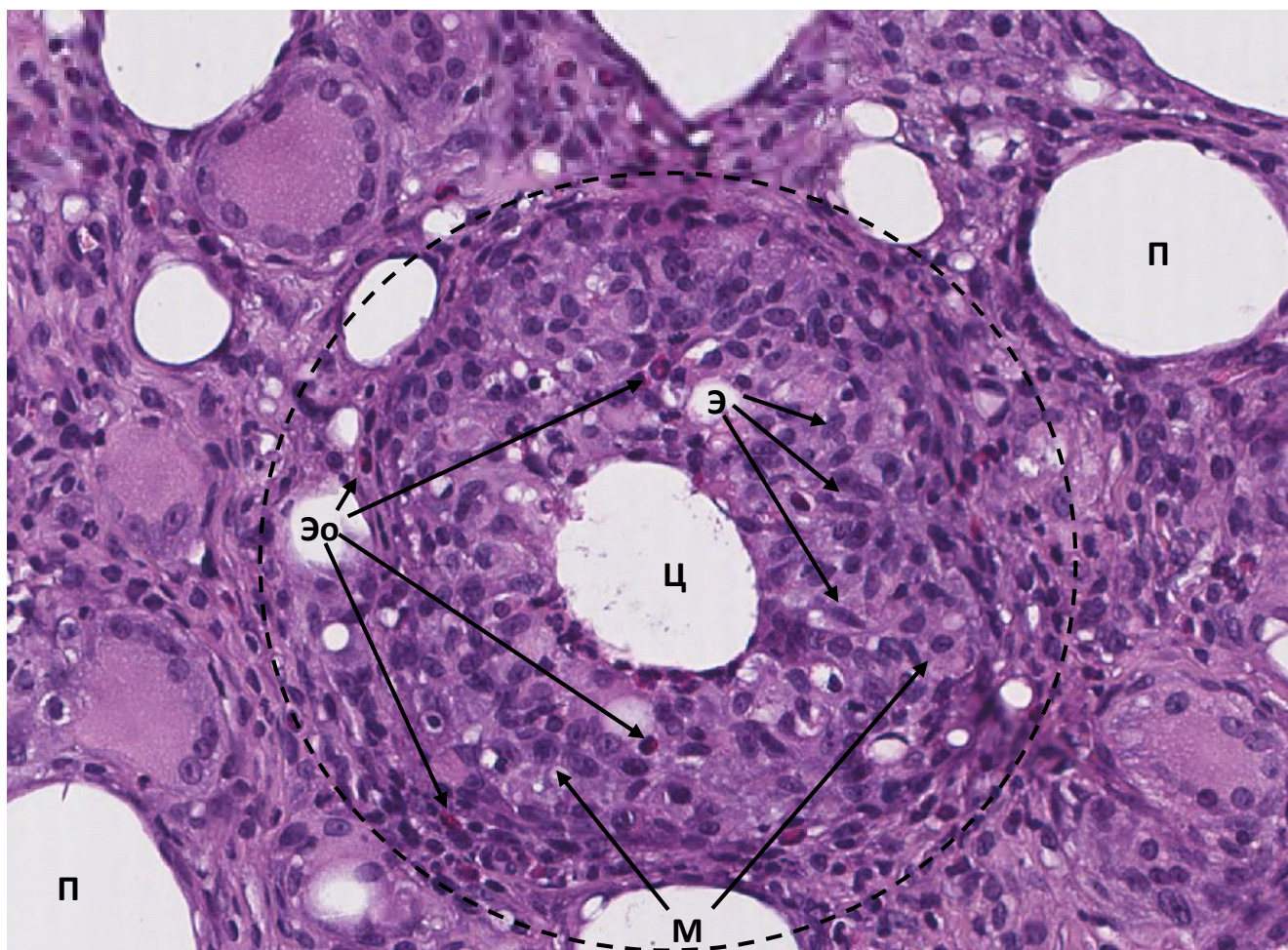


Рисунок 3.5 – Иммунная гранулема контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х600.

Примечание: Ц – центральная липидная вакуоль, П – псевдокиста, пунктирная область – центральная область иммунной гранулемы, М – макрофаг, Эо – эозинофилы, Э – эпителиоидная клетка

В непосредственной близости от иммунных гранул, на их периферии, клеточная популяция была представлена, в основном, лимфоцитами с характерными гистологическими признаками, такими как крупное, округлое, резко-базофильное ядро и малое количество оксифильной цитоплазмы, расположенной вокруг ядра в виде узкой полоски. Следует отметить, что на светооптическом уровне исследования дифференцировку различных популяций иммунокомпетентных клеток провести невозможно. Кроме лимфоцитов,

центральные области гранулем окружены фибробластами, единичными эозинофилами и плазмócитами (Рисунок 3.6).

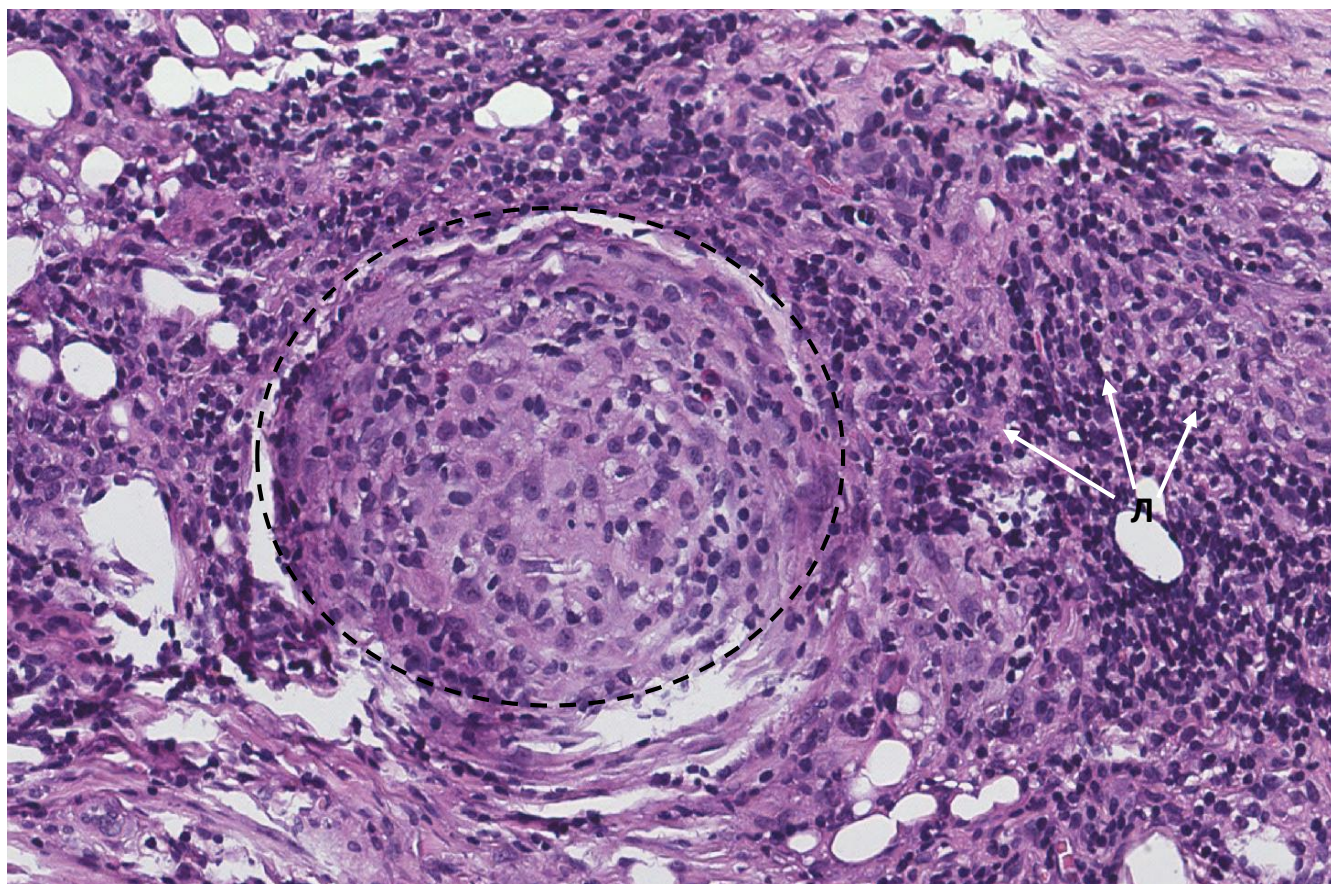


Рисунок 3.6 – Перифокальная область иммунной гранулемы контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х800.

Примечание: пунктирная область – область незрелой иммунной гранулемы, Л – лимфоциты

Кроме того, между иммунными гранулемами можно также выделить межгранулемную область, в которой располагаются различные иммунные клетки, но с визуально меньшим количеством клеток лимфоидного и макрофагального ряда. В частности, в данной области можно обнаружить антиген-представляющие клетки, лимфоциты и плазмócиты, а также компоненты соединительной (фибробласты и фиброциты, тучные клетки, ретикулярные и коллагеновые волокна, сосуды микроциркуляторного русла), нервной ткани (нервные волокна и

нервные ганглии вегетативной нервной системы) и, реже, мышечной ткани (Рисунок 3.7).

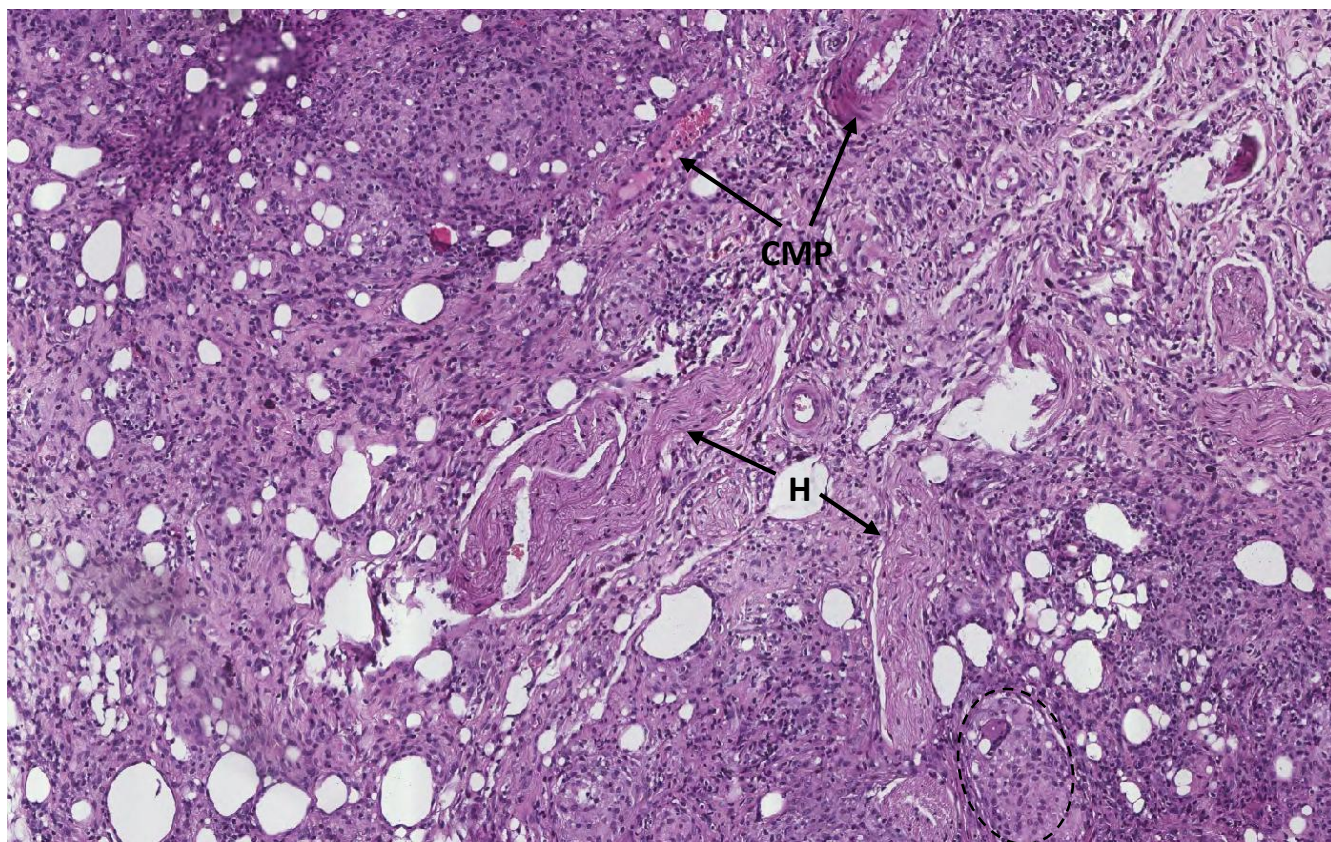


Рисунок 3.7 – Диффузный гранулематозный инфильтрат контрольной крысы. Межгранулемная область. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х600.

Примечание: пунктирная область – незрелая иммунная гранулема, СМР – сосуды микроциркуляторного русла, Н – периферические нервы

Наконец, еще одной кардинальной особенностью диффузного гранулематозного инфильтрата крыс без коррекции являлось преобладание незрелых иммунных гранул. Незрелые иммунные гранулемы визуально имели небольшой диаметр (150–250 мкм) и характеризовались наличием отдельно расположенных и не слившихся гистиоцитов и эпителиоидных клеток, а также отсутствием или минимальным формированием фиброзной капсулы по периферии иммунной гранулемы (Рисунок 3.8).

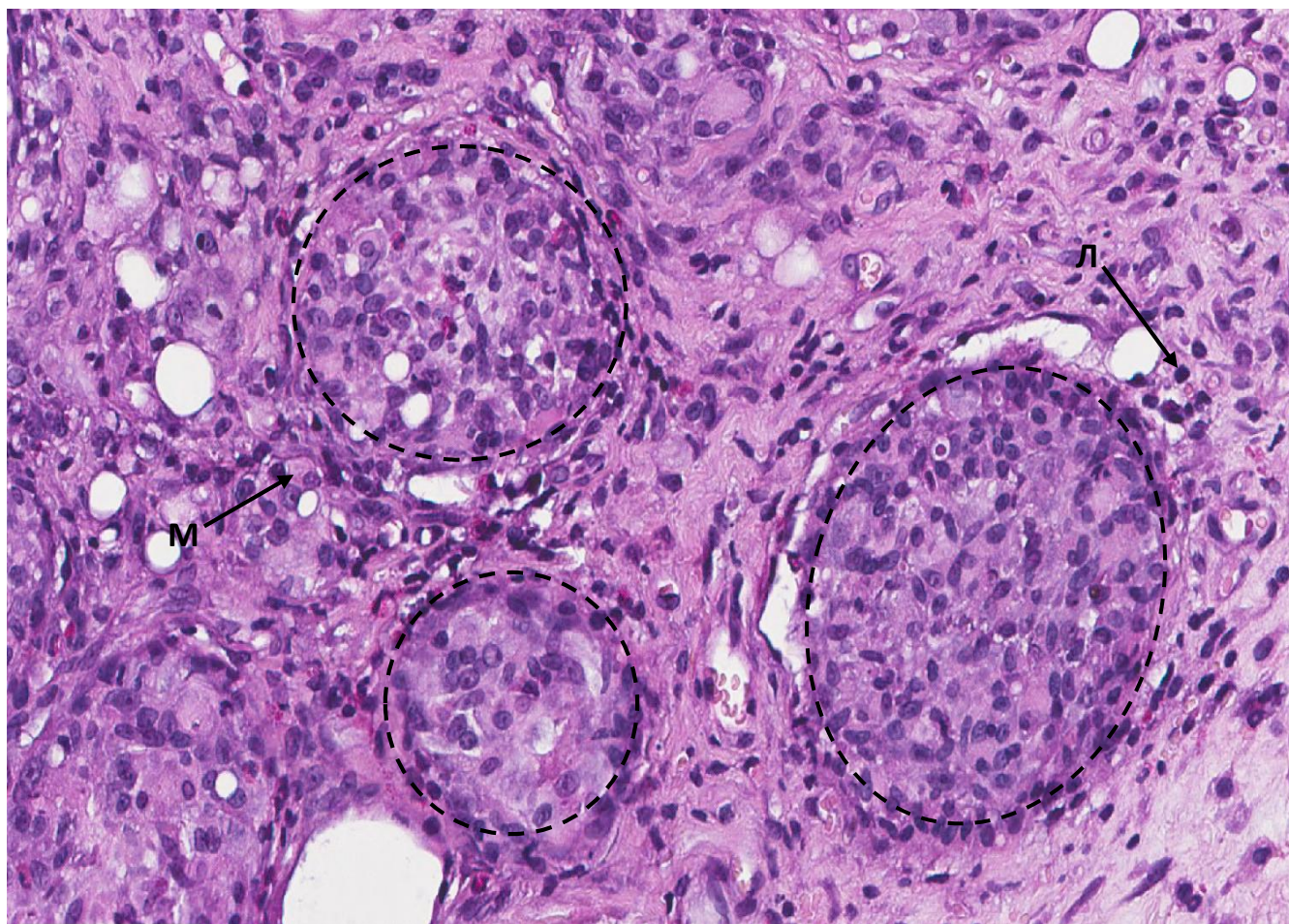


Рисунок 3.8 – Диффузный гранулематозный инфильтрат контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х600.

Примечание: пунктирная область – незрелая иммунная гранулема, Л – единичные лимфоциты, М – макрофагальная клетка

В частности, незрелые иммунные гранулемы характеризовались наличием единичных гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса, которые имели широкую эозинофильной цитоплазму и множество овальных, хаотично расположенных ядер, которые лежат частоколом у клеточной мембраны. Количество ядер в этих клетках варьировалось от 20 до 100. Следует отметить, что ядра большинства гигантских клеток располагались, в основном, по периферии клетки. Большинство гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса характеризовались преимущественно межгранулемным расположением (Рисунок 3.9).

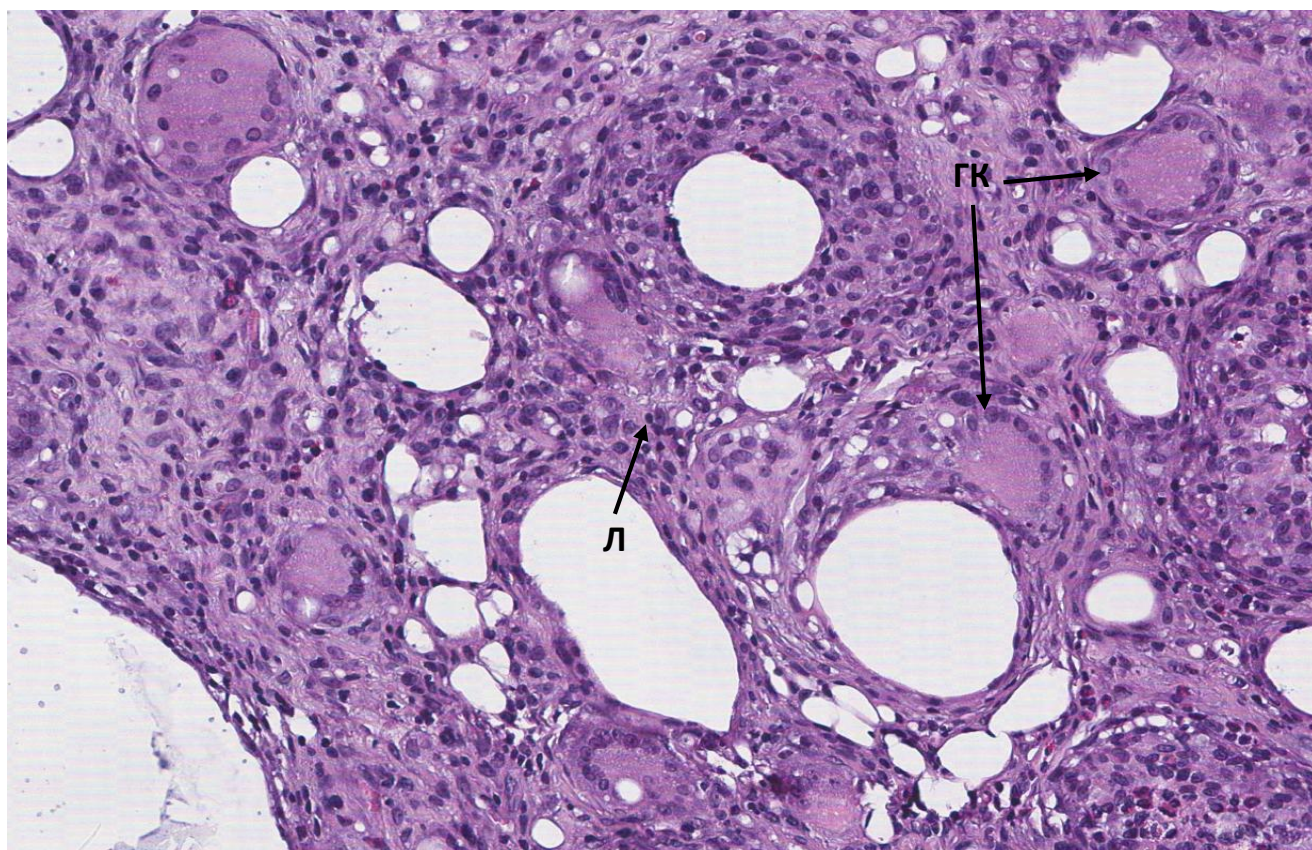


Рисунок 3.9 – Диффузный гранулематозный инфильтрат контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. x400.

Примечание: ГК – гигантская клетка по типу Пирогова-Лангханса, Л – лимфоцит

На некоторых препаратах обнаружили клетки на различных стадиях митотического деления, а также единичные клетки в состоянии дистрофии. В частности, выявлялись единичные клетки с ацидофильной цитоплазмой, находящихся в состоянии запрограммированной клеточной гибели (апоптоза). Часть этих клеток, в виде апоптотических телец, находилась в цитоплазме активных макрофагов. Одновременно регистрировали небольшое количество сосудов микроциркуляции, выстланных эндотелиоцитами, сохранявших свою функциональную активность. В очаге воспаления зачастую наблюдались периваскулярные скопления лимфоцитов и плазмоцитов (Рисунок 3.10).

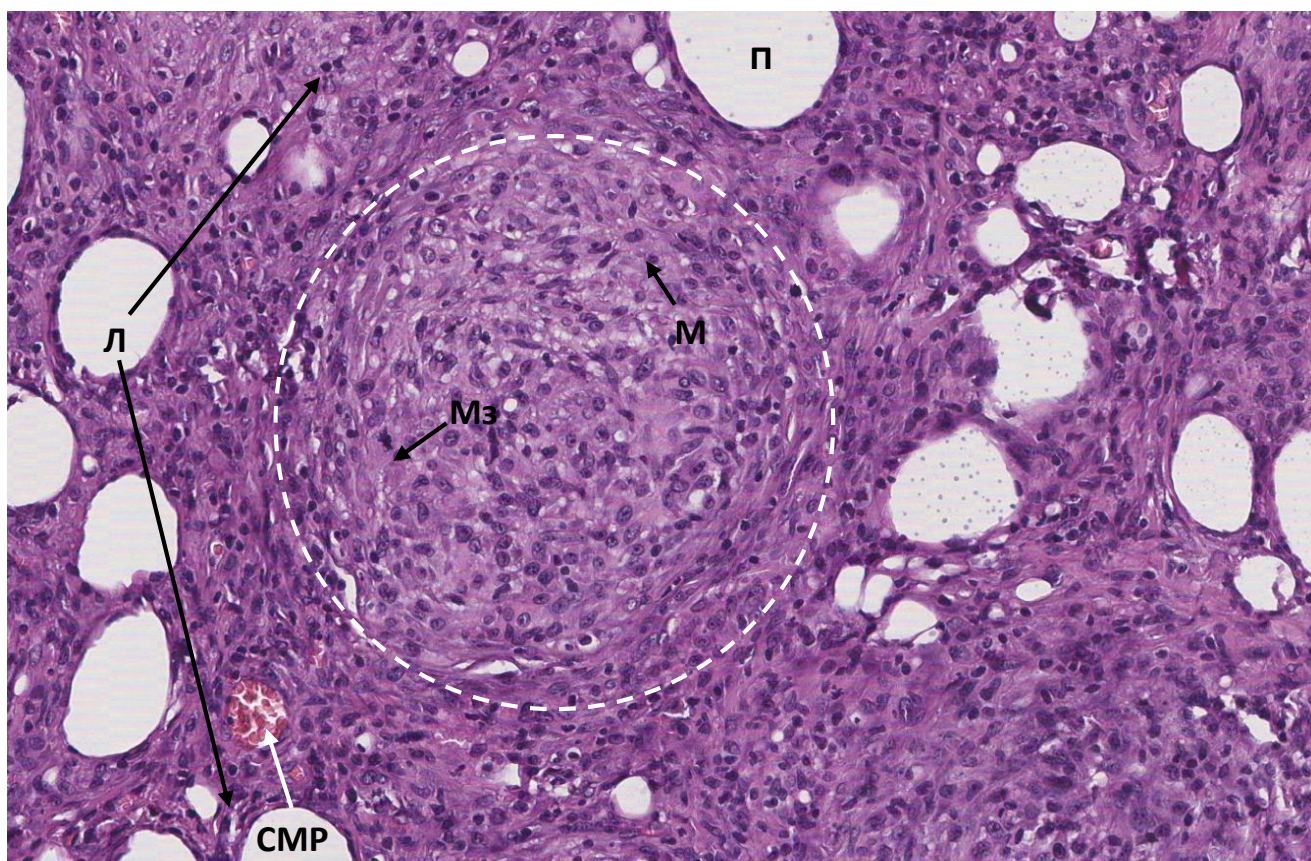


Рисунок 3.10 – Иммунная гранулема контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х400.

Примечание: пунктирная округлая область – незрелая иммунная гранулема, П – псевдокиста, Л – лимфоциты, Мз – клетка в стадии митоза, М – макрофаг, СМР – сосуд микроциркуляторного русла

3.2. Структурно-функциональные особенности гранулематозного инфильтрата экспериментальных крыс

У экспериментальных животных получавших парикальцитол в дозе 200 нг/животное с кратностью 1 раз в 3 дня, в мягких тканях выделялся инфильтрат, имеющий плотную консистенцию и располагающийся подкожно в области задней поверхности шеи на уровне шейно-грудного отдела позвоночника (Рисунок 3.11).

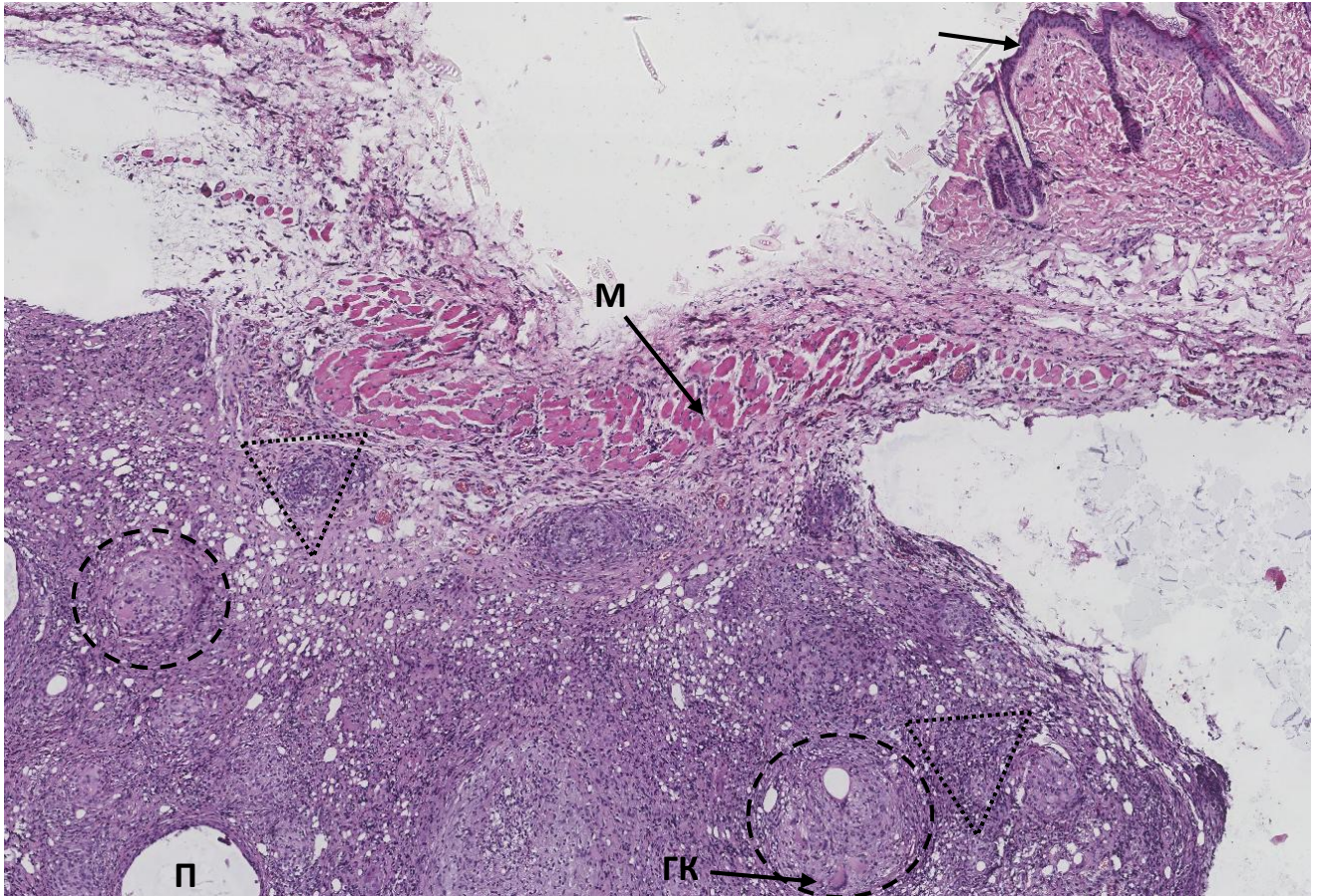


Рисунок 3.11 – Подкожная иммунная гранулема экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. x100.

Примечание: пунктирная округлая область – иммунная гранулема, пунктирная треугольная область – лимфоцитарная инфильтрация, Э – эпидермис, П – псевдокиста, ГК – гигантская клетка, М – мышечные волокна

Среди особенностей, выявленных у экспериментальных животных первой группы на светооптическом уровне исследования, следует отметить несколько характерных признаков. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдалось увеличение числа иммунокомпетентных клеток, преимущественно лимфоцитов, которые локализовались в основном за пределами иммунной гранулемы, в непосредственной близости от фиброзного кольца. Подавляющее большинство этих клеток представляли собой малые и средние лимфоциты, диаметр ядер которых составлял от 6 до 15 мкм. На фоне

визуального увеличения количества периферических лимфоцитов наблюдалось снижение числа эозинофилов или их полное отсутствие (Рисунок 3.12).

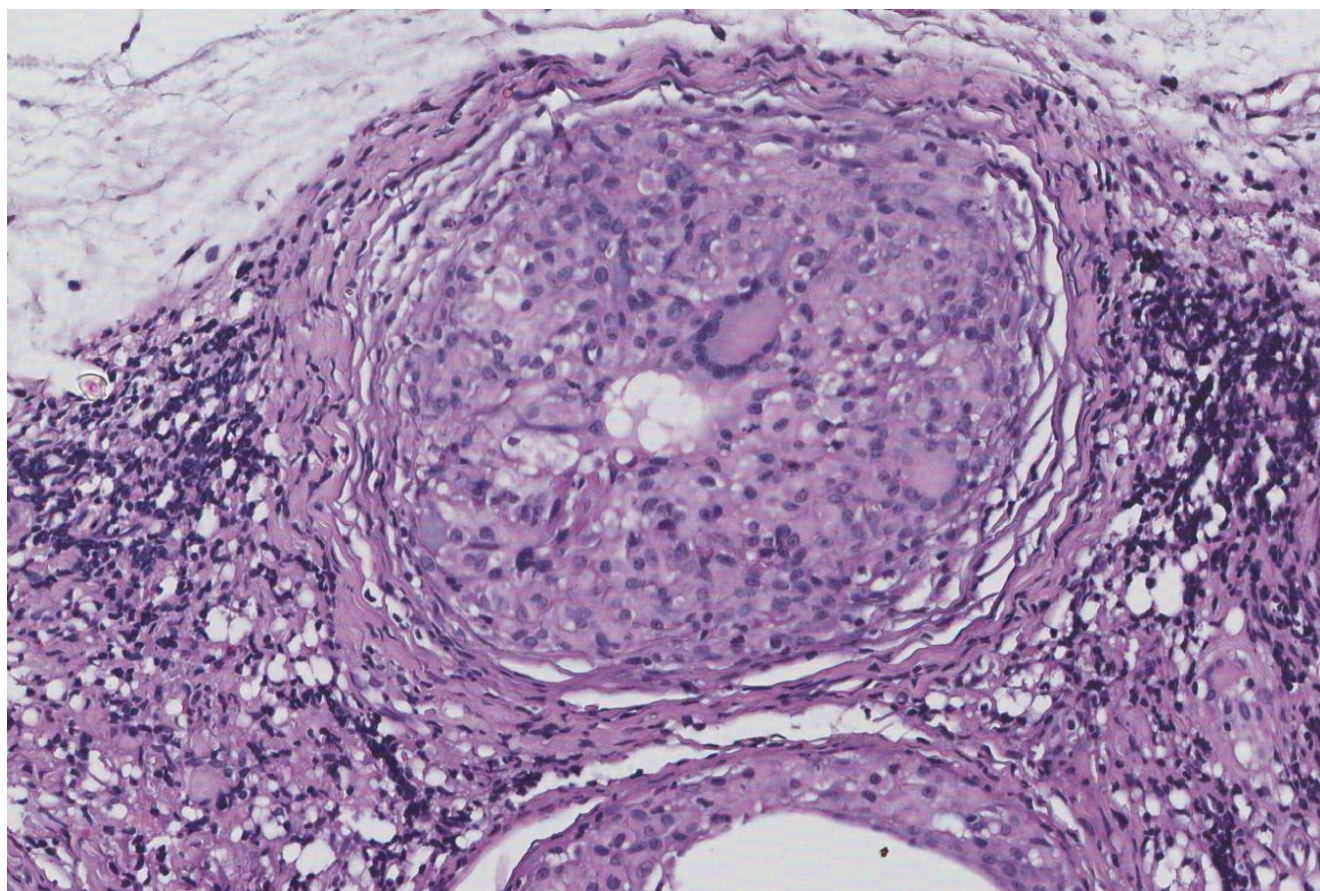


Рисунок 3.12 – Иммунная гранулема экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х400.

Примечание: выраженная лимфоцитарная инфильтрация в перифокальной области иммунной гранулемы

На светооптическом уровне иммунная гранулема, как экспериментальной первой группы, так и контрольных животных, состояла из лимфоцитов, гистиоцитов и эпителиоидных клеток. Также были обнаружены гигантские клетки по типу Пирогова-Лангханса, возникшие в результате слияния цитоплазматических мембран эпителиоидных клеток. При этом у экспериментальной группы гигантские клетки локализовались преимущественно в центральной области гранулемы, а у контрольных – на периферии или вне неё. Кроме того, выявлялись единичные клетки в состоянии апоптоза (Рисунок 3.13).

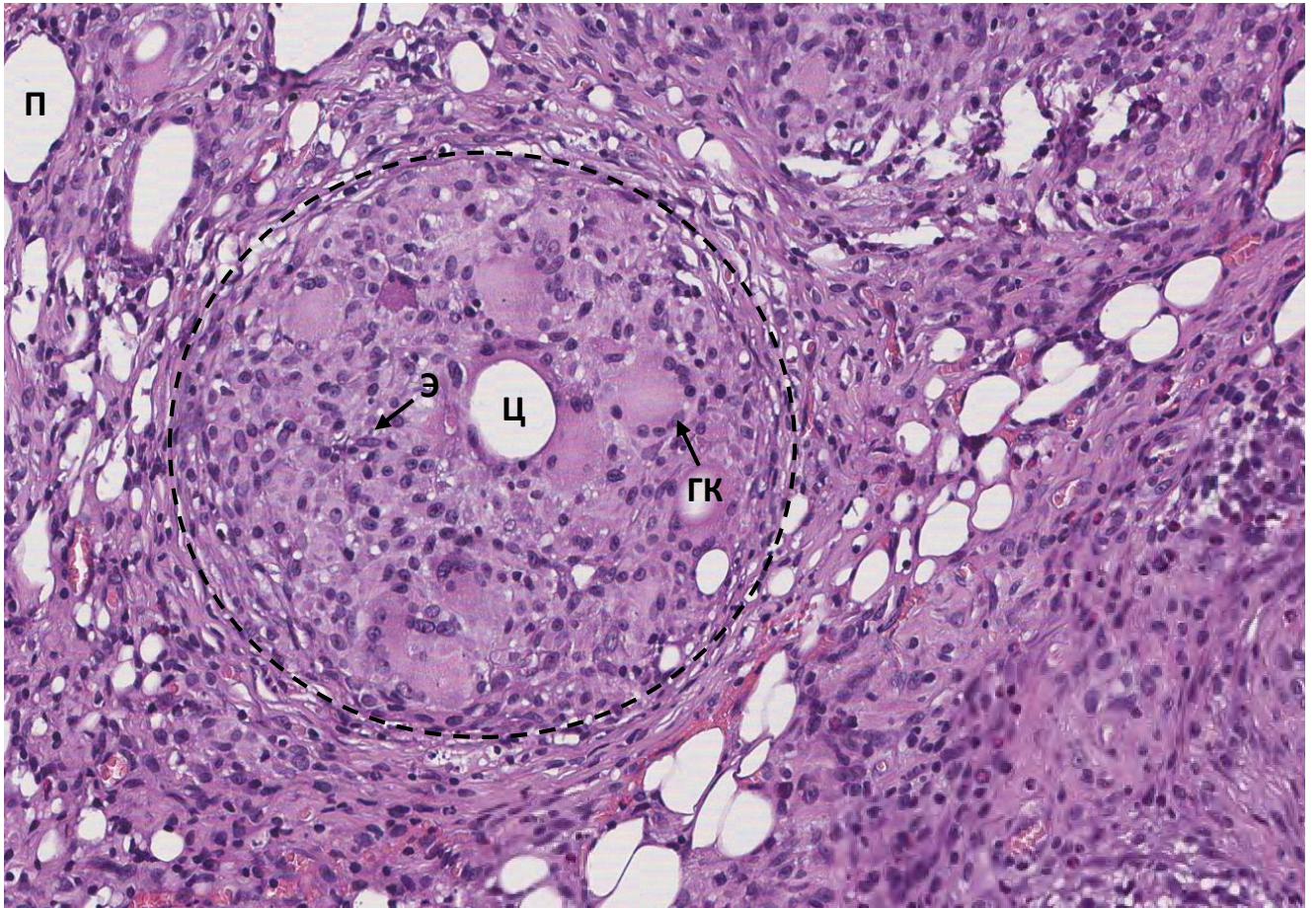


Рисунок 3.13 – Иммунная гранулема экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х400.

Примечание: пунктирная округлая область – иммунная гранулема, Ц – центральная липидная вакуоль, П – псевдокиста, ГК – гигантская клетка, Э – эпителиоидная клетка

Наконец, у крыс ЭГ 1 при гистологическом исследовании гранулематозного инфильтрата визуально отмечалось увеличение количества и диаметра зрелых гранулём по сравнению с КГ. В среднем диаметр зрелых гранулём составлял 280–300 мкм. Увеличение диаметра зрелых гранулём обусловлено изменением клеточной популяции, преимущественно за счет увеличения количества гигантских клеток в центральной области гранулемы, а также за счет увеличения толщины фиброзного кольца, окружающего гранулему, образованного клеточным валом из фибробластов и коллагеновых волокон, по сравнению с КГ (Рисунок 3.14).

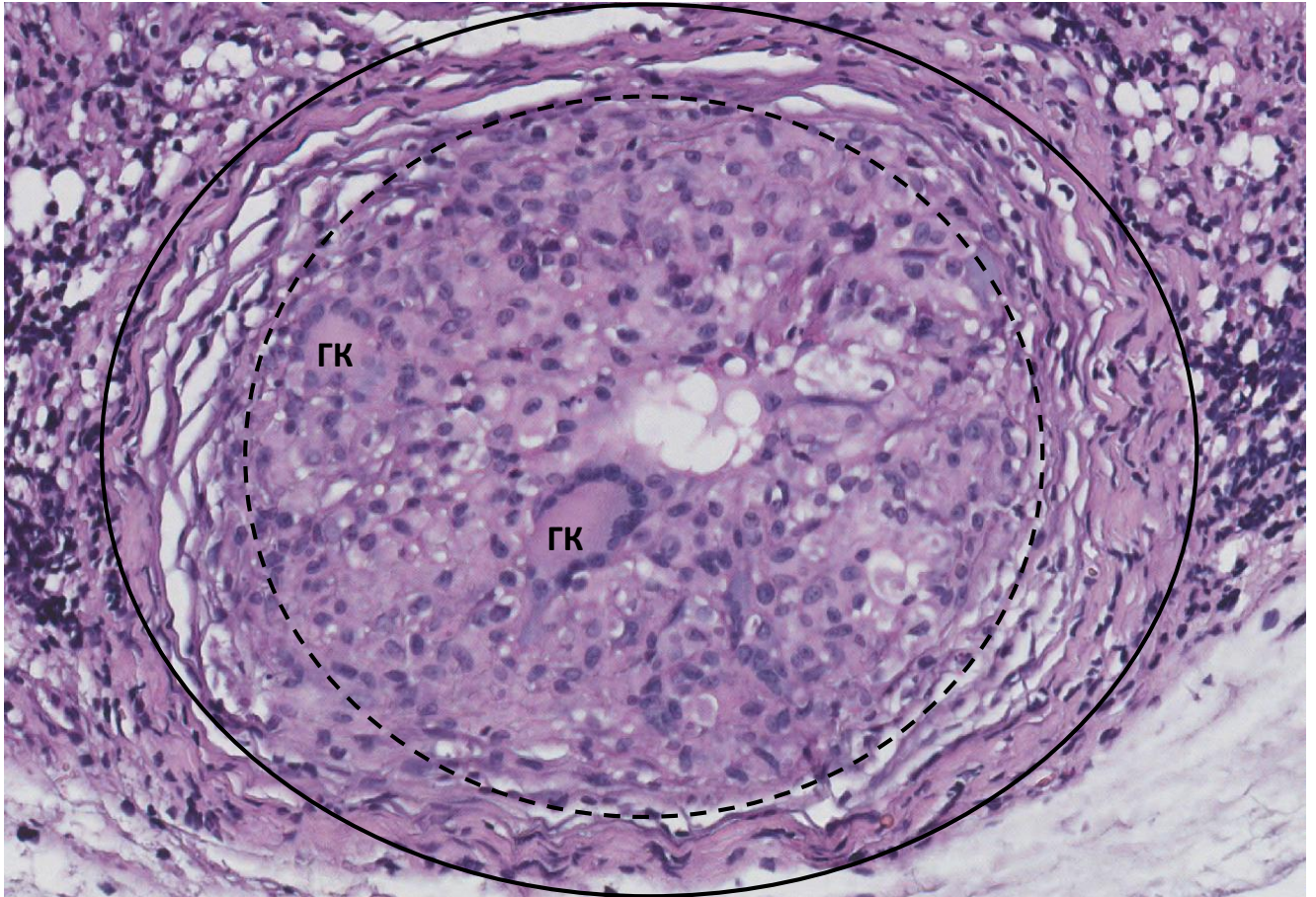


Рисунок 3.14 – Иммунная гранулема экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х500.

Примечание: пунктирная округлая область – иммунная гранулема, сплошная округлая область – фиброзное кольцо, Ц – центральная липидная вакуоль, ГК – гигантская клетка

На светооптическом уровне, при большем увеличении в гистологических препаратах инфильтрата экспериментальных групп, также выявлялась воспалительная инфильтрация подлежащих тканей, в результате вовлечения скелетной мускулатуры в патологический процесс. В эндомизии, между пучками поперечнополосатой мышечной ткани, отмечалась инфильтрация, клеточный состав которой характеризовался наличием типичных клеточных субпопуляций: лимфоцитов, гистиоцитов, гигантских клеток, плазмоцитов, эозинофилов, единичных клеток в состоянии митотического деления (Рисунок 3.15).

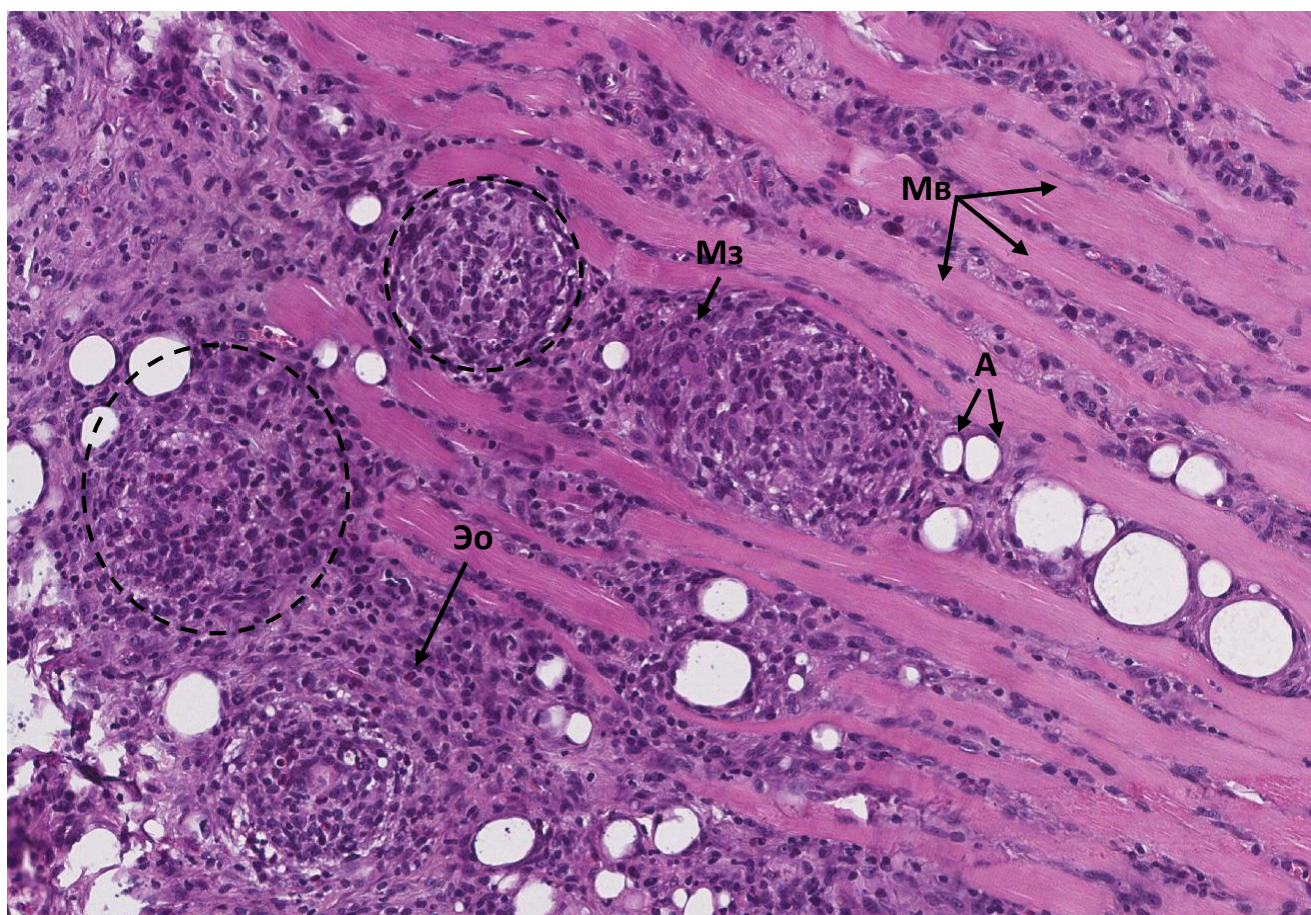


Рисунок 3.15 – Воспалительная инфильтрация в мышечной ткани экспериментальной крысы первой группы. Гематоксилин и эозин. Ув. х300.

Примечание: пунктирная округлая область – воспалительная клеточная инфильтрация, Мв – мышечные волокна, А – адипоцит, Эо – эозинофил, Мз – митоз

Аналогичную гистологическую картину наблюдали в отношении экспериментальных животных второй и третьей группы. При микроскопическом исследовании экспериментальных образцов обнаружили диффузные, пролиферативные воспалительные изменения и визуальное увеличение количества различных иммунокомпетентных клеток с образованием гигантских клеток в месте сенсibilизации SOD А. В частности, выявили морфологические саркоидоз-подобные изменения, обусловленные наличием клеток лимфоидного и макрофагального ряда, многоядерных гигантских клеток по типу Пирогова–Лангханса, входящих в состав неказеозного гранулематозного воспаления, а также лимфаденопатию при макроскопическом исследовании (Рисунок 3.16).

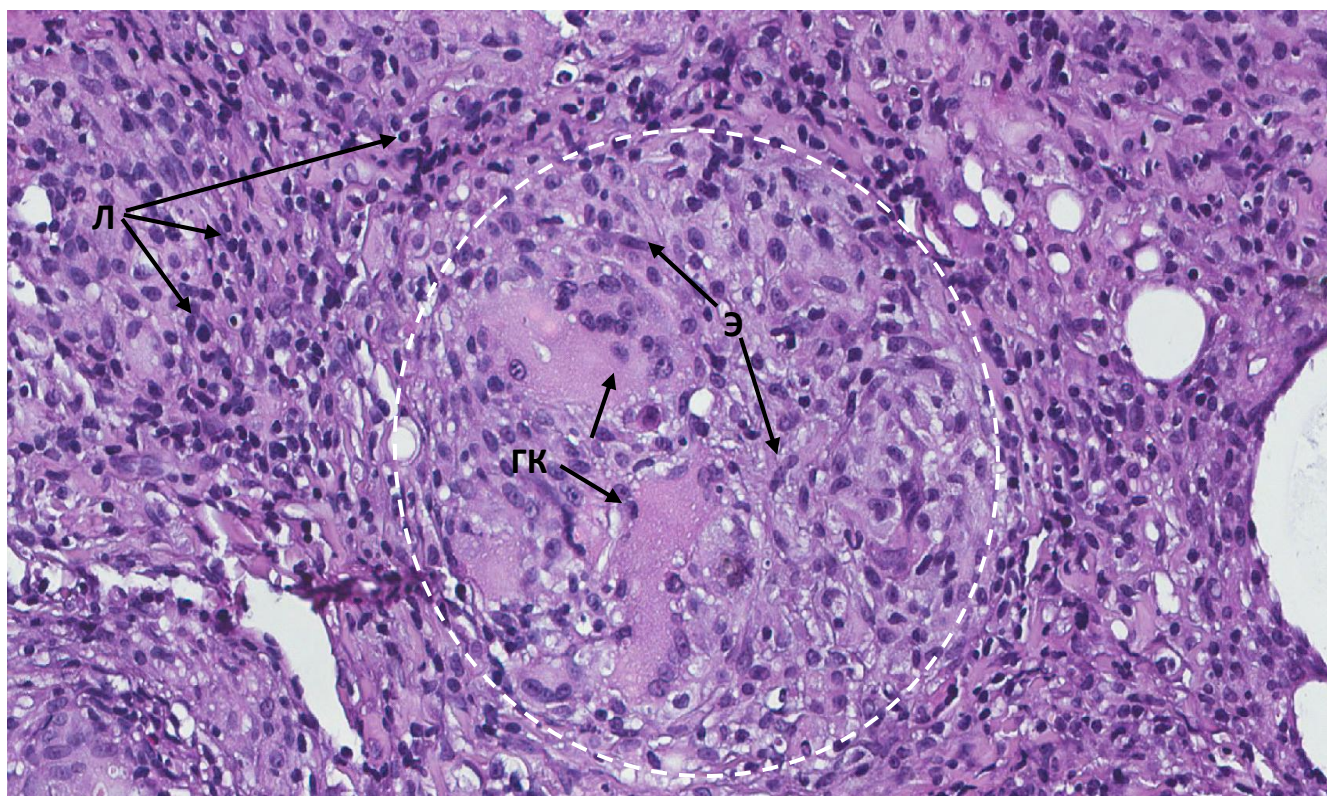


Рисунок 3.16 – Прролиферативная воспалительная инфильтрация стромы мягких тканей экспериментальной крысы второй группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х300.

Примечание: пунктирная округлая область – «зрелая» иммунная гранулема, Э – эпителиоидная клетка, ГК – гигантская клетка, Л – лимфоцит

Отдельно необходимо более подробно описать состояние сосудов микроциркуляторного русла экспериментальных крыс. Как уже отмечалось, в месте сенсibilизации, где определялась диффузная гранулематозная инфильтрация тканей, наблюдалось выраженное расширение и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла. Нередко обнаруживалось нарушение целостности и/или резкое увеличение проницаемости капилляров с выходом форменных элементов крови в периваскулярное пространство.

В периваскулярной интерстициальной ткани наблюдались диффузные скопления лимфоцитов, а также единичные эозинофилы, плазмоциты и тучные клетки. В области диффузного гранулематозного инфильтрата выявлено разрастание соединительнотканного компонента, преимущественно вокруг зрелых

иммунных гранулем, что способствовало ограничению иммунного воспаления от здоровых и неповрежденных тканей.

Такие изменения могут указывать на то, что парикальцитол влияет не только на лимфоидные и макрофагальные иммунные клетки, но и на структурно-функциональную организацию стромально-сосудистого компонента, приводя к вторичным изменениям, связанным с гиперемией сосудов, повышением местного метаболизма и репаративных процессов (Рисунок 3.17).

У контрольных крыс стромально-сосудистый компонент на фоне диффузного гранулематозного воспаления сохранял целостность, за исключением незначительного остаточного расширения сосудов микроциркуляторного русла и умеренного кровенаполнения. Ни признаков повреждения стенок сосудов, ни диапедезных кровоизлияний в строме тканей не наблюдалось.

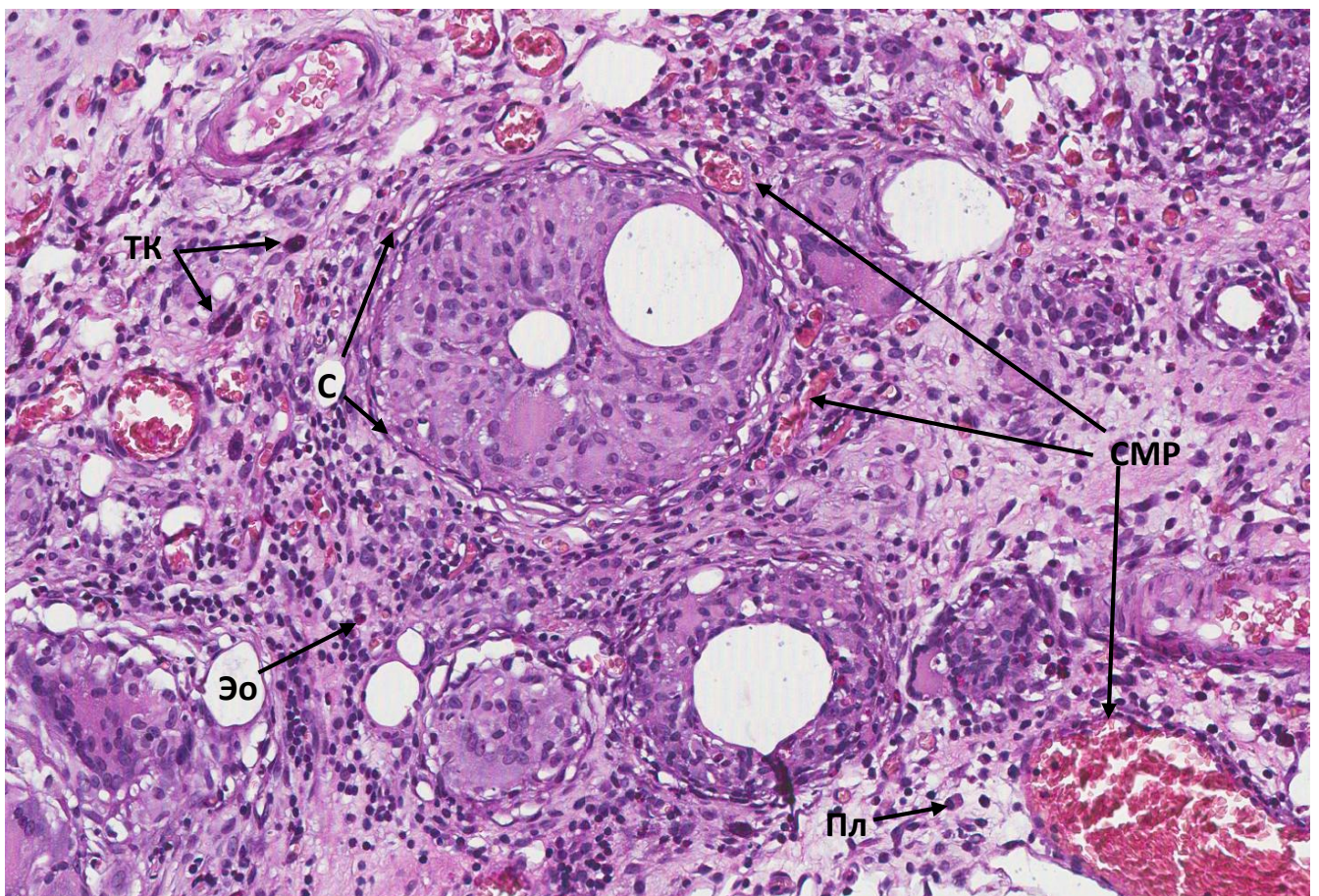


Рисунок 3.17 – Прролиферативная воспалительная инфильтрация стромы мягких тканей экспериментальной крысы второй группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. х400.

Примечание: С – разрастание соединительной ткани вокруг гранулёмы, ТК – тучная клетка, Эо – эозинофил, Пл – плазматическая клетка, СМР – расширенные и гиперемированные сосуды микроциркуляторного русла

На светооптическом уровне гистологическая организация иммунной гранулемы крыс третьей экспериментальной группы, которым парентерально вводили парикальцитол, соответствовала контролю. При гистологическом исследовании гематоксилин и эозином окрашенных препаратов у животных этой группы выявлялся неспецифический гранулематозный инфильтрат, состоящий преимущественно из незрелых гранул с нечетко очерченными границами, характеризующихся наличием отдельно лежащих макрофагов и отсутствием или минимальным формированием гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса. Кроме того, на фоне воспалительного инфильтрата отмечалось снижение числа зрелых гранул с преобладанием незрелых гранул по сравнению с ЭГ 1 и ЭГ 2. В среднем диаметр незрелых иммунных гранул составлял 160–170 мкм. Уменьшение диаметра незрелых иммунных гранул связано с отсутствием толстой фиброзной капсулы и уменьшением количества воспалительных клеток (макрофагов и гигантских клеток) (Рисунок 3.18).

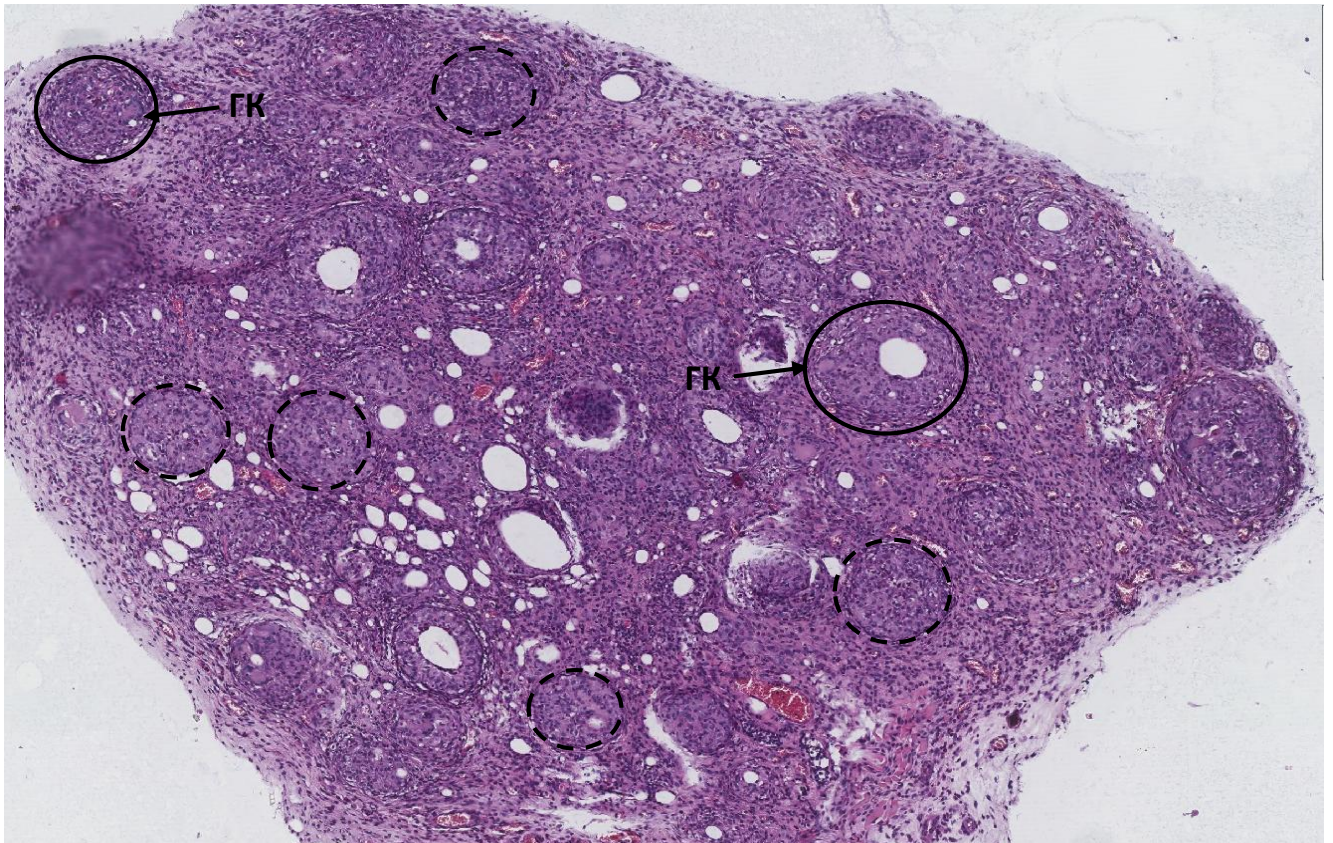


Рисунок 3.18 – Прролиферативная воспалительная инфильтрация стромы мягких тканей экспериментальной крысы третьей группы. 35-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилин и эозин. Ув. x100.

Примечание: пунктирная округлая область – незрелая иммунная гранулема, непрерывная округлая область – зрелая иммунная гранулема, ГК – гигантская клетка

Иммунная гранулема – структурно-функциональная единица иммунного гранулематозного воспаления, которая претерпевает различные структурные изменения в процессе формирования и созревания. Условно выделяют незрелую и зрелую гранулему. Данные статистического анализа созревания гранулем в инфильтрате контрольных и экспериментальных крыс приведены в Таблице 3.1. Следует отметить, что из-за особенностей экспериментальной схемы сравнение количества зрелых и незрелых иммунных гранулем с данными контрольной группы проводилось только на 35-е сутки.

Таблица 3.1 – Количественные показатели иммунной гранулемы в контрольной и экспериментальных группах крыс (М [Q1; Q3] IQR)

Группа	Незрелые гранулемы	Зрелые гранулемы
КГ	9,0 [7,0; 11,0] 4,0	1,0 [0,5; 2,0] 1,5
ЭГ 1	1,0 [0,5; 2,5] 2,0*	4,0 [2,5; 4,5] 2,0*
ЭГ 2	2,0 [1,0; 3,0] 2,0*	3,0 [2,0; 4,5] 2,5*
ЭГ 3	3,0 [1,5; 3,5] 2,0	2,0 [1,0; 3,0] 2,0

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Как видно из таблицы, число незрелых гранул было наибольшим в контрольной группе – 9,0 [7,0; 11,0] и наименьшим в ЭГ 1 – 1,0 [0,5; 2,5]. Статистический анализ показал, что численность незрелых гранул в ЭГ 1 и ЭГ 2 была ниже контроля в 9 и 4,5 раза ($p < 0,001$). На 35-е сутки эксперимента зафиксировано значительное увеличение зрелых гранул: в ЭГ 1 их число составило 4,0 [2,5; 4,5], а в ЭГ 2 – 3,0 [2,0; 4,5], что в 4 и 3 раза превышало показатели контроля ($p < 0,003$). В ЭГ 3 статистически значимых различий по зрелым гранулам с контрольной группой не выявлено ($p = 0,11$).

3.3. Экспрессия рецепторов витамина D в гранулематозном инфильтрате

Во всех изученных образцах тканей, независимо от группы и области, обнаружили множество клеток экспрессирующих рецептор витамина D (Рисунок 3.19).

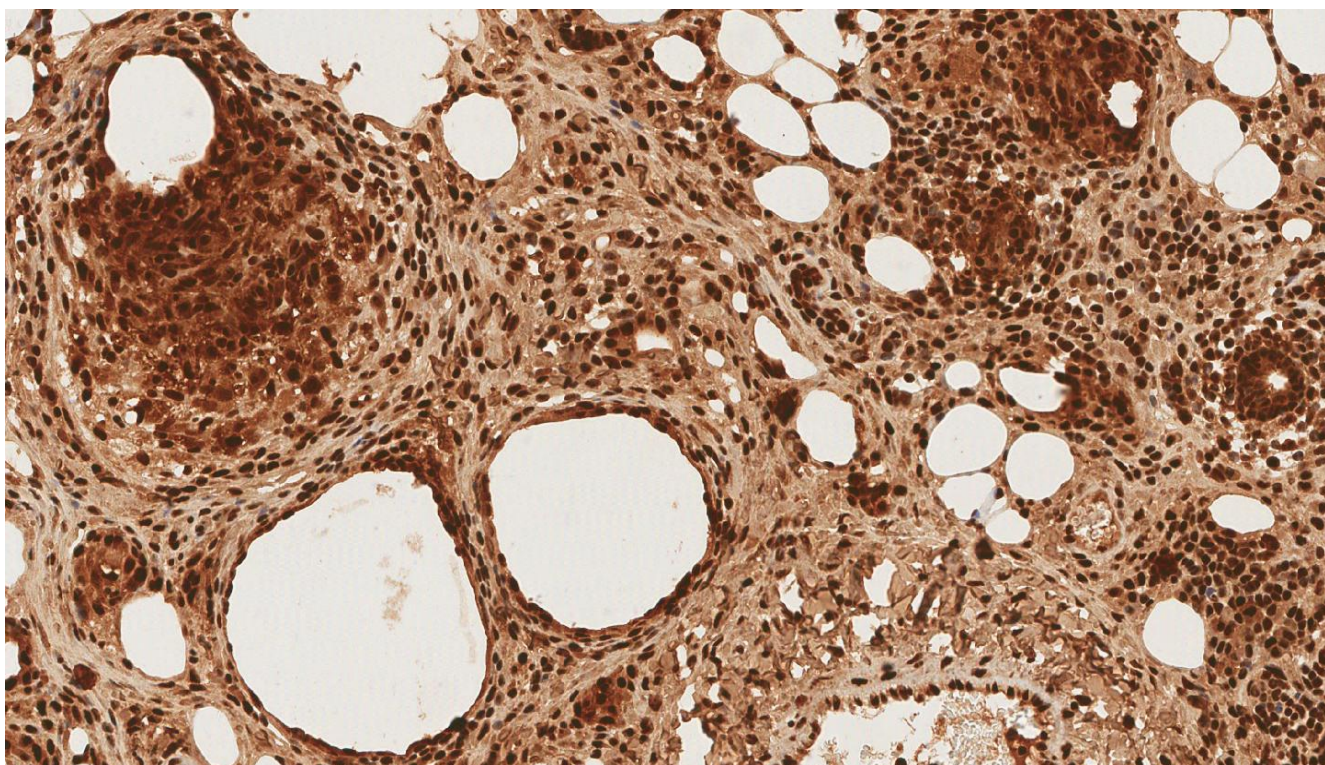


Рисунок 3.19 – Экспрессия VDR в тканях экспериментальной крысы второй группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Экспрессию VDR выявляли как на иммунных, так и на неиммунных клетках. В частности, среди VDR-позитивных иммунных клеток обнаруживали клетки лимфоидного ряда и антиген-представляющие клетки, которые характеризовались высокой степенью характерного коричневого окрашивания ядра и цитоплазмы (Рисунок 3.20).

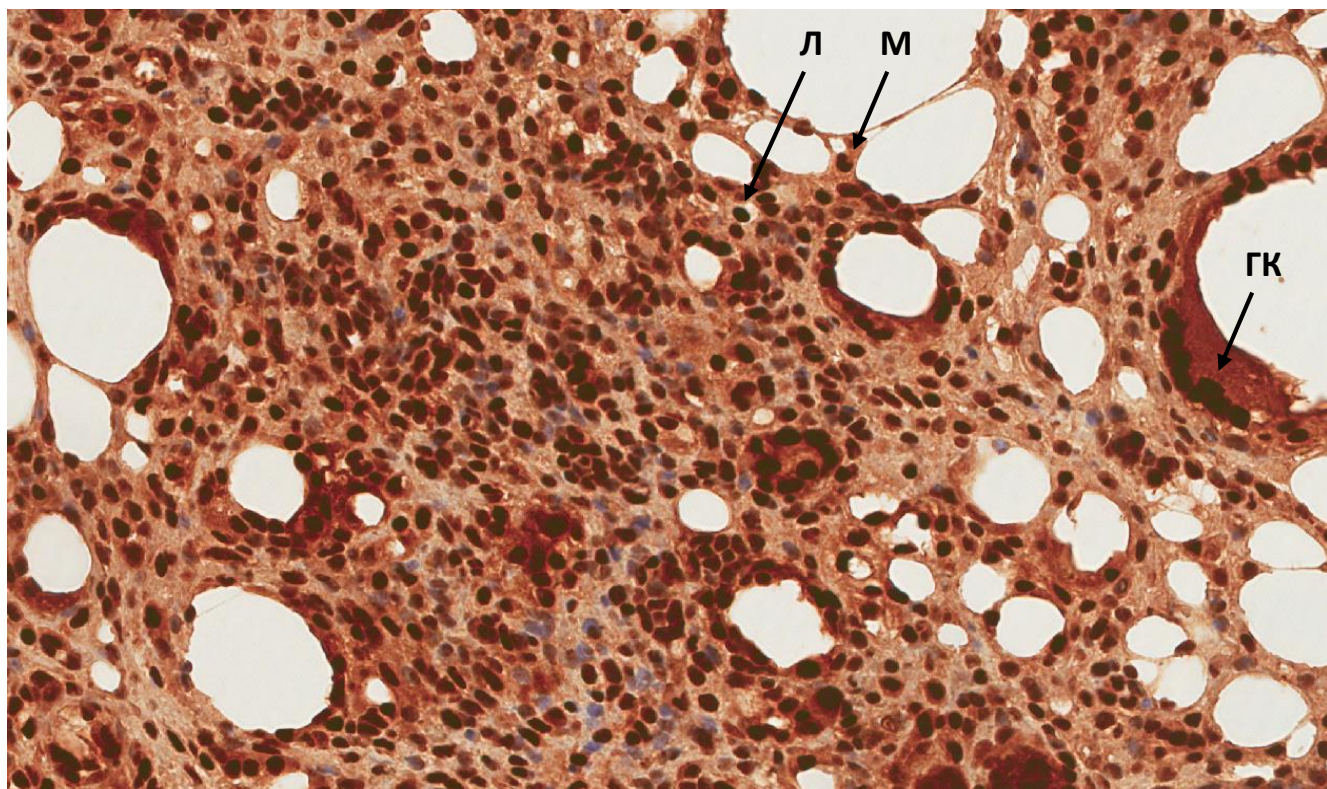


Рисунок 3.20 – Экспрессия VDR в гранулематозном инфильтрате экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х600.

Примечание: Л – лимфоцит, М – макрофаг, ГК – гигантская клетка

Среди клеток, не относящихся к иммунной системе, можно выделить клетки соединительной ткани (фибробласты, адипоциты, эндотелиоциты, плазмоциты), а также клетки мышечной и нервной ткани (Рисунок 3.21). Поскольку парикальцитол является лигандом VDR, он может непосредственно активировать рецептор в этих клетках, что определяет его многостороннее фармакологическое действие. Это свидетельствует о его широком спектре действия, который может модулировать клеточные функции не только иммунных клеток, но и неиммунных клеток.

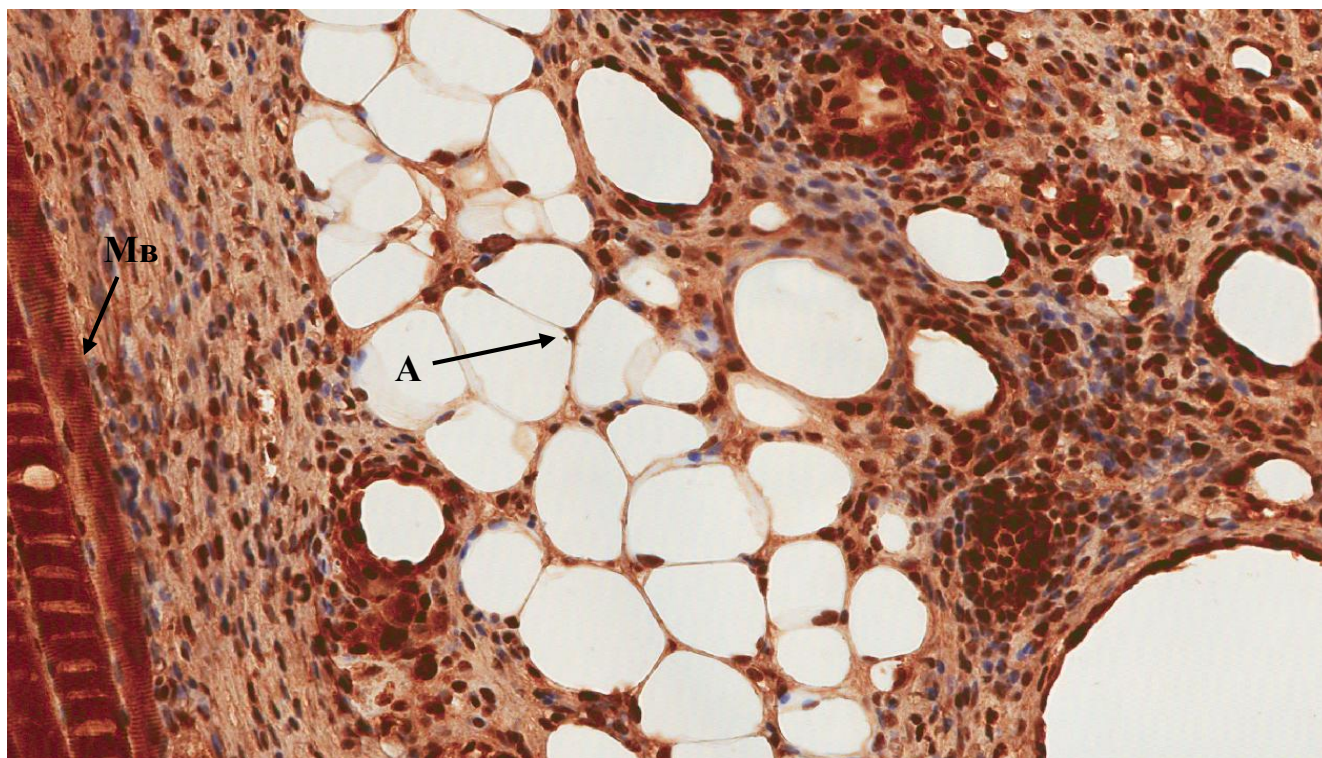


Рисунок 3.21 – Экспрессия VDR в ткани контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х600.

Примечание: Мв – мышечные волокна, А – ядро адипоцита

3.4. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 68

Во всех изученных образцах ткани в состав инфильтрата входили клетки макрофагального происхождения ($CD68^+$), составлявшие примерно половину общей популяции в репрезентативных полях зрения. У крыс КГ $CD68^+$ клетки были представлены в значительно большей степени в гранулематозном инфильтрате, в отличие от ДК. $CD68^+$ клетки преимущественно локализовались в центральных областях иммунной гранулемы, и почти все они демонстрировали интенсивное или умеренное коричневое окрашивание цитоплазмы и плазмалеммы. (Рисунок 3.22)

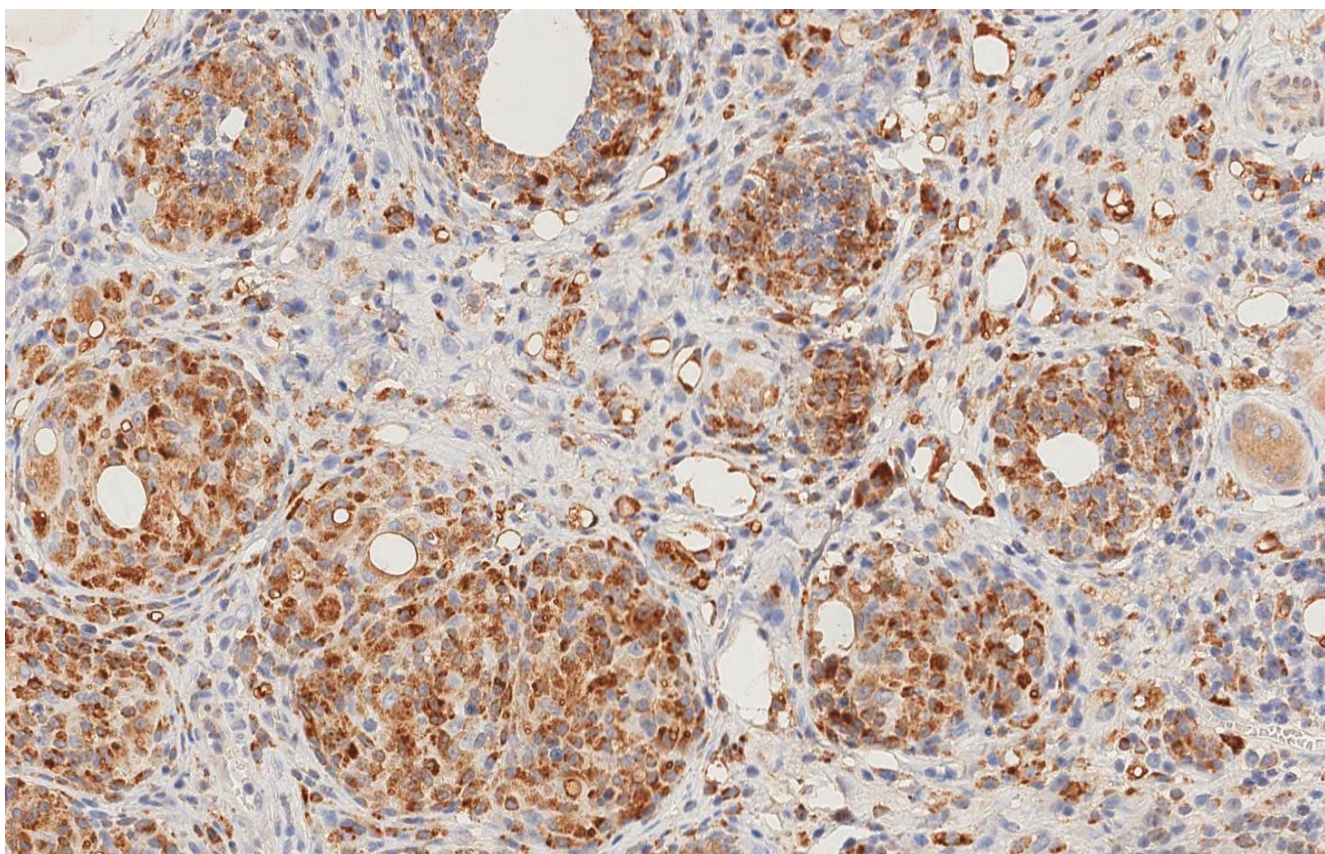


Рисунок 3.22 – Макрофагальная инфильтрация стромы мягких тканей контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. CD68 (пан-макрофагальный маркер). Ув. x400.

Оценивая присутствие макрофагальных клеток в гранулематозном инфильтрате контрольных крыс на 35-е сутки эксперимента следует отметить, что во всех образцах тканей отмечалось небольшое количество макрофагов с иммунопозитивно окрашивающейся мембраной и цитоплазмой, которые определялись в перифокальной зоне иммунной гранулемы и характеризовались низкой экспрессией маркера CD68. В межгранулемных зонах число этих клеток значительно колебалось: в одних полях зрения их было несколько десятков, в других – всего 5–10 макрофагов. CD68-положительные клетки располагались вплотную к лимфоидным элементам (CD3+ клеткам), как правило, образуя скопления вокруг сосудов (Рисунок 3.23).

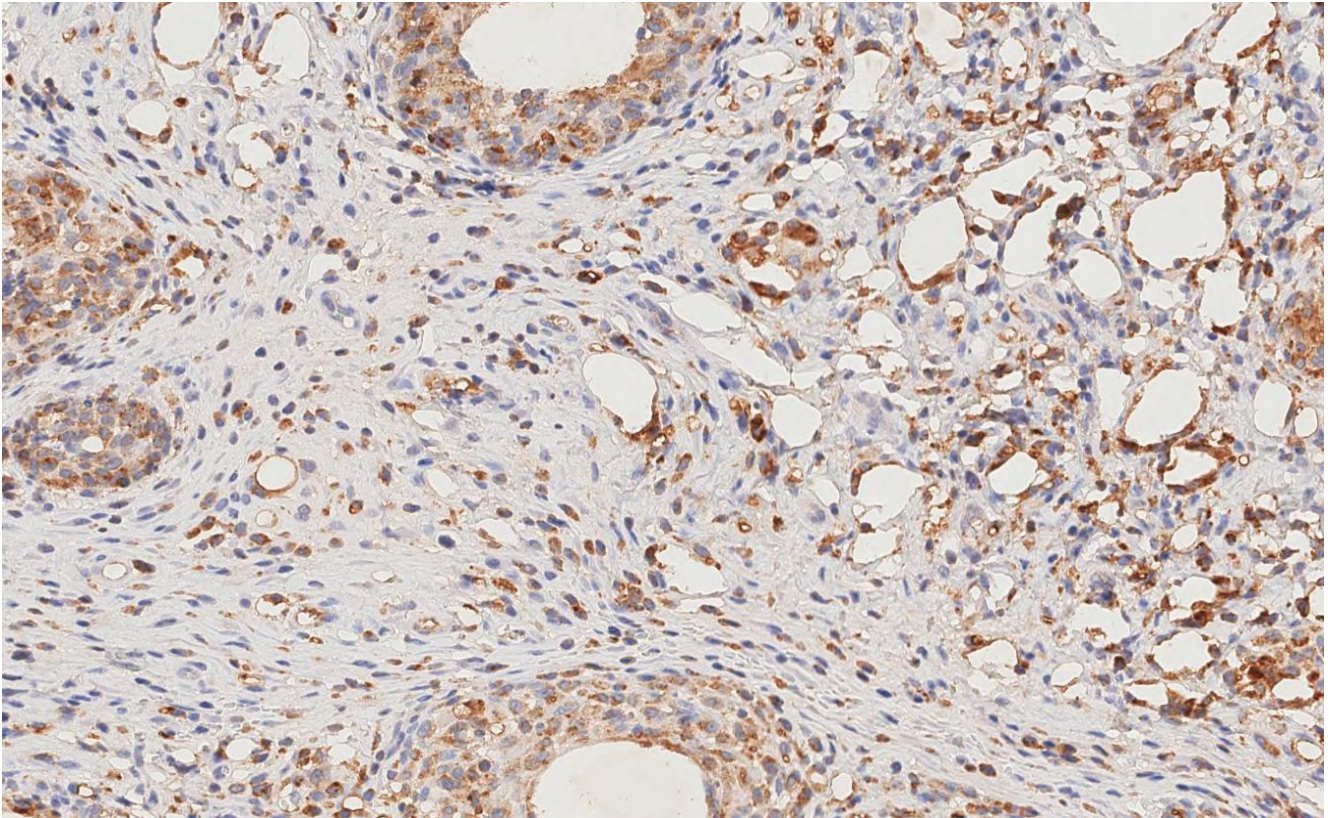


Рисунок 3.23 – Макрофагальная инфильтрация в межгранулемной области контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. CD68 (пан-макрофагальный маркер). Ув. x400.

Показатели экспрессии CD68 указывают на то, что иммунная гранулема формируется из макрофагально-клеточных инфильтратов, насыщенных фагоцитарно активными клетками. Вероятно, эти клетки привлекаются из периферической крови и костного мозга для элиминации антигена, и создания пула антиген-презентирующих клеток при возросшей потребности в пролиферации и дифференцировке новых фагоцитов. Следует отметить, что в случае незавершенного фагоцитоза, то есть при невозможности полной элиминации антигена, макрофаги сливаются между собой и образуют гигантские клетки. Образование гигантских клеток свидетельствует о подавлении антиген-представляющей функции в очаге воспаления.

В отличие от контрольных крыс, на светооптическом уровне при большем увеличении, у экспериментальных животных при использовании поликлональных антител, специфичных к пан-макрофагальному антигену CD68, наибольшее количество иммунопозитивно окрашивавшихся клеток отмечалось в центральной области иммунной гранулемы, где они образовывали гигантские клетки по типу Пирогова-Лангханса (Рисунок 3.24). В указанной области большинство CD68-позитивных клеток характеризовалось яркой либо средней по интенсивности коричневой окраской цитоплазматической мембраны и цитоплазмы.

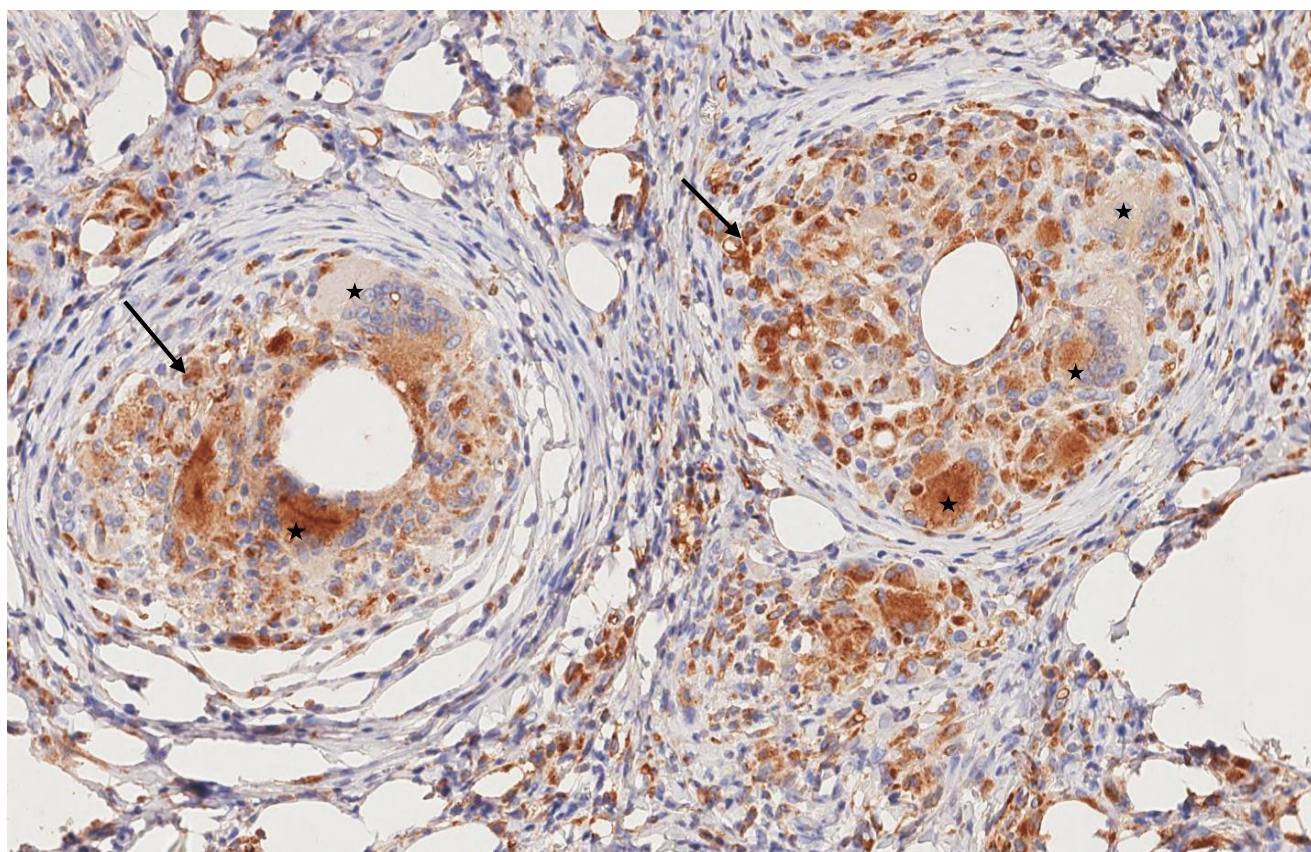


Рисунок 3.24 – Макрофагальная инфильтрация тканей крысы ЭГ 1. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. CD68 (пан-макрофагальный маркер). Ув. x400.

Примечание: стрелка – CD68⁺ макрофагальные клетки, звездочка – гигантские клетки по типу Пирогова-Лангханса

Следует отметить, что во всех исследуемых образцах, вне зависимости от характера и выраженности воспалительной реакции, экспрессия маркера CD68, специфичного для макрофагов, в значительно большей степени была представлена в гранулематозном инфильтрате, где они образовывали групповые скопления и располагались в тесной ассоциации с Т-лимфоцитами в CD3-позитивных областях на периферии гранулемы (Рисунок 3.25). В меньшей степени, рассеянные и одиночные CD68⁺ клетки выявлялись в межгранулемных областях, особенно в местах скоплений В-лимфоцитов, экспрессирующие маркер CD20.

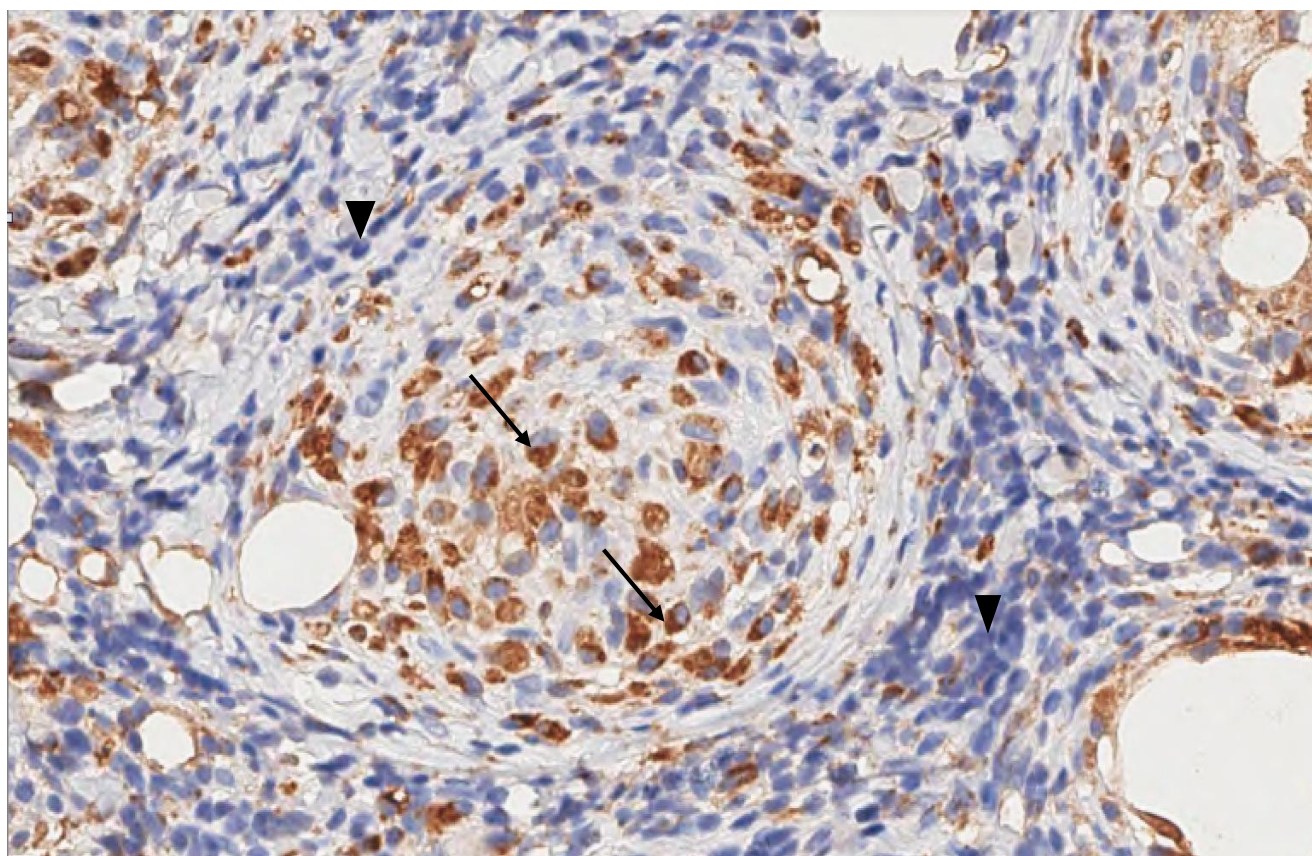


Рисунок 3.25 – Макрофагальная инфильтрация тканей экспериментальной крысы второй группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. CD68 (пан-макрофагальный маркер). Ув. x800.

Примечание: стрелка – CD68⁺ макрофагальные клетки, указатель – иммунонегативные воспалительные клетки (лимфоциты)

Несмотря на то, что при иммуногистохимическом исследовании гранулематозного воспалительного инфильтрата экспериментальных животных ЭГ 3 также был выявлен высокий уровень экспрессии пан-макрофагального маркера, визуально определялось меньшее количество сформированных зрелых иммунных гранул, содержащих гигантские клетки по типу Пирогова-Лангханса. Меньшее количество зрелых гранул у крыс ЭГ 3 указывает на несформированность иммунной гранулемы и продолжающееся образование клеточных ассоциаций (Рисунок 3.26).

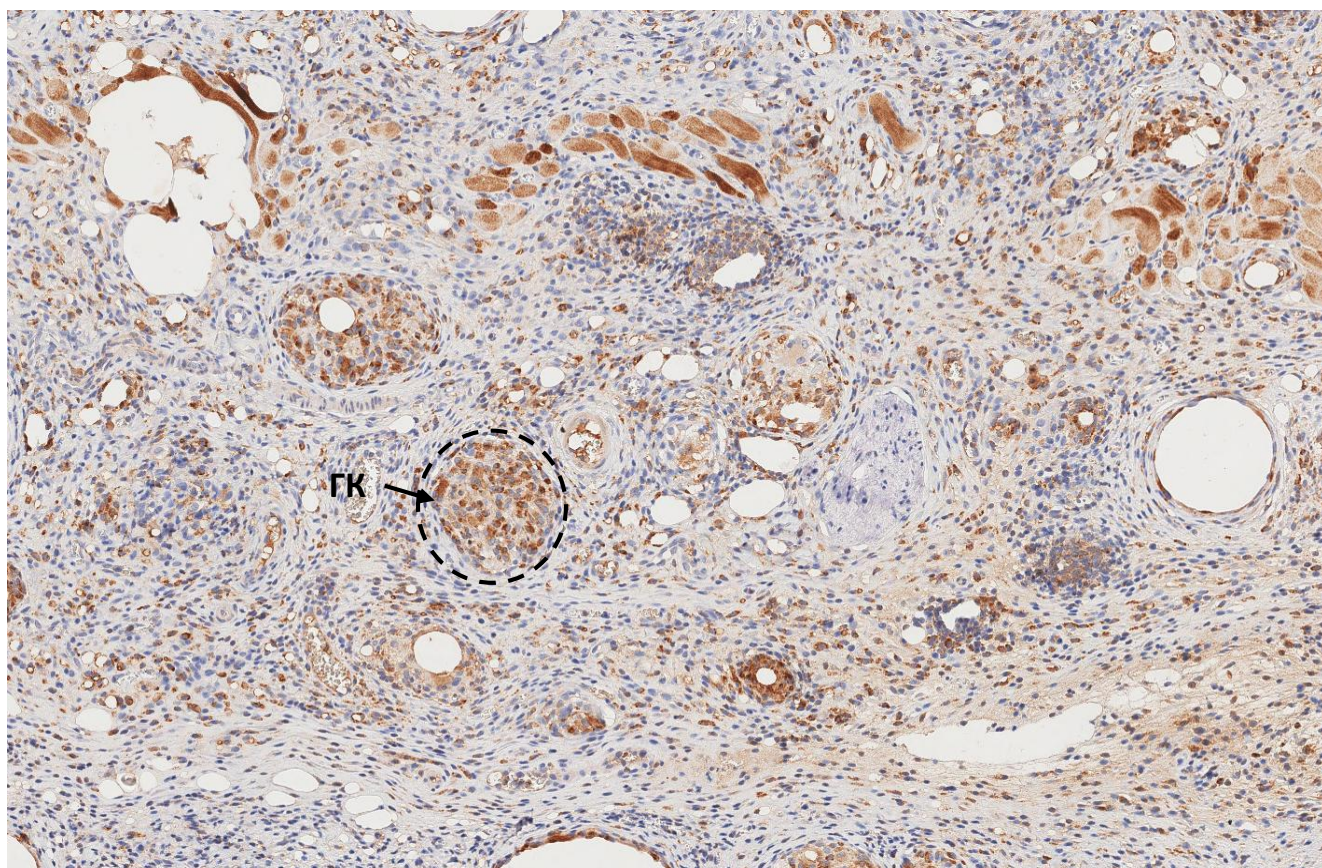


Рисунок 3.26 – Макрофагальная инфильтрация ткани крысы ЭГ 3. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. CD68 (пан-макрофагальный маркер). Ув. x200.

Примечание: пунктирная округлая область – зрелая иммунная гранулема, ГК – гигантская клетка

С позиции макрофагальной активности обнаружили существенные преобразования в диффузном гранулематозном инфильтрате при введении парикальцитола. На 35-е сутки эксперимента отмечено статистически достоверное уменьшение количества CD68⁺ клеток во всех областях гранулемы. Показатели экспрессии маркера CD68 в гранулематозном инфильтрате после введения парикальцитола у животных всех экспериментальных групп составили 182,0 [131,0; 211,0], 250,0 [172,5; 291,0] и 218,0 [187,0; 250,0], что, соответственно, в 2,26, 1,64 и 1,89 раза уступает значениям, полученным в группе контроля (во всех случаях, $p < 0,001$). Между ЭГ 2 и ЭГ 3 каких-либо статистически достоверных различий выявлено не было ($p = 0,45$). Данные количественного анализа CD68⁺ клеток представлены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Уровень экспрессии пан-макрофагального маркера CD68 контрольной и экспериментальных групп крыс (M [Q1; Q3] IQR)

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М	411,0	182,0*	250,0*	218,0*
[Q1; Q3]	[353,0; 460,0]	[131,0; 211,0]	[172,5; 291,0]	[187,0; 250,0]
IQR	107,0	80,0	118,5	63,0

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Отдельно необходимо более подробно осветить вопрос гигантских клеток. Полученные значения статистического анализа количества гигантских клеток в гранулематозном инфильтрате контрольных и экспериментальных крыс представлены в Таблице 3.3. Как видно из представленной ниже таблицы, наименьшее количество гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса отмечали в КГ и составило 2,0 [1,0; 3,0].

Таблица 3.3 – Клеточная популяция гигантских клеток контрольной и экспериментальных групп крыс (М [Q1; Q3] IQR)

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М [Q1; Q3]	2,0 [1,0; 3,0]	5,0 [3,0; 6,0]*	4,0 [2,5; 6,0]*	4,0 [1,5; 7,5]
IQR	2,0	3,0	3,5	6,0

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

На 35-е сутки эксперимента клеточная популяция гигантских клеток характеризовалась статистически достоверным увеличением их количества, особенно в центральной области иммунной гранулемы. Показатели клеточной популяции гигантских клеток в гранулематозном инфильтрате после введения парикальцитола у животных ЭГ 1 и ЭГ 2 составили 5,0 [3,0; 6,0] и 4,0 [2,5; 6,0] соответственно, что в 2,5 ($p = 0,006$) и 2 раза ($p = 0,03$) превышает значения, полученные в группе контроля. С другой стороны, при сравнении показателей клеточной популяции гигантских клеток у животных ЭГ 3 и контрольной группы, а также при сравнении ЭГ 2 и ЭГ 3 статистически достоверных различий выявлено не было ($p = 0,07$ и $p = 0,06$, соответственно).

Как уже отмечалось, у экспериментальных животных в месте сенсibilизации, где определялась диффузная гранулематозная инфильтрация тканей, наблюдалось, с одной стороны, уменьшение количества макрофагальных клеток, а с другой – увеличение количества гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса с образованием зрелых иммунных гранул. В частности, количество макрофагов в центральной области иммунной гранулемы было больше, чем в перифокальной. Следует отметить, что наиболее значительное снижение наблюдали в межгранулемных областях, тогда как в центральной области гранулем показатель оставался на примерно постоянном уровне.

3.5. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 1a

Во всех исследуемых образцах иммуногистохимический анализ выявил наличие специализированных ДК (клеток Лангерганса), экспрессирующих маркер CD1a и характеризующихся различной степенью выраженности мембранной иммунопозитивной реакции. В КГ выявили единичные CD1a⁺ клетки, которые локализовались в основном в межгранулемных областях на фоне незрелых гранул. Также следует отметить отсутствие иммунопозитивной реакции в центральной и периферической областях иммунной гранулемы (Рисунок 3.27).

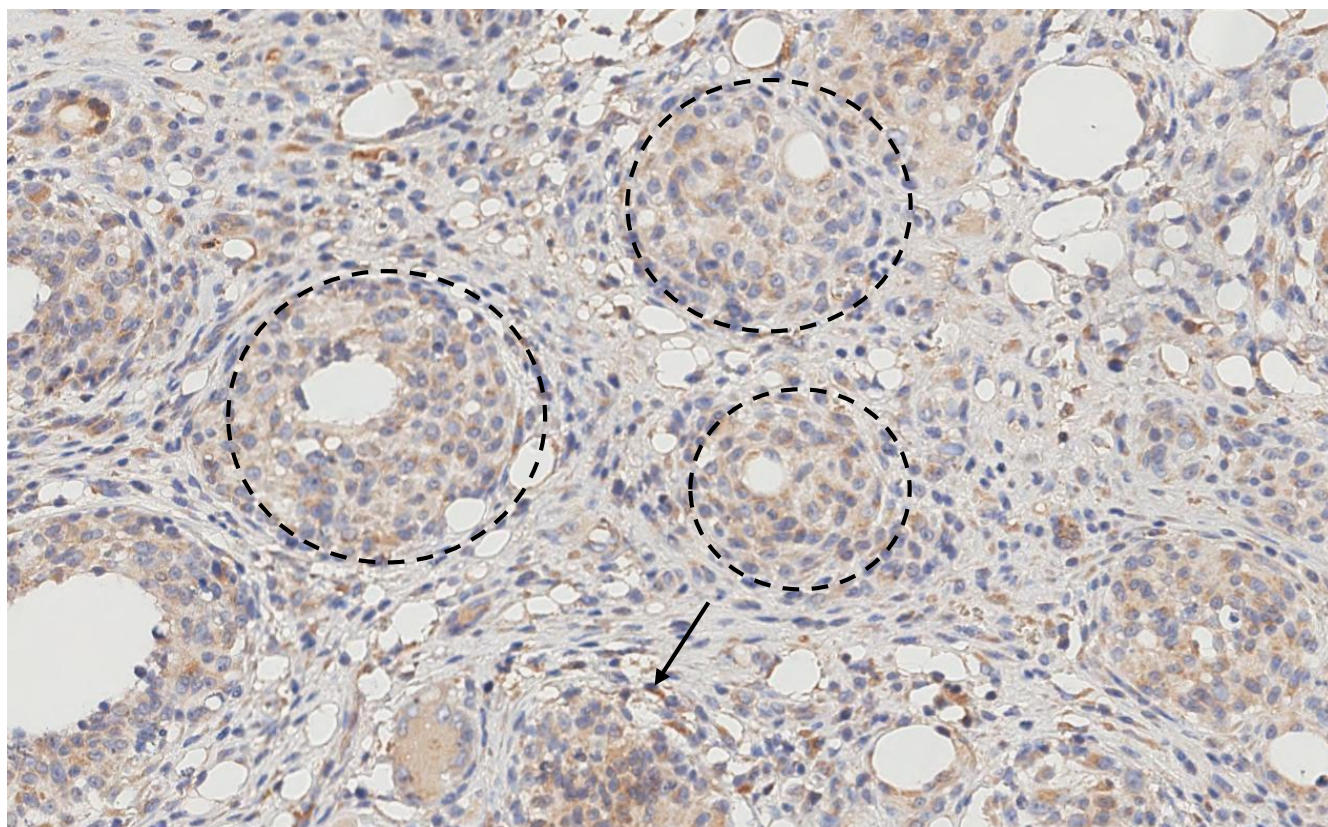


Рисунок 3.27 – Экспрессия маркера CD1a в контрольной группе. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Пунктирная линия – незрелые гранулемы, стрелка – клетка Лангерганса

Через 35 суток после введения первой дозы парикальцитола у крыс ЭГ 1, аналогично КГ, наблюдалась выраженная экспрессия маркера CD1a в единичных клетках. Экспрессия отмечалась не только в межгранулемных областях, но и в перифокальной области, окружающей зрелые и созревающие иммунные гранулемы (Рисунок 3.28).

Примечательно, что после парентерального введения парикальцитола у животных ЭГ 2 была выявлена аналогичная иммунопозитивная реакция. Она наблюдалась не только в перифокальной, но и в центральной области гранулемы. В частности, CD1a⁺ клетки определялись в перифокальной области, особенно в местах скоплений CD3⁺ клеток (Рисунок 3.29).

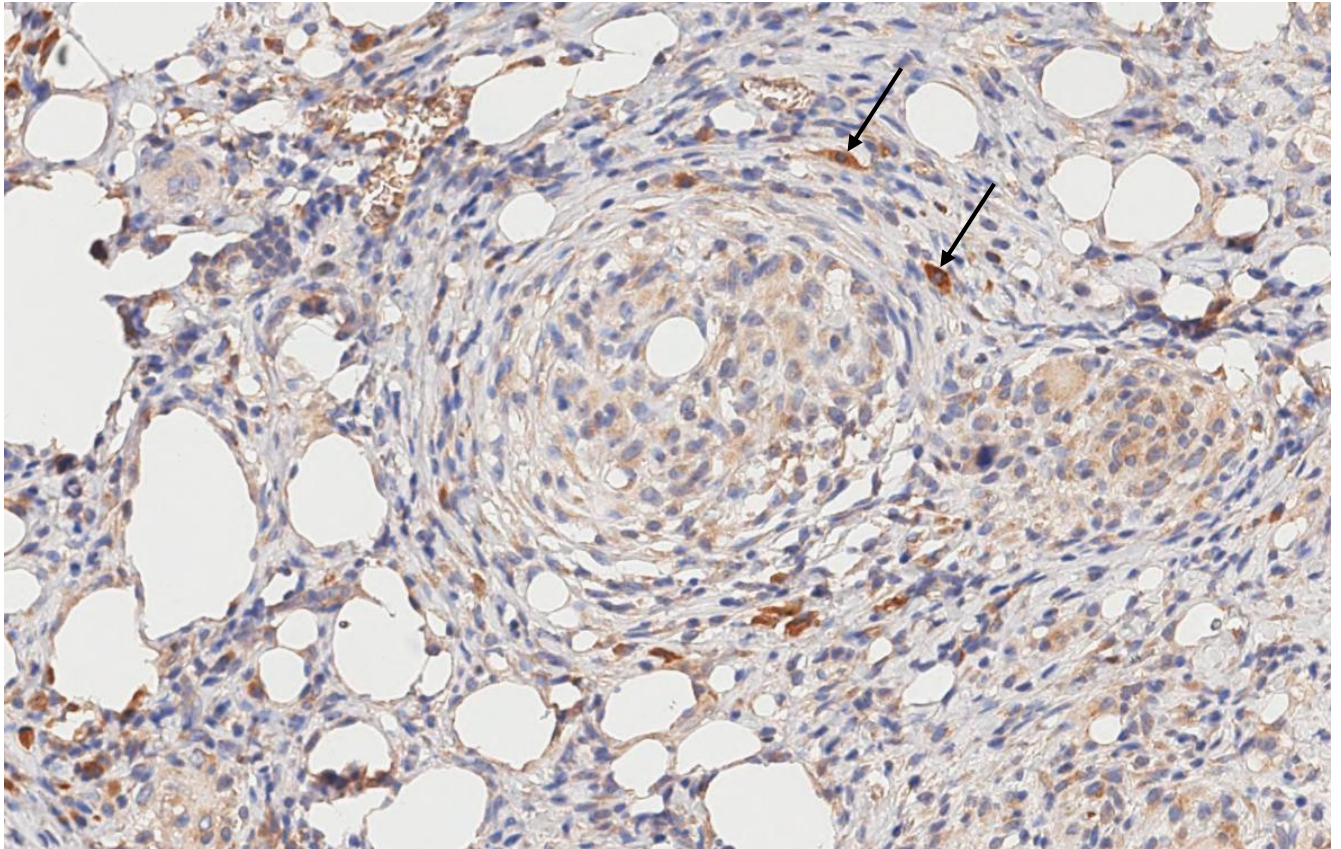


Рисунок 3.28 – Экспрессия маркера CD1a в перифокальной области крысы ЭГ 1. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Примечание: стрелка – клетка Лангерганса

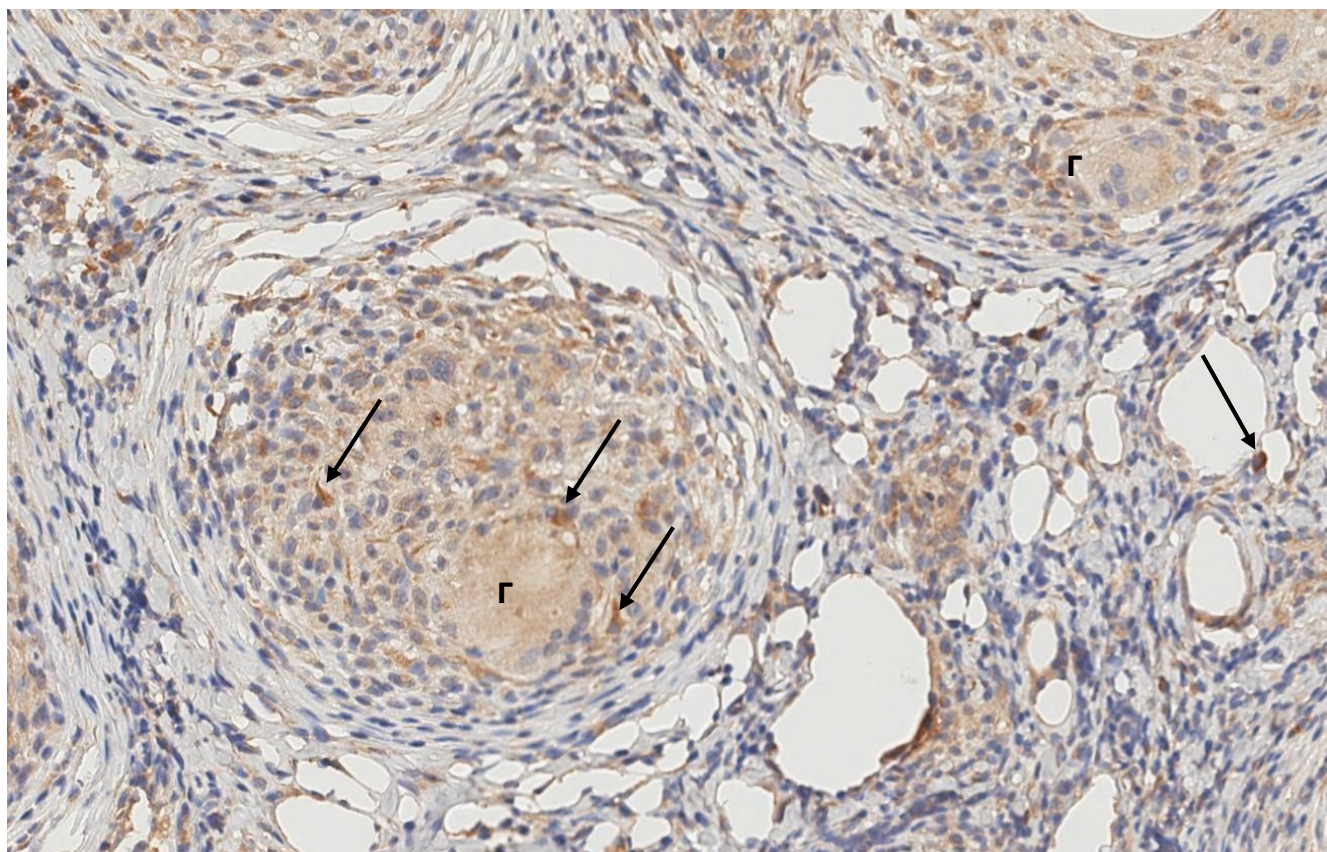


Рисунок 3.29 – Экспрессия маркера CD1a в центральной области зрелой иммунной гранулемы экспериментальной крысы второй группы. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х600.

Примечание: стрелка – клетка Лангерганса

Оценивая экспрессию мембранного маркера CD1a в образцах тканей, полученных от животных ЭГ 3, выявляли отсутствие иммунопозитивной реакции, которая соответствовала контролю (Рисунок 3.30). Данные изменения можно объяснить тем, что крысы в ЭГ 3 получали парикальцитол значительно меньше, по сравнению с другими группами, а также, меньшим влиянием парикальцитола на формирование гранулемы после повторного контакта с антигеном. Это может быть связано с тем, что повторный контакт с антигеном активирует внутриклеточные пути, которые стимулируют иммунные клетки и ингибирует пути, связанные с лиганд-ассоциированной активацией VDR.

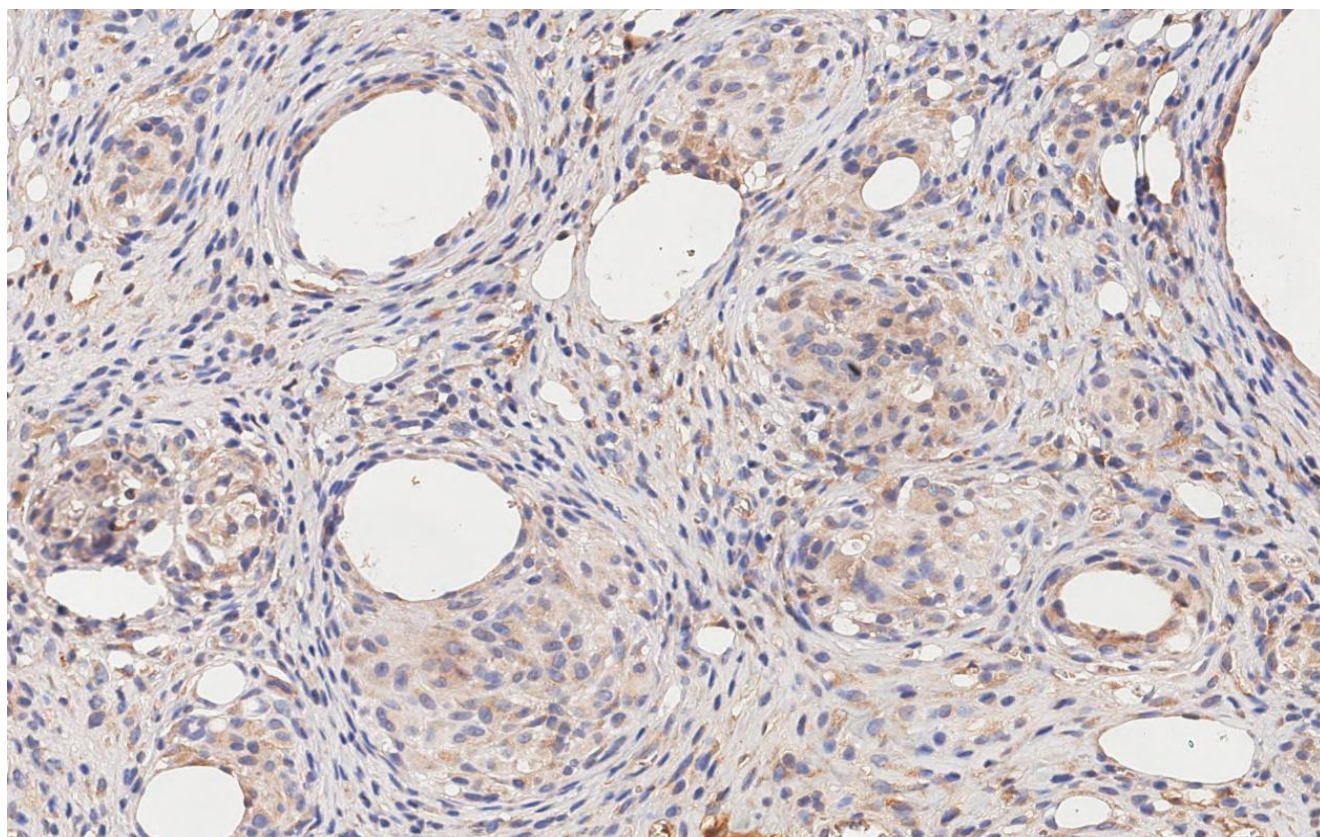


Рисунок 3.30 – Экспрессия маркера CD1a у крысы третьей экспериментальной группы. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400

Таблица 3.4 – Уровень экспрессии маркера CD1a в контрольной и экспериментальных группах крыс (М [Q1; Q3] IQR)

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М	3,0	4,0	11,0*	3,0
[Q1; Q3]	[2,0; 6,0]	[2,0; 6,5]	[8,0; 15,5]	[1,0; 4,0]
IQR	4,0	4,5	7,5	3,0

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

При изучении уровня экспрессии маркера CD1a не выявлено статистически достоверных различий между контрольной группой (3,0 [2,0; 6,0]) и первой экспериментальной группой (4,0 [2,0; 6,5]), а также между контрольной группой

(3,0 [2,0; 6,0]) и третьей экспериментальной группой (3,0 [1,0; 4,0]) ($p = 0,80$ и $p = 0,24$, соответственно). В экспериментальной группе 2 экспрессия CD1a была в 3,67 раза статистически достоверно выше, чем в группе контроля, и составила 11,0 [8,0; 15,5] ($p = 0,002$).

Данные изменения можно объяснить тем, что парикальцитол по-разному влияет на активность клеток Лангерганса. С одной стороны, это зависит от того происходит ли контакт с антигеном или нет, с другой стороны, на каком этапе формирования иммунной гранулемы произошёл этот контакт: в период сенсibilизации или разрешения. Это подтверждается данными статистического сравнения количества специализированных дендритных клеток в первой и второй экспериментальных группах, в которых наблюдались характерные изменения, проявлявшиеся в увеличении популяции CD1a⁺ клеток после контакта с антигеном в 2,75 раза ($p = 0,01$).

Результаты исследования показали, что введение парикальцитола приводило к значительному увеличению экспрессии CD1a в тканях на фоне созревания иммунной гранулемы. Уровень экспрессии CD1a во второй экспериментальной группе был выше в сравнении с контрольной группой, что указывает на активизацию клеток Лангерганса и усиление их способности к презентации антигенов.

Кроме того, увеличение экспрессии CD1a специализированными дендритными клетками может также свидетельствовать о том, что парикальцитол влияет на созревание дендритных клеток в момент первичного контакта с антигеном, повышая их функциональную активность и, следовательно, усиливая иммунный ответ.

3.6. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 3

Динамика преобразований гранулемы без парентерального парикальцитола (КГ) и при его воздействии (ЭГ 1–3) дополнена данными иммуногистохимического

анализа Т- и В-лимфоцитов, отражающих активность клеточного и гуморального иммунитета. Во всех образцах, независимо от характера воспалительной реакции, преобладают $CD3^+$ клетки, что свидетельствует о доминировании Т-лимфоцитов, составляющих примерно 50 % общей популяции в репрезентативных полях зрения (Рисунок 3.31).

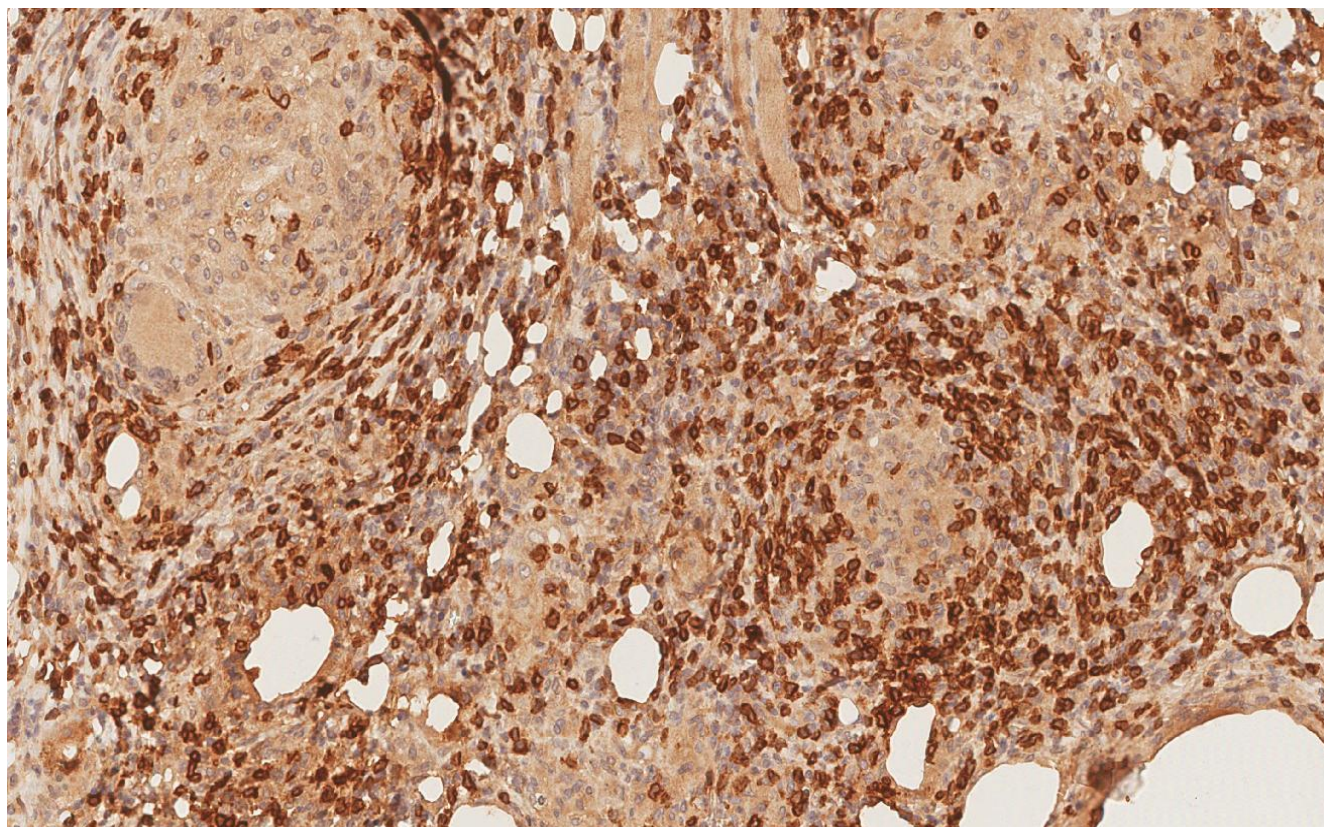


Рисунок 3.31 – Экспрессия маркера $CD3$ у контрольной крысы. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Во всех экспериментальных группах, особенно в ЭГ 1 и ЭГ 2, $CD3^+$ клетки локализовались преимущественно в перифокальной области гранулемы, где формировали скопления в тесной ассоциации с АПК (макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты). Наименьшая инфильтрация и активная миграция Т-клеток наблюдались в центральной области иммунной гранулемы (Рисунок 3.32).

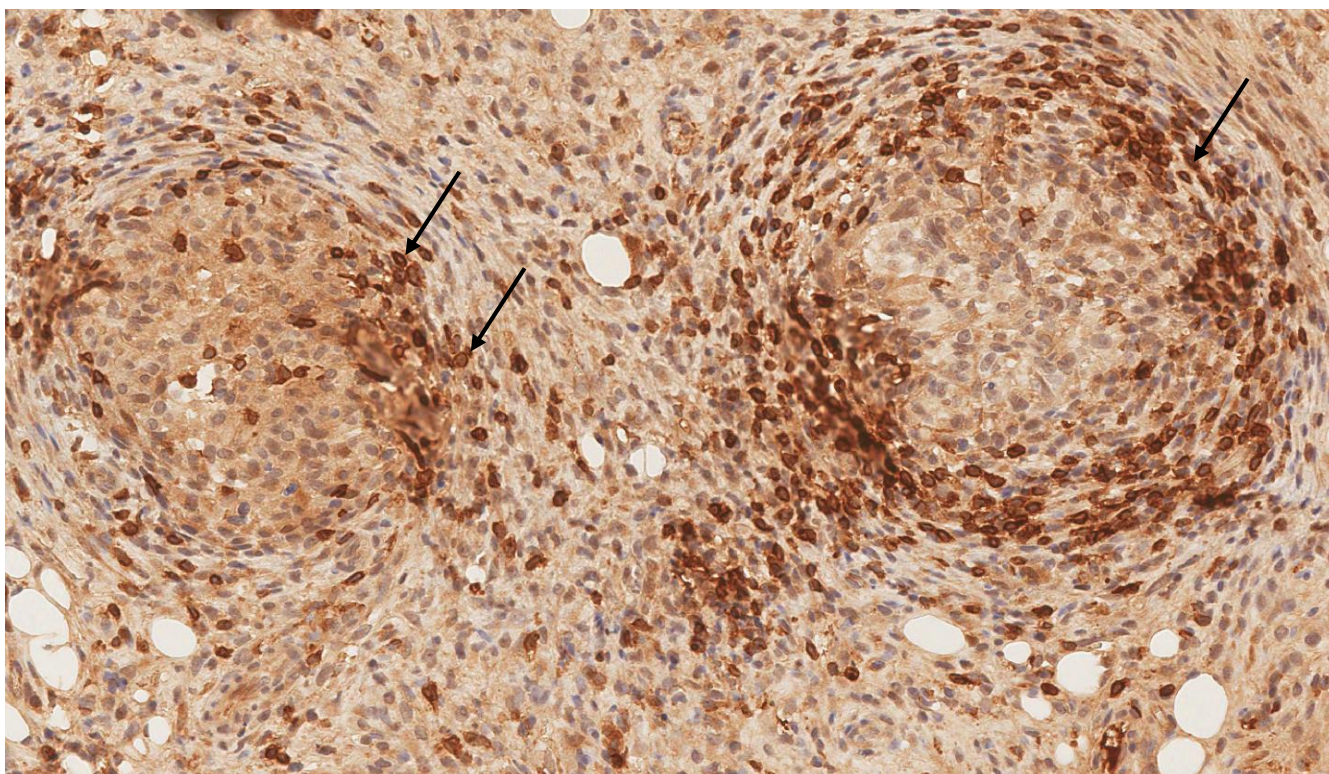


Рисунок 3.32 – Экспрессия Т-клеточного мембранного маркера CD3 у экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Примечание: стрелка – Т-лимфоциты в перифокальной области

В межгранулемных областях отмечали уменьшение количества CD3⁺ клеток (Рисунок 3.33). Это может быть вызвано активной миграцией CD3⁺ клеток в перифокальную область.

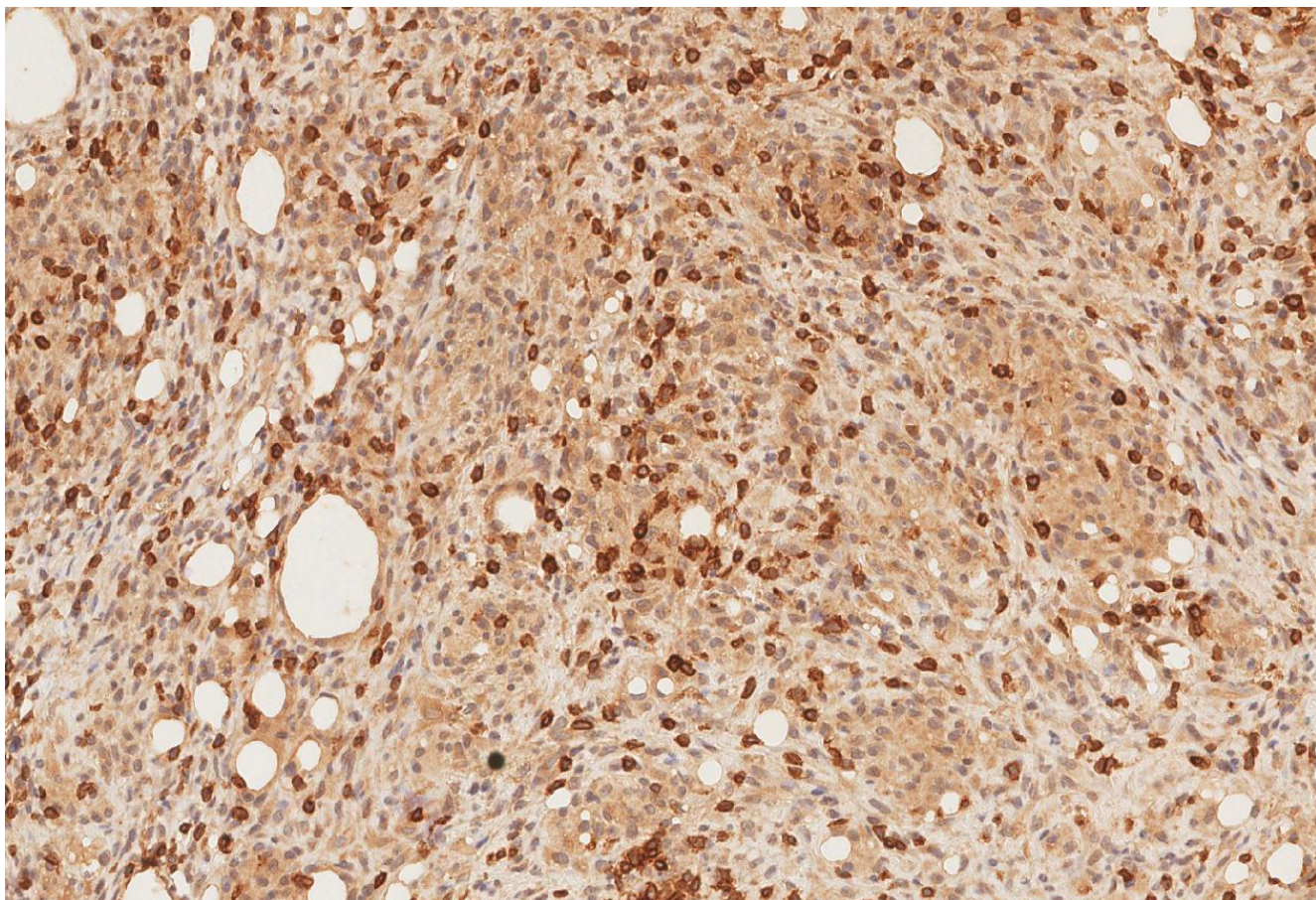


Рисунок 3.33 – Экспрессия Т-клеточного мембранного маркера CD3 у экспериментальной крысы второй группы. Межгранулемная область. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Оценивая присутствие Т-лимфоцитов в очаге гранулематозного воспаления экспериментальных крыс третьей группы, следует отметить, что во всех образцах тканей наблюдалось большое количество Т-лимфоцитов с иммунопозитивно окрашивающейся мембраной, которые определялись во всех областях диффузного гранулематозного инфильтрата и характеризовались высокой экспрессией маркера CD3. В целом, экспрессия мембранного маркера CD3 соответствовала контролю. (Рисунок 3.34).

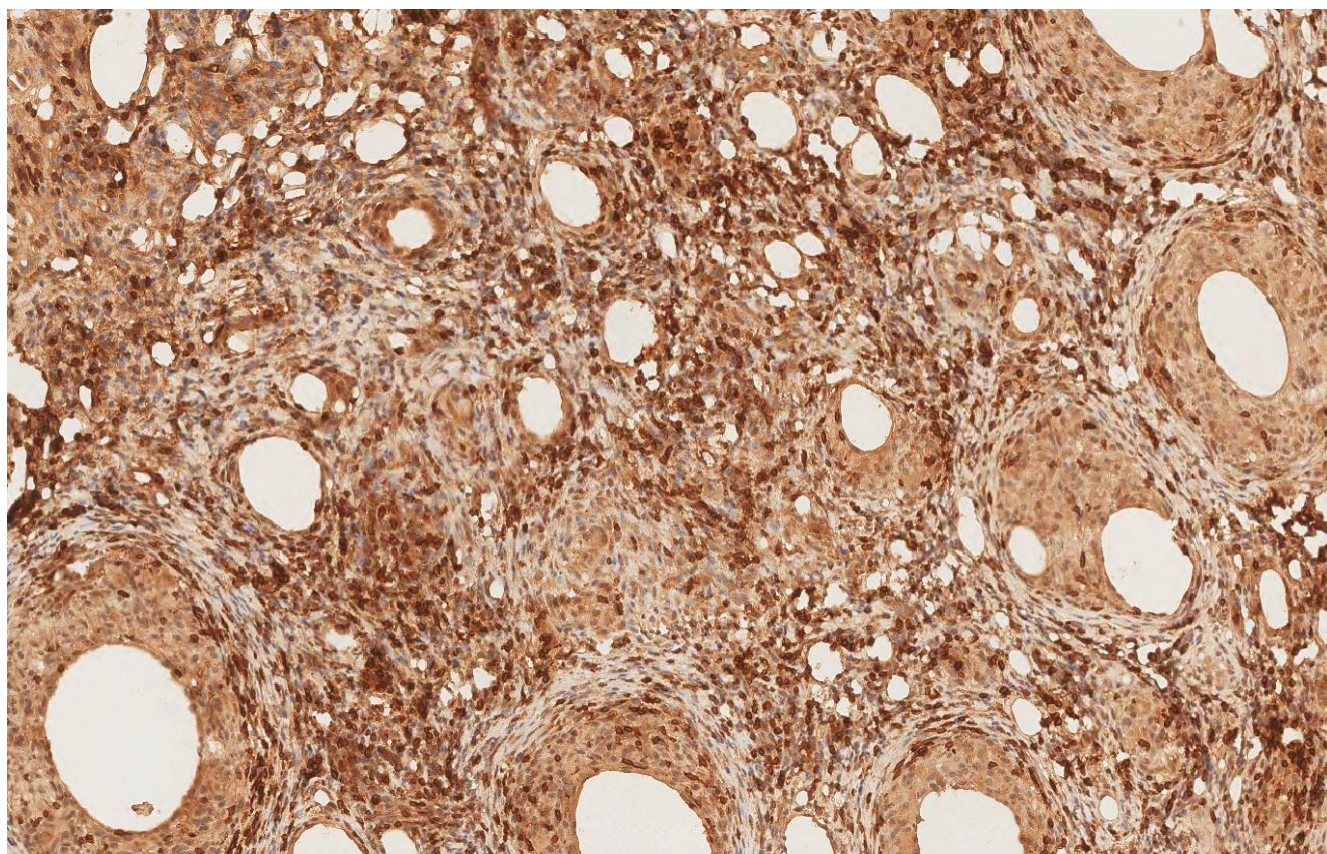


Рисунок 3.34 – Экспрессия Т-клеточного мембранного маркера CD3 у экспериментальной крысы третьей группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Таблица 3.5 – Уровень экспрессии маркера CD3 контрольной и экспериментальных группах крыс (М [Q1; Q3] IQR)

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М	323,0	280,0*	288,0*	310,0
[Q1; Q3]	[291,0; 412,0]	[220,5; 315,5]	[225,0; 310,0]	[261,0; 341,0]
IQR	121,0	95,0	85,5	80,0

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Как видно из представленной Таблицы 3.5, в КГ зафиксировано наибольшее количество Т-лимфоцитов – 323,0 [291,0; 412,0], тогда как в ЭГ 1 – наименьшее:

280,0 [220,5; 315,5]. На 35-е сутки эксперимента выявлено статистически достоверное уменьшение количества CD3⁺ клеток, особенно в межгранулемных областях. Показатели экспрессии маркера CD3 в гранулематозном инфильтрате после введения парикальцитола у животных ЭГ 1 и ЭГ 2 составили 280,0 [220,5; 315,5] и 288,0 [225,0; 310,0], соответственно, что на 13,3 % и 10,8 % уступает значениям, полученным в КГ (во всех случаях, $p = 0,02$). При сравнении показателей экспрессии маркера CD3 у крыс ЭГ 3 статистически достоверных различий в сравнении с крысами КГ не выявлено ($p = 0,27$) (Таблица 3.5).

Это наблюдение указывает на то, что инъекции парикальцитола ингибируют Т-клетки. Возможно, это связано с воздействием парикальцитола на Т-регуляторные лимфоциты, которые подавляют иммунный ответ в очаге пролиферативного гранулематозного воспаления, или с активацией системы иммунных контрольных точек путем увеличения экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1).

3.7. Анализ уровня экспрессии маркера кластера дифференциации 20

Во всех исследуемых образцах иммуногистохимический анализ выявил наличие клеток гуморального иммунитета, которые в значительно меньшей степени представлены в диффузном гранулематозном инфильтрате. Эти клетки экспрессировали маркер CD20, который специфичен для В-лимфоцитов. В центральной и перифокальной областях иммунной гранулемы обнаруживали отсутствие иммунопозитивной реакции. Однако в группе контроля выявили единичные CD20⁺ клетки, в основном, в межгранулемных областях на фоне незрелых гранулем (Рисунок 3.35).

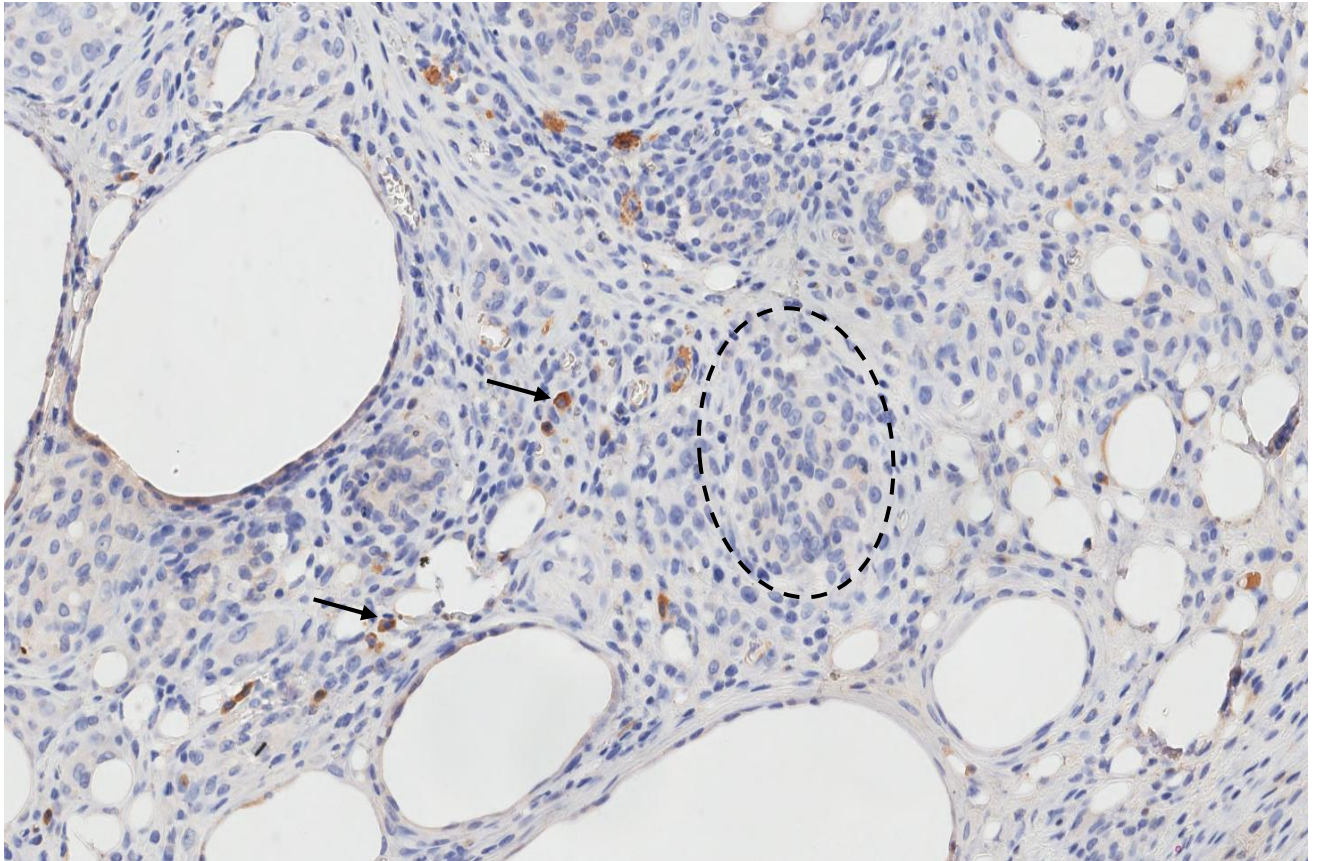


Рисунок 3.35 – Экспрессия В-лимфоцитарного маркера CD20 у контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Примечание: пунктирная линия – незрелые иммунные гранулемы, стрелка – В-лимфоцит

В первой экспериментальной группе выявили CD20-иммунопозитивные клетки, которые местами формировали клеточные скопления на фоне созревания иммунных гранул и характеризовались высокой степенью характерного коричневого окрашивания цитоплазмы и цитоплазматической мембраны (Рисунок 3.36).

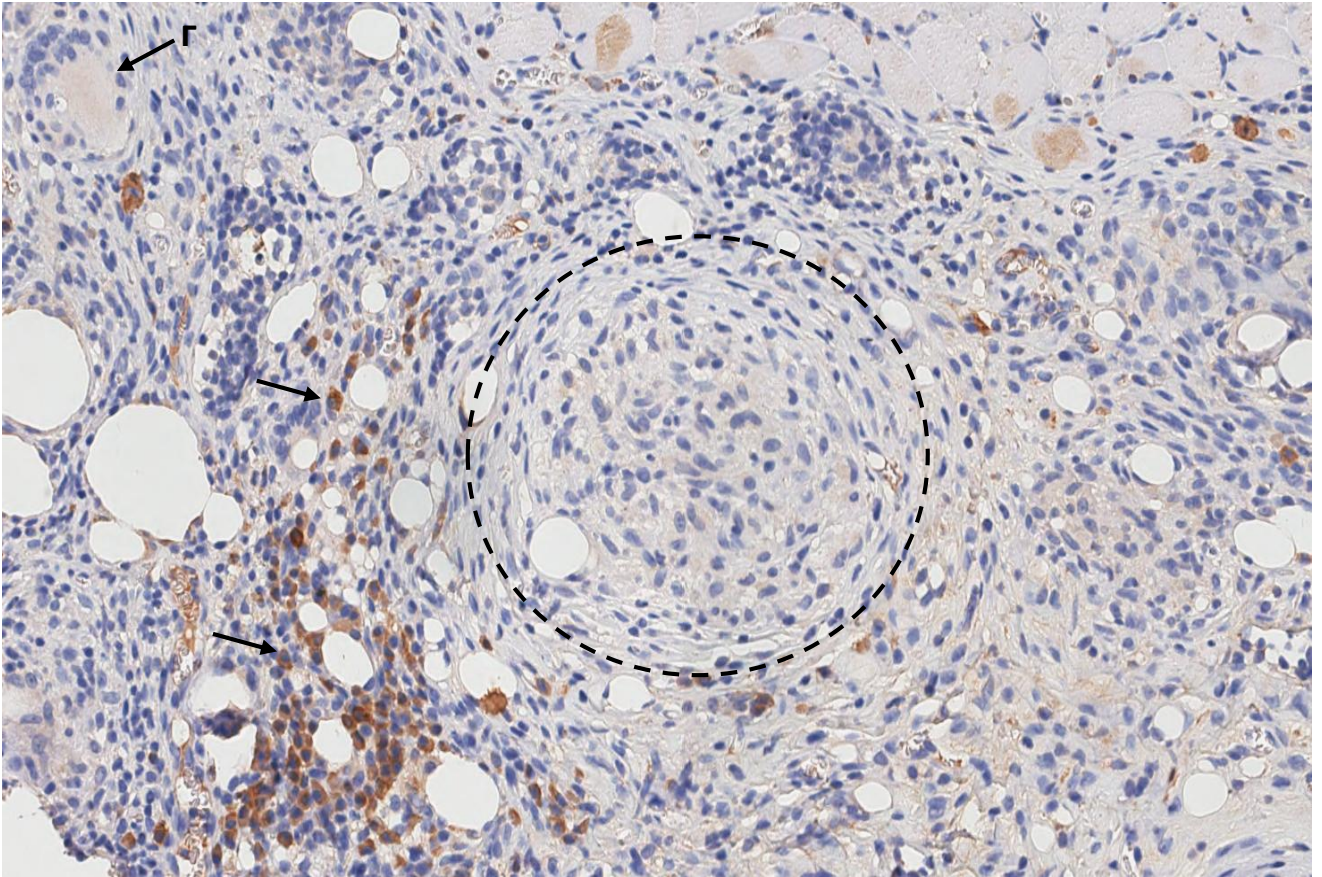


Рисунок 3.36 – Экспрессия В-клеточного маркера CD20 у экспериментальной крысы первой группы. Центральная и перифокальная области иммунной гранулемы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Примечание: пунктирная округлая область – зрелая иммунная гранулема, Г – гигантская клетка, стрелка – В-лимфоциты

Интересно, что у животных второй экспериментальной группы выявлены как единичные CD20-иммунопозитивные клетки, так и клеточные скопления в межгранулемных областях на фоне зрелых и созревающих иммунных гранул, которые также характеризовались высокой степенью характерного коричневого окрашивания цитоплазмы и цитоплазматической мембраны (Рисунок 3.37).

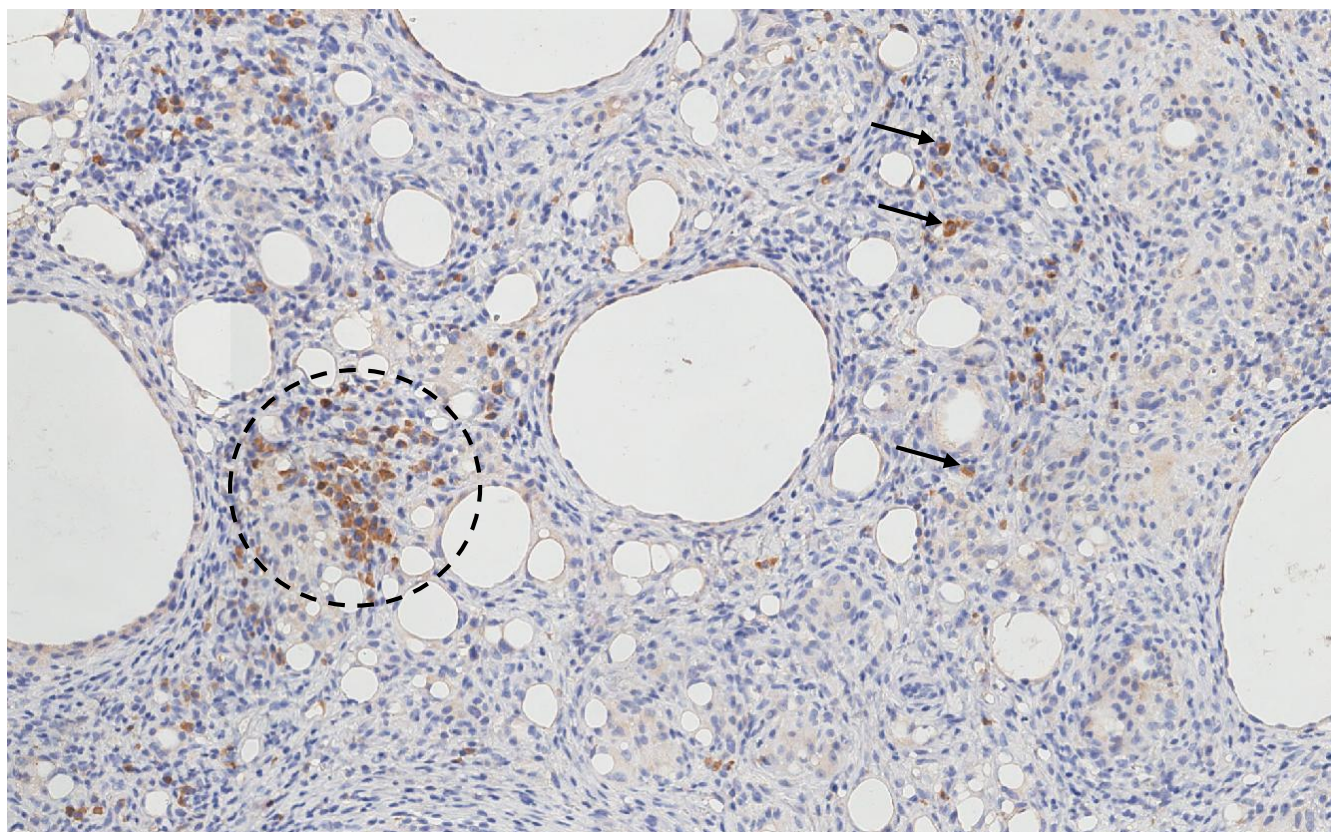


Рисунок 3.37 – Экспрессия В-клеточного маркера CD20 у экспериментальной крысы второй группы. Межгранулемная область. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Примечание: пунктирная округлая область – скопления В-лимфоцитов, стрелка – единичные CD20⁺ клетки

Оценивая образцы тканей, полученных от экспериментальных крыс третьей группы, отмечалось небольшое количество единичных В-лимфоцитов в очаге диффузного гранулематозного воспаления. В отличие от животных первой и второй экспериментальных групп, данные клетки не формировали клеточных скоплений ни в перифокальных, ни в межгранулемных областях. Кроме того, в центральных областях иммунной гранулемы обнаруживали отсутствие иммунопозитивной реакции. Таким образом, выявленные морфологические изменения соответствовали контролю (Рисунок 3.38).

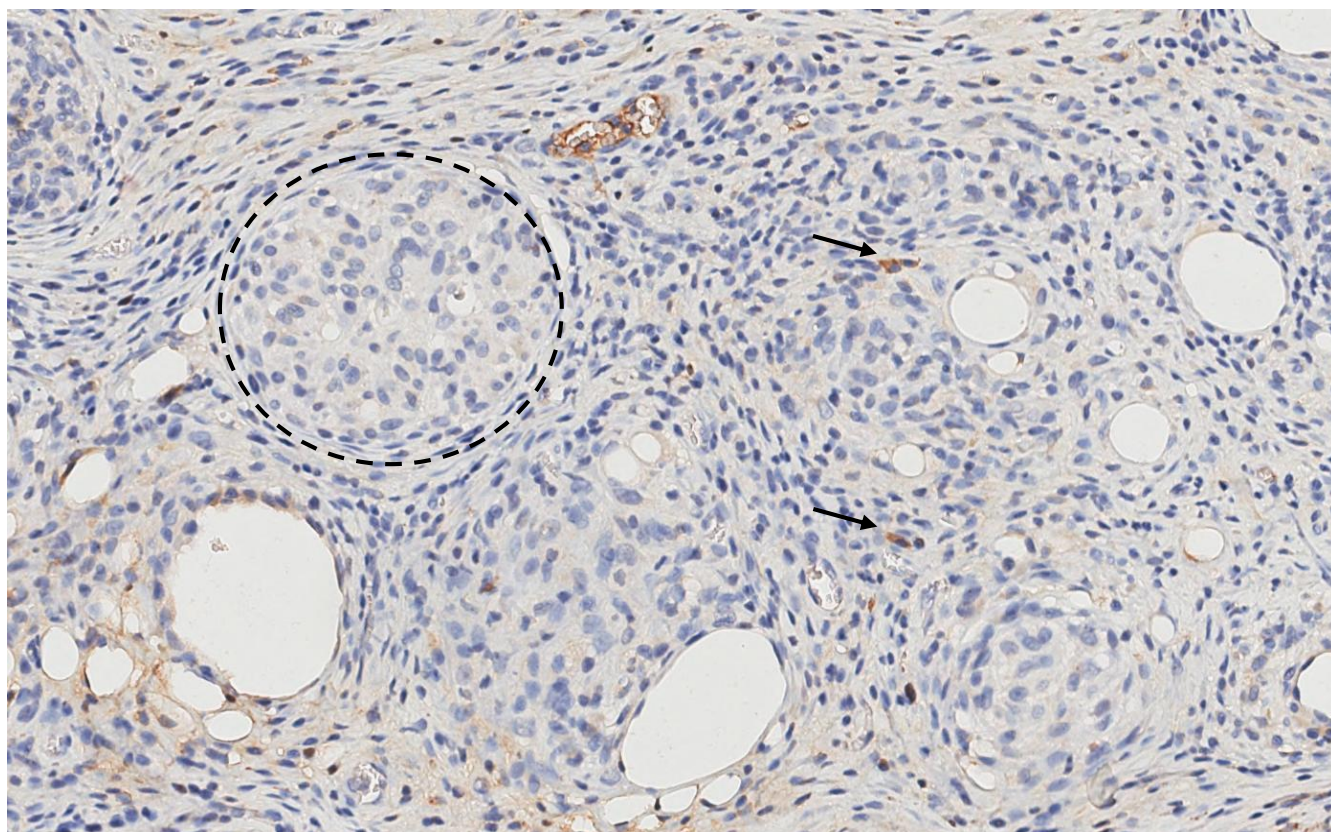


Рисунок 3.38 – Экспрессия В-клеточного маркера CD20 у экспериментальной крысы третьей группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Применение: пунктирная округлая область – незрелая иммунная гранулёма, стрелка – единичные CD20⁺ клетки

Таблица 3.6 – Уровень экспрессии маркера CD20 контрольной и экспериментальных группах крыс (М [Q1; Q3] IQR)

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М [Q1; Q3]	1,0 [0,0; 2,0]	7,0 [3,5; 9,5]*	17,0 [12,0; 24,0]*	3,0 [1,0; 6,0]*
IQR	2,0	6,0	12,0	5,0

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Полученные значения статистического анализа количества В-клеточной популяции в гранулематозном инфильтрате контрольных и экспериментальных

крыс представлены в Таблице 3.6. Как видно из представленной выше таблицы, наибольший уровень экспрессии маркера CD20 был отмечен во второй экспериментальной группе и составил 17,0 [12,0; 24,0]. При этом в группе контроля была выявлена очень низкая экспрессия маркера CD20, которая была незначительно ниже аналогичного показателя в ЭГ 3 – 1,0 [0,0; 2,0] и 3,0 [1,0; 6,0] соответственно ($p = 0,03$). В случае первой экспериментальной группы уровень экспрессии маркера CD20 оказался выше в 7 раз по сравнению с контролем и составил 7,0 [3,5; 9,5] ($p = 0,0004$). Резкое увеличение количества В-лимфоцитов во всех экспериментальных группах говорит о том, что не только клеточный, но и гуморальный иммунитет играет важную роль в патогенезе иммунной гранулемы.

В соответствии с изменениями клеточного состава гранулематозного инфильтрата, выявили значительные и статистически достоверные отклонения от контроля. Так, в первой, второй и третьей экспериментальных группах после введения парикальцитола количество В-клеток достоверно увеличилась в сравнении с контролем в 7, 17 и 3 раза соответственно (во всех случаях, $p < 0,03$), что обусловлено массовой миграцией клеток лимфоидного ряда в область иммунного воспаления.

Следует отметить, что увеличение уровня экспрессии маркера CD20 во всех экспериментальных группах может свидетельствовать о важной роли В-клеток при формировании гранулемы, особенно на этапе сенсibilизации и введения разрешающей дозы антигена. В частности, количество В-клеток было резко увеличено на этапе сенсibilизации, по сравнению с ЭГ 3, когда вводили разрешающую дозу ($p = 0,000019$). В-лимфоциты, по-видимому, рекрутируются из периферической крови и костного мозга с целью элиминации антигена и координирования иммунного процесса, посредством синтеза антител и интерлейкинов.

3.8. Анализ уровня экспрессии маркера лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1

ИГХ-анализ выявил клетки, экспрессирующие маркер программируемой клеточной смерти PD-L1. У крыс КГ экспрессия маркера PD-L1 в инфильтрате была ниже, особенно в центральной области гранулемы, где выявили отсутствие иммунопозитивной реакции или обнаруживали минимальную реакцию. PD-L1⁺ клетки локализовались в основном в межгранулемных областях (Рисунок 3.39).

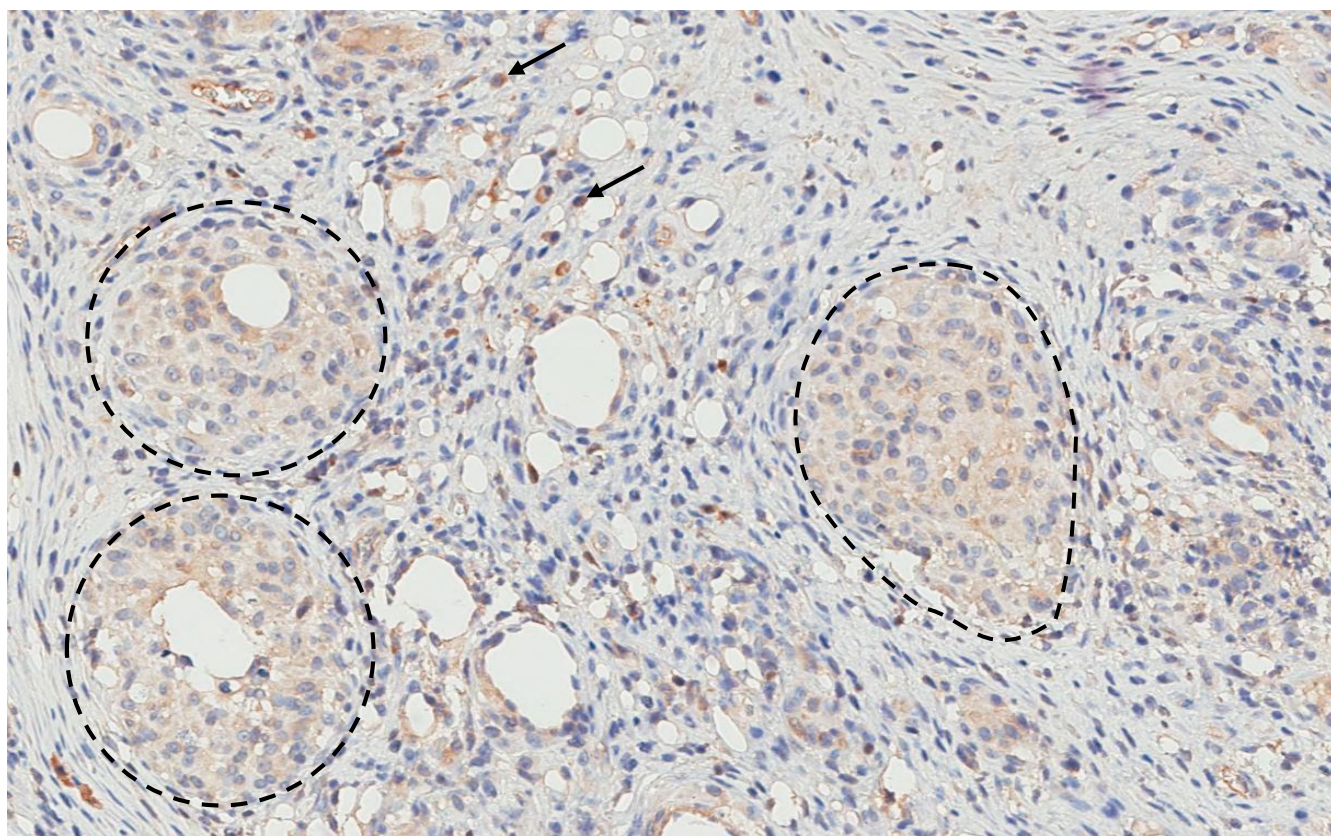


Рисунок 3.39 – Экспрессия маркера PD-L1 у контрольной крысы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Примечание: пунктирная округлая область – незрелая иммунная гранулёма, стрелка – PD-L1 позитивные клетки

Интересно, что у крыс ЭГ 1, в отличие от КГ обнаружили единичные PD-L1⁺ клетки не только в перифокальной и межгранулемной области, но, также и в центральной области иммунной гранулемы. В частности, была обнаружена экспрессия маркера PD-L1 гигантскими клетками (Рисунок 3.40).

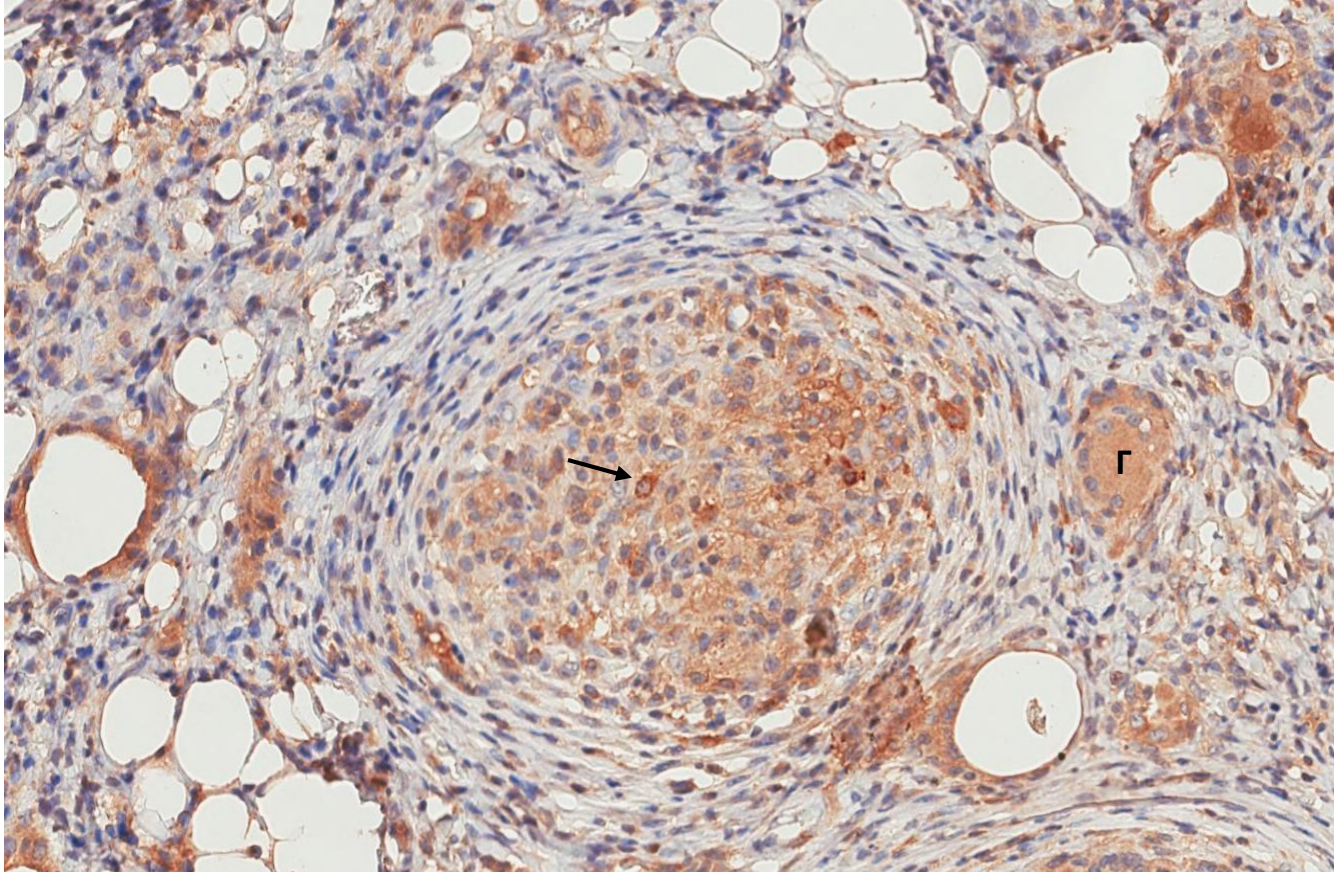


Рисунок 3.40 – Экспрессия маркера PD-L1 у крысы ЭГ 1. Центральная область иммунной гранулемы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Примечание: стрелка – PD-L1⁺ клетка, Г – гигантская клетка

ИГХ-анализ экспрессии маркера PD-L1 у крыс ЭГ 2 выявил PD-L1⁺ клетки во всех областях гранулематозного инфильтрата, однако их наибольшее число отмечалось в межгранулемных областях (Рисунок 3.41).

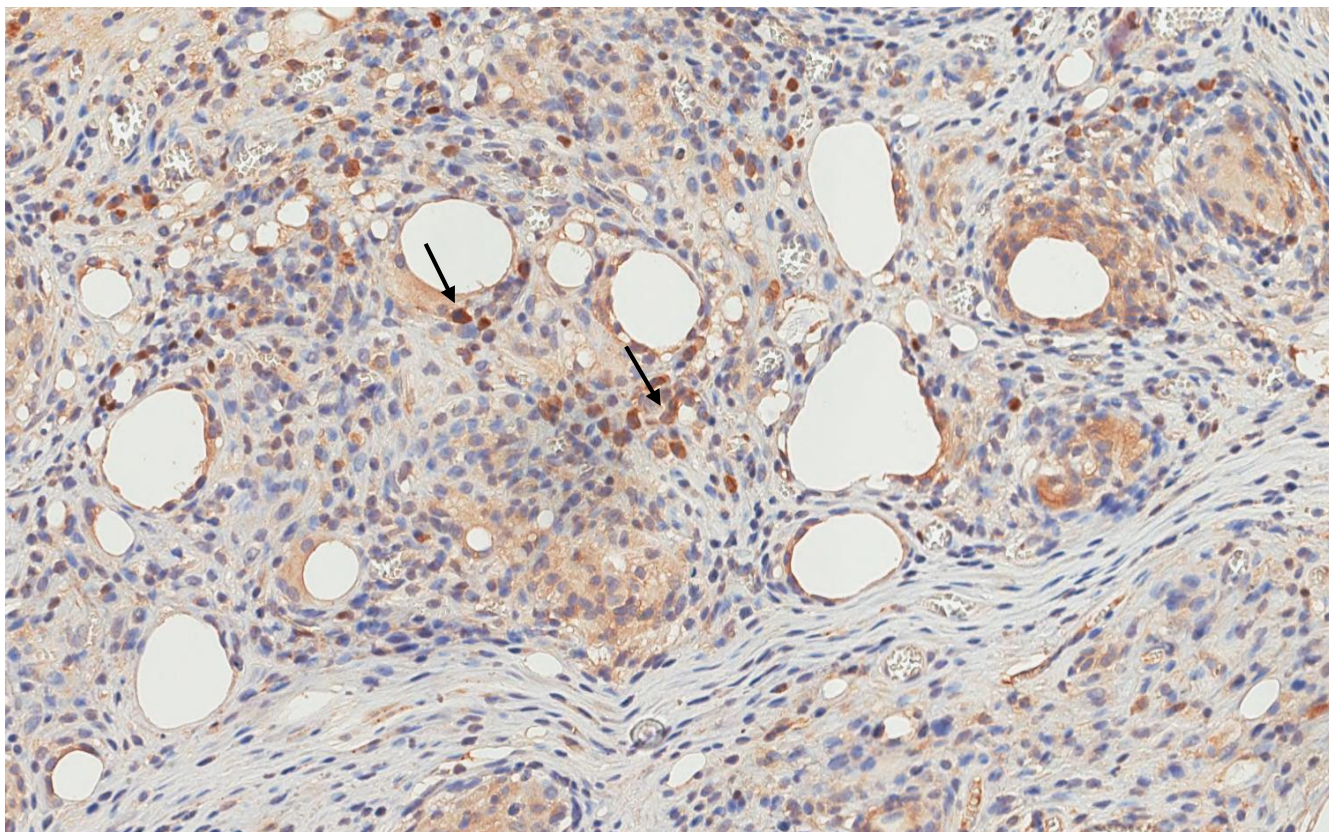


Рисунок 3.41 – Экспрессия маркера PD-L1 иммунными клетками экспериментальной крысы второй группы. Межгранулемная область. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. x400.

Примечание: стрелка – PD-L1 позитивные клетки

Аналогичную иммуногистохимическую картину наблюдали у экспериментальных животных третьей группы. При микроскопическом исследовании экспериментальных образцов выявили единичные PD-L1⁺ клетки, преимущественно в межгранулемных областях на фоне зрелых и не зрелых иммунных гранул. Следует отметить, что во всех экспериментальных группах наблюдалась слабоположительная или умеренно позитивная реакция в центральных областях иммунной гранулемы, которая характеризовалась коричневым окрашиванием цитоплазмы и мембраны клеток (Рисунок 3.42).

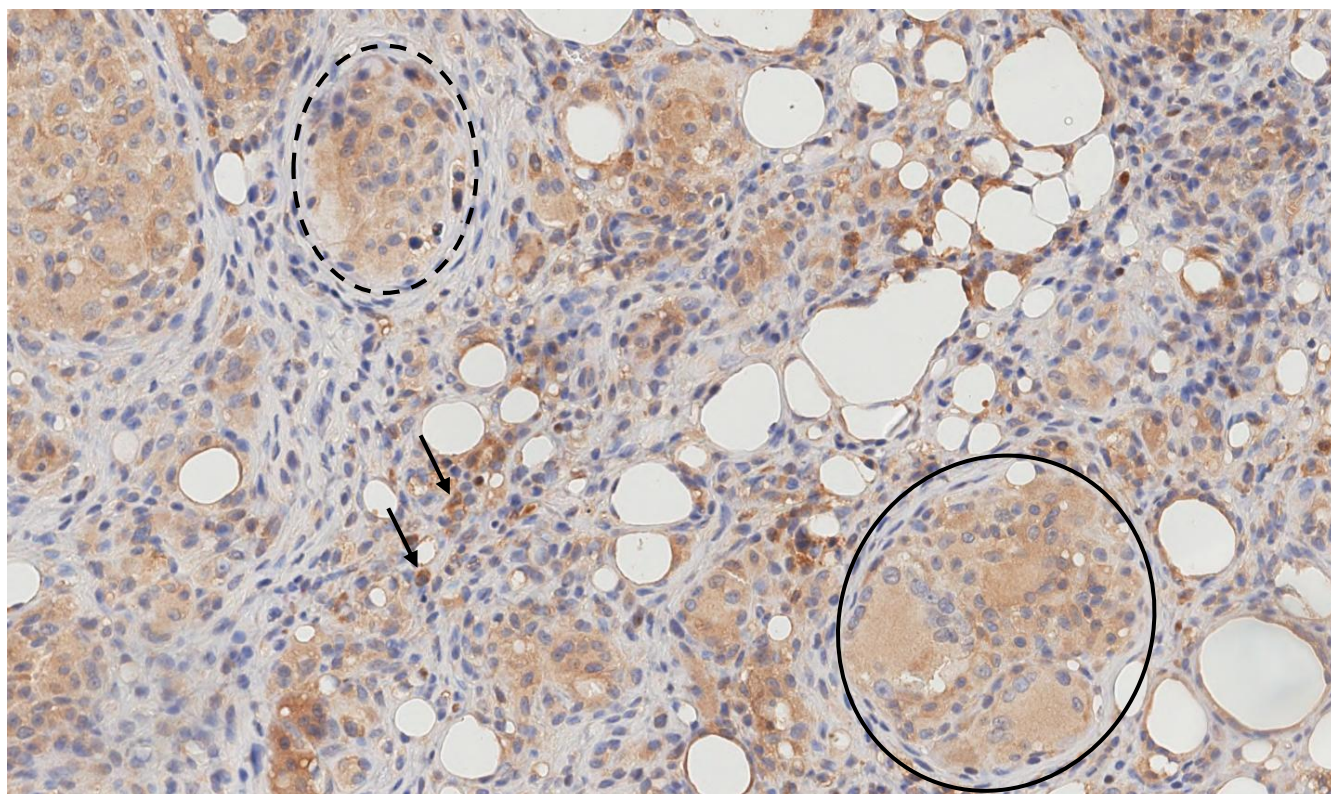


Рисунок 3.42 – Экспрессия маркера PD-L1 иммунными клетками экспериментальной крысы третьей группы. Межгранулемная область. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. х400.

Примечание: пунктирная округлая область – незрелая иммунная гранулема, сплошная округлая область – незрелая иммунная гранулема, стрелка – PD-L1 позитивные клетки

Таблица 3.7 – Уровень экспрессии маркера PD-L1 в контрольной и экспериментальных группах крыс (М [Q1; Q3] IQR)

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М [Q1; Q3]	1,0 [0,0; 1,5]	11,0 [7,5; 15,5]*	9,0 [5,0; 16,0]*	2,0 [0,0; 3,5]
IQR	1,5	8,0	11,0	3,5

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

На 35-е сутки эксперимента наблюдается статистически достоверное увеличение числа PD-L1⁺ клеток, особенно на периферии гранулемы и в межгранулемных областях. При введении парикальцитола количество PD-L1⁺ клеток в ЭГ 1 и ЭГ 2 составило 11,0 [7,5; 15,5] и 9,0 [5,0; 16,0] соответственно, что в 11 и 9 раз выше, чем в КГ ($p < 0,001$). Такое изменение объясняется неодинаковым влиянием парикальцитола на активность клеток в зависимости от длительности его применения, что подтверждается данными Таблицы 3.7, где количество PD-L1⁺ клеток уменьшается практически в геометрической прогрессии. Это свидетельствует о положительном влиянии парикальцитола на развитие гранулемы, вероятно, за счет образования комплекса VDR-VD, взаимодействующего с генами ответа витамина D (VDRE) и активирующего их для синтеза белка PD-L1.

3.9. Анализ уровня экспрессии мРНК

Молекулярно-генетический анализ выявил значительное повышение относительной экспрессии мРНК гена IL-10 в гранулематозном инфильтрате у животных. Полученные значения статистического анализа относительной экспрессии мРНК гена противовоспалительного IL-10 в гранулематозном инфильтрате контрольных и экспериментальных крыс представлены в Таблице 3.8. Как видно из представленной ниже таблицы, значения относительной экспрессии мРНК гена IL-10 составили: ЭГ1 – $2,29 \pm 0,42$, ЭГ2 – $2,12 \pm 0,52$, ЭГ3 – $1,69 \pm 0,24$. Эти показатели превышают значения, полученные в контрольной группе, примерно в 2,3, 2,1 и 1,7 раза соответственно, при этом различия являются статистически значимыми ($p < 0,05$). Увеличение уровня экспрессии мРНК IL-10 во всех экспериментальных группах говорит о том, что парикальцитол поляризует цитокиновый профиль в противовоспалительную сторону.

Таблица 3.8 – Уровень экспрессии мРНК гена IL-10 в контрольной и экспериментальных группах крыс

Показатель	КГ	ЭГ 1	ЭГ 2	ЭГ 3
М	1,05	2,29 *	2,12 *	1,69 *
SD	0,30	1,03	1,26	0,59
SE	0,12	0,42	0,52	0,24

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, М – среднее значение, SD – среднеквадратичное отклонение, SE – ошибка среднего, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Согласно данным Таблицы 3.9, анализ относительной экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α выявил неоднозначные изменения: экспрессия IL-1 β достоверно снизилась только в ЭГ 1, где ее уровень оказался в 5,5 раза ниже, чем в КГ ($p < 0,05$), а для TNF- α статистически значимых различий не обнаружено.

Таблица 3.9 – Уровень экспрессии мРНК генов IL-1 β и TNF- α в контрольной и экспериментальных группах крыс

Показатель	КГ		ЭГ 1		ЭГ 2		ЭГ 3	
	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β	TNF- α
М	0,99	0,97	0,18 *	0,45	0,49	0,58	0,54	1,27
SD	0,20	0,54	0,07	0,61	0,91	0,37	0,51	0,42
SE	0,08	0,22	0,03	0,25	0,37	0,15	0,21	0,17

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, М – среднее значение, SD – среднеквадратичное отклонение, SE – ошибка среднего, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Обобщая результаты исследования, можно констатировать, что гистологический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический анализ

свидетельствуют о значительном положительном воздействии многократного парентерального введения парикальцитола на восстановление гисто- и цитоархитектоники очага иммунного гранулематозного воспаления. Это подтверждается нарастающей динамикой формирования и созревания гранулем, смещением клеточной популяции в сторону лимфоидных клеток и усилением макрофагальной активности в центральной зоне гранулемы, включая межгранулемные области инфильтрата, а также усилением экспрессии мРНК генов противовоспалительных цитокинов.

Несмотря на иммуномодулирующий эффект препарата, отсутствие статистически значимых отклонений в некоторых точках может быть связано с малым числом объектов исследования, высокой внутригрупповой вариабельностью и применением терапевтической дозы. В контрольной группе наблюдались обратные тенденции: по сравнению с экспериментальными животными – снижение числа зрелых гранулем и гигантских клеток, а изменения сосудисто-стромального компонента были менее выражены на фоне преобладания незрелых гранулем.

В этой экспериментальной модели саркоидоз-подобного воспаления действие парикальцитола проявляется через активацию иммунных реакций, что выражается в усиленной пролиферации и созревании клеток лимфоидного и макрофагального ряда с увеличением экспрессии мРНК генов противовоспалительных цитокинов, а также, вероятно, стимуляцией костномозгового гемопоэза. Последний механизм косвенно подтверждается данными иммуногистохимического анализа клеток костномозгового происхождения ($CD20^+$ и $CD68^+$) в инфильтратах экспериментальной группы по сравнению с контролем.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время, несмотря на обширные данные отечественной и зарубежной литературы, подтверждающие непосредственную роль витамина D и его рецепторов (VDR) в нормальном функционировании и патологии иммунной системы [4; 23; 63; 161; 194; 243], концепция иммунорегуляторной функции лиганд-зависимой активации VDR остаётся недостаточно изученной. Согласно последним исследованиям, витамин D действует не только как регулятор кальциево-фосфорного обмена, но и оказывает плеiotропное влияние, связываясь со своими специфическими рецепторами, что приводит к контролю экспрессии более сотни генов ($\approx 3\%$ генома) [10; 25; 37; 51; 52]. Более того, VDR экспрессируется более чем в 40 типах клеток как у человека [2; 10; 232], так и у животных, включая крыс [164]. Однако целостная картина участия VDR в патогенезе инфекционных и онкологических заболеваний, а также иммунодефицитов пока не выработана [70; патогенетическими факторами требуют дальнейших исследований, что важно для разработки целевых терапевтических стратегий. В этом контексте изучение влияния парикальцитола – активной формы витамина D – на клеточные популяции в очаге гранулематозного воспаления представляет существенный интерес. Исследование позволяет рассмотреть роль лиганд-зависимой активации VDR как ключевого иммунорегуляторного звена в системе межклеточных взаимодействий. При этом биологические эффекты VD, как «классические», так и «неклассические», определяются взаимодействием между витамином D, VDR и ретиноидным X-рецептором (RXR), который формирует активный комплекс, связывающийся с VDRE на ДНК и регулирующий экспрессию генов-мишеней состояния иммунной системы и генетического полиморфизма VDR [69; 218]. Таким образом, вопрос о том, как лиганд-зависимая активация VDR модулирует иммунные процессы при патологиях, остаётся актуальным и требует системного

подхода с учетом генетических факторов. Дальнейшие исследования, в том числе влияния парентерального введения парикальцитола, представляют значительный интерес для фундаментальной и клинической медицины и могут способствовать оптимизации иммунокорректирующих терапевтических стратегий при аутоиммунных заболеваниях, таких как СД 1-го типа, ревматоидный артрит, ревматическая полимиалгия, псориаз, болезнь Крона и др. [38; 97; 244].

Настоящее исследование направлено на изучение эффектов лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D на изменение субпопуляций иммунокомпетентных клеток и экспрессии таргетных генов. Ключевым аспектом проведенного исследования стало выявление и изучение механизмов взаимодействия антигенпрезентирующих клеток и клеток лимфоидного ряда на клеточном и генетическом уровнях в очаге иммунного гранулематозного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR, а также определение потенциальной взаимосвязи PD-L1 и VDR.

В ходе исследования были изучены закономерности межклеточных изменений и трансформации в иммунной гранулеме на фоне лиганд-ассоциированной VDR. Были выбраны ключевые популяции иммунных клеток, связанных с клеточным ($CD3^+$ клетки), гуморальным ($CD20^+$ клетки), а также врожденным иммунитетом ($CD68^+$ и $CD1a^+$ клетки), с целью всестороннего изучения эффектов лиганд-ассоциированной активации VDR.

Полученные нами результаты морфологического исследования кожи крыс подтверждают формирование неспецифического иммунного ответа в виде иммунной гранулемы в ответ на введение искусственно синтезированной супероксиддисмутазы А. Не смотря на тот факт, что данный антиген является фактором патогенности *M. Tuberculosis*, ассоциированным с развитием гранулематозного воспаления с казеозным некрозом [138; 237], в настоящей работе выявлено развитие саркоидоз-подобного иммунного воспаления без творожистого некроза.

В 2011 году Swaisgood С.М. и соавторы продемонстрировали, что введение микробной супероксиддисмутазы А провоцирует развитие саркоидоз-подобного

гранулематозного воспаления [208]. Наши результаты согласуются с данными контрольными точками, такими как PD-L1, и VDR, либо отсутствие такой связи. Согласно нашим экспериментальным данным, экспрессия PD-L1 ассоциируется с активацией VDR, вызванной лигандом.

Результаты эксперимента демонстрируют три ключевых аспекта. Во-первых, гранулематозный инфильтрат в коже обнаружен у всех животных экспериментальных групп, а также у животных контрольной группы, за исключением группы, не сенсibilизированной или сенсibilизированной только полным адъювантом Фрейнда. Развитие саркоидоз-подобного воспаления у крыс, которым вводили SOD A, свидетельствует об эффективности применённой модели кожного гранулематозного воспаления.

Во-вторых, парентеральное введение парикальцитола влияло на структурно-функциональную трансформацию иммунной гранулемы, включая её созревание и изменение клеточного состава. Эти изменения подчёркивают важность парикальцитола как средства, способного модулировать клеточные взаимодействия в очаге воспаления.

В-третьих, иммуномодулирующий эффект парикальцитола оказался зависимым от стадии иммунного ответа, включая этапы сенсibilизации и введения разрешающей дозы антигена. Эти результаты подтверждают фазозависимый характер действия препарата, подчёркивая необходимость его применения с учётом временных и патогенетических особенностей воспалительного процесса.

В качестве отличительных черт гранулематозного инфильтрата, полученного от животных экспериментальных групп, следует отметить следующие особенности. Во-первых, уменьшение количества незрелых иммунных гранулём и увеличение количества зрелых гранулём у животных групп ЭГ 1 и ЭГ 2 можно объяснить непосредственным действием парентерально введённого парикальцитола на клеточные популяции, входящие в состав гранулемы. Эти изменения отражают влияние парикальцитола на процессы созревания гранулемы.

Во-вторых, низкий показатель зрелости гранулём в ЭГ 3, вероятно, связан с меньшим количеством инъекций парикальцитола (4 инъекции), в то время как животные ЭГ 1 и ЭГ 2 получали 10 и 7 инъекций соответственно. Кроме того, фармакологический эффект парикальцитола имеет временную зависимость: он проявляется через несколько часов после введения и достигает своего пика спустя несколько дней, что связано с лиганд-ассоциированной активацией VDR и синтезом белков, обеспечивающих лечебный эффект [214].

В-третьих, эффективность парикальцитола может также зависеть от ряда дополнительных факторов, включая влияние цитокинов, не исследованных в данной работе (IL-2, IL-6, IL-17 и др.), а также белков иммунного контроля (CTLA-4, BTLA, LAG-3, TIM-3 и др.). Эти компоненты могут оказывать значительное влияние на процессы формирования и созревания иммунной гранулемы. Однако их детальное изучение не входило в рамки настоящего исследования ввиду его масштабности и необходимости сосредоточиться на ключевых аспектах иммунного ответа. Тем не менее, дальнейшее исследование данных белков представляется перспективным для углубленного понимания механизмов регуляции воспалительного процесса и иммуномодулирующего эффекта парикальцитола.

Наконец, иммунная гранулёма, являясь разновидностью аллергической реакции (ГЗТ IV), проходит несколько стадий, каждая из которых характеризуется своими уникальными механизмами [199]. Эффективность парикальцитола может зависеть от стадии аллергической реакции, в которую он вводится: до сенсibilизации, в её процессе или в момент разрешения, возникающего в результате повторного попадания аллергена в сенсibilизированный организм. При этом в разрешающей стадии можно условно выделить три фазы: иммунологическую фазу, патохимическую фазу, патофизиологическую фазу, каждая из которых характеризуется специфическими механизмами, направленными на подавление воспаления и восстановление тканей.

Во время сенсibilизации макрофаги играют значимую роль в иммунном ответе. Во-первых, макрофаги захватывают антигены (SOD A), перерабатывают их

и представляют на своей поверхности в комплексе с молекулами МНС II, активируя наивные Т-хелперные клетки. Во-вторых, макрофаги синтезируют и выделяют различные провоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6 и TNF- α , усиливая воспалительный ответ и привлекая другие иммунокомпетентные клетки. В-третьих, макрофаги взаимодействуют с ДК, усиливая их способность активировать Т-клетки, а также привлекают нейтрофилы и другие клетки врожденного иммунитета [199; 230]. Условно к стадии сенсibilизации можно отнести первую и вторую экспериментальные группы, поскольку их характеристики соответствуют ключевым признакам данного этапа.

Разрешающая стадия иммунного ответа на введение SOD A может быть условно разделена на три последовательные фазы: иммунологическую, патохимическую и патофизиологическую [199; 230]. Это позволяет более детально проанализировать динамику воспалительного процесса и влияние парикальцитола на каждую из них. Важно подчеркнуть, что это упрощенная модель, и границы между фазами могут быть размыты. Условно к указанной стадии можно отнести третью экспериментальную группу, которая представляет собой острую стадию гранулематозного воспаления, поскольку именно после повторного контакта с антигеном (введение разрешающей дозы SOD A) запускается процесс формирования гранулемы.

Иммунологическая фаза характеризуется взаимодействием антигена (SOD A) с сенсibilизированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими маркер CD3. Распознавание антигена Т-клетками, экспрессирующими специфические Т-клеточные рецепторы (TCR), инициирует каскад внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к активации Т-лимфоцитов. Эта активация сопровождается изменениями в метаболизме Т-клеток и их подготовкой к выполнению эффекторных функций. На этом этапе происходит пролиферация Т-лимфоцитов и их дифференцировка в эффекторные субпопуляции (Th1, Th2, Th17, Treg), профиль которых определяет дальнейшее развитие иммунного ответа [199; 230].

Патохимическая фаза характеризуется тем, что активированные Т-клетки выделяют биологически активные вещества (БАВ), включая цитокины (например,

IL-1, IL-10 и TNF- α) и хемокины. Эти медиаторы воспаления инициируют каскад биохимических реакций, приводящих к рекрутированию и активации других клеток иммунной системы (макрофаги, В-клетки) в очаг воспаления. На этом этапе происходит интенсивная пролиферация и дифференцировка клеток, формирование гранулемы и выраженная воспалительная реакция [199; 230].

Патофизиологическая фаза характеризуется развитием морфологических и функциональных трансформаций в тканях, направленных на локализацию и разрушение аллергена, в результате действия медиаторов воспаления как в очаге, так и за её пределами. На этом этапе происходит формирование зрелой иммунной гранулемы с характерной клеточной архитектурой, включающей макрофаги, эпителиоидные, многоядерные гигантские клетки и лимфоциты. В зависимости от баланса про- и противовоспалительных цитокинов, воспалительный процесс может разрешиться с образованием фиброзной ткани или привести к хроническому воспалению и тканевому повреждению [199; 230].

Таким образом, парикальцитол, как активная форма VD, может оказывать многоуровневое влияние на клеточные популяции иммунной гранулемы, модулируя их активность на клеточном, молекулярном и генетическом уровнях. Результаты исследования свидетельствуют о значительных изменениях в клеточном составе гранулемы, что указывает на способность парикальцитола модулировать иммунный ответ на различных стадиях гранулематозного воспаления посредством поляризации цитокинового профиля, а также влияния на экспрессию белков иммунных контрольных точек.

В ходе анализа экспериментальных групп были выявлены характерные общие черты, присущие всем группам. Во всех экспериментальных группах наблюдалось уменьшение количества CD68⁺ клеток и увеличение числа CD20⁺ клеток, а также рост числа PD-L1⁺ клеток, сопряжённый с снижением количества во всех экспериментальных группах, за исключением третьей.

Вышеописанные преобразования, затрагивающие клеточный состав гранулематозного воспаления (Рисунок 4.1) на фоне лиганд-ассоциированной

активации VDR, подчеркивают многостороннее воздействие парикальцитола на врожденный (макрофаги, ДК) и адаптивный (Т- и В-лимфоциты) иммунитет, что непосредственно отражается на процессах созревания иммунной гранулемы.



Рисунок 4.1 – Количественные изменения клеточных популяций в очаге иммунного гранулематозного воспаления.

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, ГК – гигантские клетки, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Влияние парикальцитола на баланс цитокинов (Рисунок 4.2) является одним из ключевых механизмов иммуномодулирующего действия, поскольку цитокины регулируют миграцию клеток, их активность и регенерацию тканей [13; 230]. Во всех экспериментальных группах изменялся как клеточный состав, так и цитокиновый профиль: наблюдалось значительное увеличение экспрессии мРНК гена противовоспалительного IL-10, тогда как среди провоспалительных цитокинов статистически значимое снижение отмечалось только для IL-1 β в ЭГ 1.

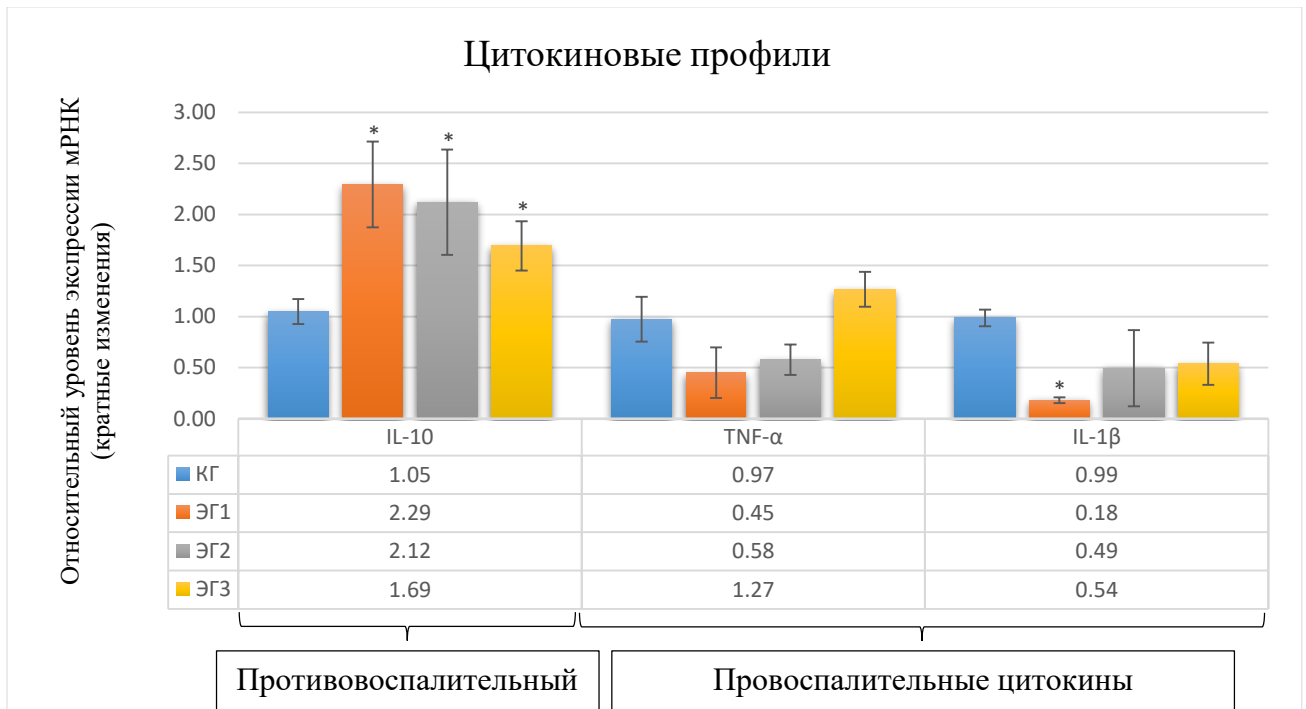


Рисунок 4.2 – Изменение уровня экспрессии мРНК генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в очаге иммунного гранулематозного воспаления.

Примечание: КГ – контрольная группа, ЭГ – экспериментальная группа животных, * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Количественные изменения со стороны $CD68^+$ клеток демонстрировали однонаправленную динамику врожденного иммунитета, проявляющаяся снижением их количества на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR. Однако, несмотря на то, что данные изменения наблюдались во всех экспериментальных группах, причины их уменьшения могут быть связаны с различными механизмами. В частности, в ЭГ 1 влияние на $CD68^+$ клетки отличалось статистически значимым снижением их числа в 2,3 раза по сравнению с КГ ($p < 0,001$). Это значение оказалось максимальным среди всех экспериментальных групп, что подтверждает выраженный иммуномодулирующий эффект парикальцитола. С большой долей вероятности данные изменения обусловлены тем, что ЭГ 1 получала парикальцитол до сенсibilизации антигеном

В ЭГ 2 зафиксировано снижение количества CD68⁺ клеток в 1,6 раза по сравнению с КГ ($p = 0,0009$). Данный показатель является минимальным среди всех экспериментальных групп при сравнении с КГ. Наименьшие изменения числа макрофагов в ЭГ 2, по-видимому, обусловлены тем, что парикальцитол вводили после непосредственной сенсбилизацией SOD A. Таким образом, эффективность лиганд-ассоциированной активации VDR снижается на фоне уже активированных провоспалительных паттернов (увеличение уровня IL-1 β , TNF- α). Кроме того, не исключено влияние временного фактора, поскольку животные ЭГ 2 получали парикальцитол на протяжении 25 дней, в то время как в ЭГ 1 коррекция проводилась на протяжении 35 дней.

Среди всех изученных клеточных популяций, у которых наблюдалось уменьшение количества под действием парикальцитола, клетки CD68⁺ продемонстрировали наибольшую степень ингибирования. Так, количество CD68⁺ клеток в очаге гранулематозного воспаления снизилось в 1,96 раза в ЭГ 1 и в 1,46 раза в ЭГ 2 по сравнению с CD3⁺ клетками в соответствующих группах. Эти данные свидетельствуют о большой чувствительности макрофагов к действию парикальцитола по сравнению с Т-клетками.

Уменьшение количества CD68⁺ клеток в очаге гранулематозного воспаления может быть обусловлено как прямым, так и опосредованным действием. Поскольку макрофаги экспрессируют VDR [24; 25; 47], что согласуется с нашими данными ИГХ-исследования гранулематозного инфильтрата, парикальцитол может непосредственно воздействовать на них через лиганд-зависимую активацию VDR. Как показано в ряде исследований, витамин D может индуцировать слияние макрофагов, формируя гигантские клетки типа Пирогова-Лангханса и гигантские клетки инородных тел [165]. При слиянии 10-20 макрофагов может образоваться одна гигантская клетка по типу Пирогова-Лангханса в составе зрелой иммунной гранулемы, тогда как при слиянии около 100 макрофагов образуется одна гигантская клетка инородных тел [43; 175]. В частности, в ЭГ 1 и ЭГ 2 количество гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса увеличилось в 2,5 раза ($p = 0,006$) и 2 раза ($p = 0,03$) соответственно по сравнению с контролем, что указывает на

сохранение прямого эффекта парикальцитола на процесс слияния макрофагов. Это может быть связано с тем, что лиганд-ассоциированная активация VDR оказывает специфическое воздействие, вероятно, связанное с модуляцией экспрессии молекул адгезии (например, селектины, интегрины) и цитокинов, регулирующих процессы клеточной миграции и слияния [162].

Снижение общего количества макрофагов, экспрессирующих маркер CD68, одновременно с увеличением количества гигантских клеток подтверждает гипотезу о слиянии мембран под влиянием парикальцитола. Более того, значительное уменьшение количества макрофагов по сравнению КГ может свидетельствовать о разрешении иммунного воспаления. В частности, добавки витамина D снижают число CD68⁺ клеток в очаге воспаления и соответственно уменьшают воспалительный ответ [15]. Этот вывод подтверждается увеличением числа зрелых иммунных гранулём с выраженной капсулой в 4 раза в ЭГ 1 и 3 раза в ЭГ 2 по сравнению с КГ (в обоих случаях $p < 0,003$). Данный эффект наиболее выражен при введении парикальцитола на ранних стадиях иммунного ответа, особенно до введения антигена.

Помимо теории слияния клеточных мембран и образования гигантских клеток, можно выделить несколько возможных причин снижения количества макрофагов. Во-первых, макрофаги обладают более высокой экспрессией VDR по сравнению с Т-клетками [47], что подтверждается ИГХ-анализом гранулематозного инфильтрата. Это делает их более восприимчивыми к его лиганд-ассоциированной активации, что приводит к значительному снижению их численности. Во-вторых, VD может усиливать апоптоз макрофагов через активацию внутриклеточных каспазных сигнальных путей [33], способствующих программируемой клеточной смерти CD68⁺ клеток. Этот механизм подтверждается настоящим исследованием, где при окраске гематоксилином и эозином обнаружили апоптотические клетки в очаге иммунного воспаления на фоне применения парикальцитола. В-третьих, согласно новым данным 2025 года, VD может модулировать воспалительный ответ через глубокую эпигенетическую и транскрипционную перепрограммировку моноцитов [113], являющихся предшественниками макрофагов.

Еще одним механизмом является подавление экспрессии хемокинов, таких как CCL2, которые привлекают макрофаги в зону воспаления [150]. Наконец, VD переключает макрофаги с провоспалительного M1-фенотипа на противовоспалительный M2-фенотип [137; 258]. Возможно, уменьшение количества активных макрофагов в очаге воспаления связано с преимущественным снижением популяции макрофагов M1-фенотипа, что подтверждается уменьшением экспрессии мРНК гена IL-1 β , синтезируемого преимущественно макрофагами данного фенотипа.

С другой стороны, парикальцитол может оказывать опосредованное действие на макрофаги через систему ИКТ PD-L1/PD-1. Так, в ЭГ 1 и ЭГ 2 выявлено статистически достоверное увеличение экспрессии PD-L1 в 11 и 9 раз, соответственно (во всех случаях $p < 0,001$). Известно, что основная экспрессия белка PD-L1 отмечается преимущественно на АПК (макрофаги, ДК) [206].

Таким образом, увеличение экспрессии PD-L1 на поверхности макрофагов под действием парикальцитола может способствовать подавлению их активности через взаимодействие с PD-1, экспрессируемым Т-клетками [49; 98]. Этот вывод подтверждается данными иммуногистохимического исследования, согласно которым CD68⁺ клетки в очаге гранулематозного инфильтрата образовывали плотные клеточные ассоциации с Т-клетками, экспрессирующими маркер CD3.

Механизм стимуляции экспрессии PD-L1 VD на АПК остается неизвестным. Однако, внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за регуляцию этой экспрессии, изучены. Наиболее известный сигнальный путь опосредован IFN- γ , который активирует JAK1/JAK2, индуцирующие STAT1/STAT3, что в свою очередь активирует IRF1, стимулирующий транскрипцию белка PD-L1 [241]. Кроме того, экспрессия PD-L1 регулируется активностью фактора NF- κ B, активируемого провоспалительными цитокинами, такими как TNF- α и IL-1 β [255].

Дополнительно, экспрессия PD-L1 в иммунных клетках стимулируется через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [239; 250]. Также, VD способен модулировать внутриклеточные сигнальные пути, связанные с экспрессией PD-L1. В особенности, он усиливает активность STAT3 [78; 210], который является

известным положительным регулятором белка PD-L1 на антиген-представляющих клетках, что может способствовать косвенному усилению его экспрессии.

Несмотря на то, что VD обычно ингибирует NF- κ B [96; 103], в миелоидных клетках, производными которых являются ДК и моноциты, VD все еще может повышать уровень PD-L1 [68], вероятно, за счет компенсаторных путей STAT или IRF. Также известно, что витамин D может активировать PI3K/AKT в иммунных или эпителиальных клетках [139; 247]. Поскольку PI3K/AKT является положительным регулятором PD-L1, это может способствовать усилению его экспрессии.

Помимо этого, VD, регулируя экспрессию генов посредством VDREs [73; таких как STAT3, PI3K/AKT и IRF1, с возможным прямым контролем транскрипции и образованием нового сигнального пути VDR-VD/PD-L1/PD-1. Кроме воздействия на ось VDR-VD/PD-L1/PD-1, опосредованные эффекты на макрофаги могут осуществляться также посредством изменения цитокинового профиля.

Парикальцитол модулирует синтез цитокинов, таких как IL-1 β и IL-10, влияя на активность других клеток иммунной системы [147]. Значительное снижение количества CD68⁺ клеток ассоциировано с уменьшением экспрессии мРНК гена провоспалительного IL-1 β в 5,5 раза по сравнению с КГ ($p < 0,05$). Такое снижение экспрессии мРНК гена IL-1 β может быть обусловлено тем, что лиганд-ассоциированная активация VDR приводит к уменьшению числа активированных макрофагов, являющихся основными продуцентами IL-1 β , синтезирующими этот цитокин в ответ на флогогенные агенты [176]. Не исключено прямое действие на VDR-IKK β с последующим подавлением сигнального пути NF- κ B, что может дополнительно снижать экспрессию мРНК гена IL-1 β [255]. Интересно, что в остальных экспериментальных группах экспрессия мРНК гена IL-1 β также снижалась, однако, данное снижение не достигало статистической значимости. Это может быть связано с недостаточной дозой VD в условиях острого воспаления, что проявляется его дефицитом, который коррелирует с тяжестью воспаления [144], а также согласно исследованию Bader, ростом IL-1 β на фоне использования VD [31].

Активированные макрофаги также синтезируют провоспалительный цитокин TNF- α . Однако уровень экспрессии мРНК гена TNF- α не достигал статистической значимости ни в одной из экспериментальных групп. Это может быть обусловлено различиями в транскрипционной регуляции. Ген IL-1 β часто характеризуется менее «запланированным» (по типу «paused RNA polymerase») состоянием перед стимуляцией и требует де-ново рекрутинга транскрипционных факторов (например, NF- κ B, C/EBP), в то время как промотор гена TNF- α может находиться в заранее подготовленном состоянии с преднабором транскрипционных комплексов, что обеспечивает его быстрый, но менее изменчивый ответ на дополнительные стимулы, такие как парикальцитол [17]. Таким образом, в результате воздействия парикальцитола модуляция активности транскрипционных факторов будет оказывать более выраженное влияние на экспрессию IL-1 β , чем TNF- α . Кроме того, TNF- α имеет не столь значимое влияние на развитие гранулемы по сравнению с INF- γ [126].

Несмотря на значительное снижение количества CD68⁺ клеток, было отмечено, что парикальцитол стимулирует увеличение экспрессии мРНК гена противовоспалительного IL-10 в 2,18 раза в ЭГ 1 по сравнению с КГ ($p < 0,05$). Это значение оказалось наибольшим среди всех изучаемых групп. Данный эффект, вероятно, обусловлено тем, что VD снижает популяцию макрофагов за счет уменьшения преимущественно M1-фенотипа вследствие их поляризации и увеличения противовоспалительного M2-фенотипа, являющегося одним из основных продуцентов IL-10 [189]. В частности, VD может напрямую усиливать синтез цитокина IL-10, поскольку его ген является непосредственной мишенью для регуляторного действия VD [156]. Кроме того, значительное увеличение экспрессии мРНК гена IL-10 можно объяснить тем, что этот цитокин синтезируется и другими клетками (например, В-клетками), количество которых также увеличено свидетельствующими о противовоспалительном эффекте VD [150; 211], а также данными о влиянии макрофагов на Т-клетки [147]. В подтверждение этих наблюдений ИГХ-исследование показало, что CD68⁺ клетки образовывали тесные

клеточные ассоциации с Т-клетками, экспрессирующими маркер CD3 в очаге гранулематозного воспаления.

При этом Т-клетки способны напрямую активируют макрофаги посредством синтеза провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и TNF- α [249], играющих одну из ключевых ролей в их активации. Витамин D может косвенно влиять на макрофаги, подавляя сигнальные пути NF- κ B в Т-лимфоцитах, ответственные за синтез IL-1 β и TNF- α [18; 96]. Снижение уровня этих цитокинов может быть связано с непосредственным ингибированием активности Т-клеток, что, как следствие, приводит к уменьшению активности макрофагов. Это подтверждается снижением количества CD3⁺ клеток в очаге воспаления, которое сопровождалось уменьшением количества макрофагов при ИГХ-исследовании, а также снижением экспрессии мРНК гена IL-1 β , выявленным при генетическом анализе.

В ЭГ 3 было выявлено уменьшение макрофагов, экспрессирующих маркер в 1,9 раза по сравнению с КГ ($p = 0,0002$). Это свидетельствует о высокой чувствительности данной клеточной популяции к эффектам парикальцитола, поскольку животные этой группы получили наименьшую суммарную дозу препарата с момента введения разрешающей дозы SOD A, что обусловлено короткой продолжительностью эксперимента (15 дней). Более того, макрофаги стали одной из двух клеточных популяций, в которых были зафиксированы статистически значимые изменения во всех трех экспериментальных группах.

С другой стороны, в ЭГ 3 количество гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса, а также экспрессия PD-L1, IL-1 β и TNF- α изменились, но не достигали статистической значимости, что указывает на недостаточную лиганд-ассоциированную активацию VDR в иммунных клетках. В частности, в ЭГ 3 количество зрелых иммунных гранул не достигало статистической значимости. Это может быть связано с тем, что введение парикальцитола в разрешающую стадию иммунного ответа после контакта SOD A с сенсibilизированными Т-клетками приводит к снижению лиганд-ассоциированной активации VDR на иммунных клетках. В иммунологическую фазу стадии разрешения иммунного ответа данное явление может объясняться тем, что активация каскада

внутриклеточных провоспалительных сигнальных путей в $CD3^+$ клетках, запускаемых SOD A, хронологически опережает активацию внутриклеточных противовоспалительных сигнальных путей, связанных с лиганд-ассоциированной активацией VDR.

Парентеральное введение парикальцитола оказывало влияние не только на клетки врожденного иммунитета ($CD68^+$ клетки), но также и на клетки адаптивного иммунитета ($CD3^+$ и $CD20^+$ клетки). Количественные изменения со стороны Т-клеток, экспрессирующих пан-Т лимфоцитарный маркер CD3, демонстрировали однонаправленную динамику приобретенного иммунитета, проявляющуюся снижением их количества на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR. Данные изменения наблюдали во всех экспериментальных группах, кроме ЭГ 3.

В ЭГ 1 и ЭГ 2 количество $CD3^+$ клеток уменьшилось на 13,3 % и 10,8 % соответственно по сравнению с КГ (в обоих случаях $p = 0,02$). Интересно, что введение парикальцитола до сенсibilизации SOD A показало более выраженные количественные изменения со стороны макрофагов и Т-клеток по сравнению с ЭГ 2, получавшей парикальцитол после первичного контакта с антигеном. Вероятно, такая динамика обусловлена тем, что сенсibilизированные Т-клетки, прошедшие предварительную коррекцию, становятся более чувствительны к влиянию VD. Таким образом, эффективность лиганд-ассоциированной активации VDR выражена ярче на фоне еще не активированных провоспалительных паттернов (например, повышенного уровня $IL-1\beta$). Также не исключено влияние временного фактора, поскольку животные ЭГ 1 получали парикальцитол в течении 35 дней, в то время как коррекция в ЭГ 2 проводилась на протяжении 25 дней.

Уменьшение количества $CD3^+$ клеток в очаге иммунного гранулематозного воспаления может быть обусловлено как прямым, так и опосредованным действием витамина D. Поскольку Т-клетки экспрессируют VDR [25; 220], парикальцитол может непосредственно воздействовать на них через лиганд-ассоциированную активацию VDR.

С другой стороны, VD может оказывать косвенное влияние на $CD3^+$ клетки через ось VDR-VD/PD-L1/PD-1, так как он ингибирует Т-клетки, экспрессирующие

PD-1 [49; 85; 98]. Уменьшение числа $CD3^+$ клеток в ЭГ 2 может быть не только разницей во временных факторах, но и статистически значимым увеличением числа $CD1a^+$ клеток в ЭГ 2, которые, как и макрофаги, экспрессируют ($p < 0,001$) на фоне увеличения IL-10 также могло способствовать снижению активности Т-клеток, что объясняет сокращение их численности в очаге [117; 196]. Взаимодействие макрофагов и ДК с Т-клетками подтверждается результатами ИГХ-исследования, в рамках которого выявлено, что $CD68^+$ и $CD1a^+$ клетки формировали тесные клеточные ассоциации с $CD3^+$ клетками.

Наибольшее снижение количества $CD3^+$ клеток в ЭГ 1 может быть обусловлено противовоспалительным действием VD, опосредованным IL-10, который продуцируют Th2-клетки [45] и Treg-лимфоциты [131]. С учётом того, что Th2-клетки вместе с Т-супрессорами контролируют избыточную функцию Th1 и Th17-популяций, падающее число $CD3^+$ клеток можно объяснить преимущественным сокращением именно этих двух популяций клеток. Т-лимфоциты реагируют на VD непосредственно через VDR–VD и через посредничество антиген-презентирующих клеток, что обеспечивает смещение иммунного равновесия Th1/Th2 в сторону противовоспалительного Th2-ответа

В ЭГ 3 количество $CD3^+$ клеток не достигло статистической значимости, что свидетельствует о снижении их чувствительности к парикальцитолю после повторного контакта с SOD A. Это может быть связано с тем, что разрешающая доза SOD A активирует внутриклеточные сигнальные пути, блокирующие или ингибирующие противовоспалительные лиганд-ассоциированные пути активации VDR. Это подтверждается отсутствием значимых изменений в экспрессии IL-1 β , TNF- α и PD-L1, а также соответствующим отсутствием активации внутриклеточной оси VDR-VDR-PD-L1/PD-1 на Т-клетках на фоне введения парикальцитола, что в итоге проявляется отсутствием созревания гранулем. Кроме того, уровень экспрессии PD-L1 отрицательно коррелировал с числом незрелых иммунных гранулем.

Количественные изменения числа $CD20^+$ клеток отражали состояние

гуморальной иммунной системы в очаге гранулематозного воспаления. Как известно, VD влияет не только на компоненты клеточного иммунитета, но также влияет на клетки гуморального иммунитета [37]. Аналогично CD68⁺ клеткам, они демонстрировали однонаправленную динамику во всех экспериментальных группах. Однако, в отличие от них, количество CD20⁺ клеток было повышено на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR.

В ЭГ 1 количество В-клеток, экспрессирующих маркер CD20, увеличилось в 7 раз ($p < 0,0001$), в ЭГ 2 – в 17 раз ($p = 0,0004$) и в ЭГ 3 – в 3 раза ($p = 0,03$) по сравнению с КГ, что свидетельствует о том, что парикальцитол способствует их активации и пролиферации. Такое увеличение, вероятно, обусловлено как косвенным, так и прямым влиянием парикальцитола на В-лимфоциты в очаге саркоидоз-подобного воспаления.

Косвенное влияние лиганд-ассоциированной активации VDR на В-лимфоциты может осуществляться через Т-клеточно-зависимые или Т-клеточно-независимые сигналы активации, поскольку они способны стимулировать В-клетки в условиях ограниченного количества клеток [154]. Эти данные подтверждаются ИГХ-исследованием гранулематозного инфильтрата экспериментальных групп, которое показало тесные клеточные контакты между и CD3⁺ клетками на периферии зрелых иммунных гранул. В-лимфоциты, вероятно, рекрутируются из периферической крови и костного мозга [53] для выработки антител и интерлейкинов, координирующих иммунный ответ, что способствует устранению антигена и влияет на созревание гранулемы [56].

Существенное увеличение количества В-клеток в 17 раз по сравнению с КГ указывает на заметное усиление их активности и активацию гуморального иммунного ответа ($p < 0,0001$). Резкое увеличение количества CD20⁺ клеток в ЭГ 2 говорит о том, что не только клеточный, но и гуморальный иммунитет играет важную роль в патогенезе гранулемы, особенно при первой встрече с антигеном.

Несмотря на то, что опосредованное влияние VD может быть связано с прямым ингибированием Т-клеток и снижением секреции IL-2 и IFN- γ , что приводит к подавлению активности, пролиферации и дифференцировки В-клеток,

а также к их апоптозу [87; 132], в ЭГ 1 и ЭГ 2 было обнаружено увеличение CD20⁺ клеток на фоне значимого снижения CD3⁺ клеток. Возможно, это связано со сдвигом баланса субпопуляций Т-клеток в пользу Th2 при воздействии парикальцитола, поскольку Th2-клетки синтезируют цитокины, активирующие В-клетки [48], а также с массовой миграцией CD20⁺ клеток в область воспаления.

Незначительное увеличение числа CD20⁺ клеток (в 3 раза) по сравнению с ЭГ 1 и ЭГ 2 (в 17 и 7 раз, соответственно) может быть связано с меньшей суммарной дозой и длительностью введения парикальцитола, а также их активацией на фоне уже активированных провоспалительных паттернов после повторного контакта с антигеном. С другой стороны, это может свидетельствовать о высокой чувствительности В-клеток к парикальцитолу, поскольку это единственная клеточная популяция, которая показала статистически значимое увеличение после введения разрешающей дозы SOD A.

Витамин D может оказывать непосредственное влияние на CD20⁺ клетки, способные синтезировать IL-10 [65; 100]. Кроме того, VD может напрямую усиливать экспрессию IL-10, поскольку ген данного цитокина является его непосредственной мишенью [156]. Это подтверждается увеличением уровня экспрессии мРНК гена IL-10 во всех экспериментальных группах, аналогично динамике CD20⁺ клеток: в ЭГ 1 экспрессия мРНК гена IL-10 увеличилась в $p < 0,05$).

При наличии общих изменений со стороны иммунокомпетентных клеток в отдельных экспериментальных группах выявлены особые внутригрупповые различия, которые могут быть обусловлены специфическими биологическими, иммунологическими или генетическими факторами. В частности, только в ЭГ 2 зарегистрированы уникальные количественные изменения со стороны ДК, экспрессирующих маркер CD1a⁺, что свидетельствует о селективном воздействии парикальцитола на определенные компоненты иммунной системы через лиганд-ассоциированную активацию VDR. Кроме того, выявлено значимое снижение экспрессии мРНК гена IL-1 β исключительно в ЭГ 1.

Значимым результатом в ЭГ 2 стало увеличение числа CD1a⁺ клеток в 3,67 раза по сравнению с КГ ($p = 0,002$), что может свидетельствовать об активации антигенпрезентирующей функции ДК в момент сенсibilизации SOD A на фоне введения парикальцитола. В этой же группе количество CD68⁺ клеток было, наоборот, снижено в 1,64 раза по сравнению с КГ ($p = 0,0009$), что указывает на преобладание роли эпидермальных ДК над макрофагами в процессах сенсibilизации и отражает модуляцию врожденного иммунного ответа, где VD способствует дифференцировке и активации ДК в очаге воспаления [44].

Иммуногистохимический анализ выявил тесные ассоциации между CD1a⁺ и клетками в центральной области зрелой иммунной гранулемы, а также между CD3⁺ клетками, локализованными на периферии гранулёмы. Эти изменения наиболее выражены в ЭГ 2 по сравнению с ЭГ 1. Активированные ДК обладают большей эффективностью в стимулировании Т-лимфоцитов, чем макрофаги [66; 121], что подтверждается незначительным снижением числа CD3⁺ клеток в ЭГ 2.

Отсутствие значимых изменений количества ДК в ЭГ 1 свидетельствует о том, что до стадии сенсibilизации (первого контакта с SOD A) парикальцитол не оказывает существенного влияния на их антигенпрезентирующую функцию, поскольку на данной стадии клетки не фагоцитируют антиген [66; 121]. Аналогичные изменения зарегистрированы и в ЭГ 3, что, вероятно, связано с неизменным цитокиновым профилем, недостаточным для активации ДК. Так, в ЭГ 3 отмечали отсутствие статистически значимых изменений экспрессии мРНК генов IL-1 β и TNF- α , являющихся ключевыми цитокинами в активации дендритных клеток [112; 158].

Значительное снижение экспрессии мРНК гена IL-1 β , наблюдаемое исключительно в ЭГ 1, может быть обусловлено как прямым, так и косвенным влиянием парикальцитола. Предполагается, что прямой эффект связан с подавлением гена, являющегося потенциальной мишенью витамина D, однако данный механизм требует дополнительного подтверждения.

Косвенный эффект может быть обусловлен уменьшением числа активированных макрофагов – основных продуцентов IL-1 β [176]. Отсутствие

значимых изменений во второй и третьей экспериментальных группах, вероятно, объясняется различной длительностью введения парикальцитола – 35 дней в ЭГ 1, 25 дней в ЭГ 2 и 15 дней в ЭГ 3.

Суммарно все изменения со стороны клеток, интерлейкинов и ИКТ вызвали характерные структурные изменения гранулёмы. Так, на 35-е сутки эксперимента зафиксировано статистически достоверное увеличение количества зрелых иммунных гранулём. У животных ЭГ 1 и ЭГ 2, увеличение зрелых иммунных гранулём составило в 4 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем (в обоих случаях, $p < 0,003$), тогда как у животных ЭГ 3 статистически достоверных различий по сравнению с контрольной группой выявлено не было ($p = 0,11$).

Созревание иммунных гранулём может указывать на иммуномодулирующий эффект парикальцитола, опосредованный воздействием на межклеточные взаимодействия в очаге воспаления, которые определялись временным фактором и стадией аллергической реакции.

Во-первых, парикальцитол способствовал увеличению экспрессии PD-L1, которая коррелировала с созреванием иммунных гранулём (отсутствие экспрессии в третьей экспериментальной группе сопровождалось отсутствием созревания иммунных гранулём).

Во-вторых, парикальцитол вызвал однонаправленные изменения: с одной стороны – увеличение количества гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса, а также CD1a⁺ и CD20⁺ клеток; с другой – снижение количества CD3⁺ и CD68⁺ клеток.

В-третьих, парикальцитол изменил поляризацию цитокинового профиля посредством увеличения экспрессии мРНК гена противовоспалительного IL-10 и уменьшения экспрессии провоспалительного IL-1 β .

Общая патофизиологическая картина межклеточных взаимодействий в очаге гранулематозного иммунного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR представлена на Рисунке 4.3.

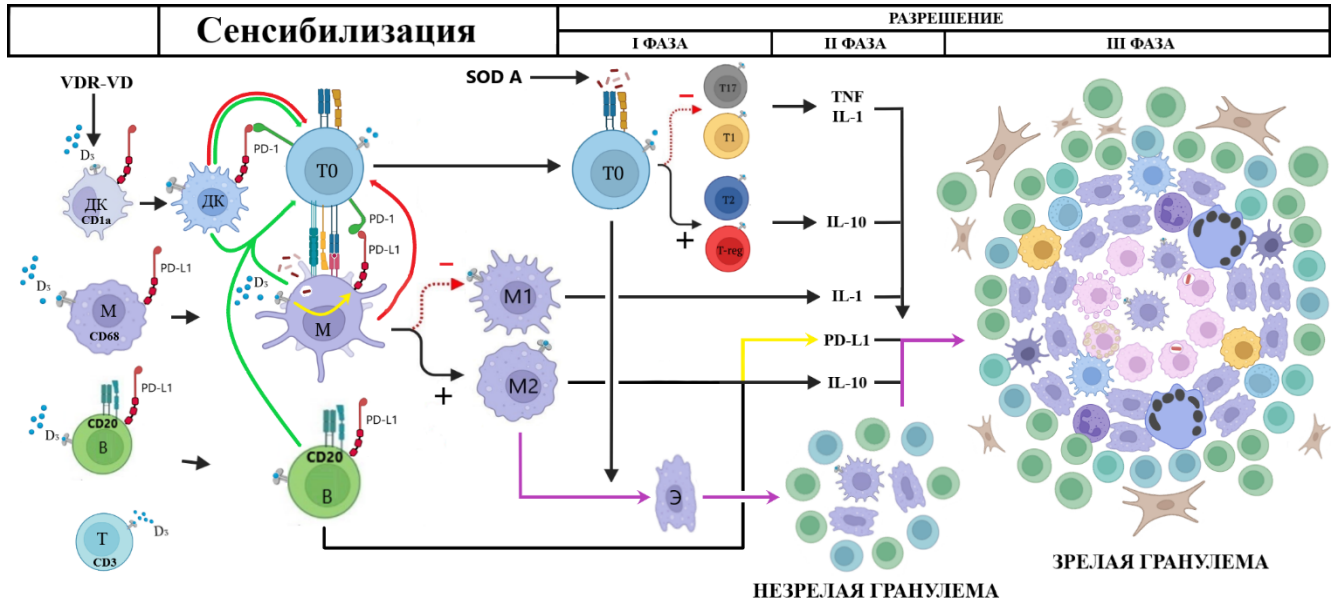


Рисунок 4.3 – Межклеточные взаимодействия в очаге иммунного гранулематозного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR.

Примечание: Т, Т0, Т1, Т2, Т17 и Т-reg – субпопуляции Т-клеток, В – В-клетка, М, М1 и М2 – субпопуляции макрофагов, ДК – дендритная клетка, Э – эпителиоидная клетка, ГК – гигантская клетка по типу Пирогова-Лангханса, Желтая стрелка – ось VDR-VD/PD-L1, Красная стрелка – провоспалительные пути, которые уменьшает парикальцитол, Зеленая стрелка – противовоспалительные пути, которые увеличивает парикальцитол, Фиолетовая стрелка - трансформация иммунной гранулемы, Черная стрелка – межклеточные трансформации и взаимодействия, SOD A – супероксиддисмутаза А, знак «+» – увеличение клеток, знак «-» – уменьшение клеток

Проведённое исследование направлено на изучение влияния парикальцитола – активного аналога VD – на иммунные процессы в условиях гранулематозного воспаления. Основное внимание уделялось оценке лиганд-ассоциированной активации рецептора VDR и её влияния на клеточный состав иммунного инфильтрата, выраженность иммунных контрольных точек и цитокиновый профиль. В частности, исследование охватывало количественную оценку таких клеточных популяций, как макрофаги (CD68⁺), ДК (CD1a⁺), Т-клетки (CD3⁺), В-клетки (CD20⁺), а также анализ изменений экспрессии PD-L1, IL-10, IL-1 β и TNF- α

в различных экспериментальных группах с различными режимами введения препарата.

Экспериментальные данные показали, что введение парикальцитола значительно влияет на морфогенез и структурную организацию иммунной гранулемы. В группе, получавшей препарат до сенсibilизации (ЭГ 1), выявили наиболее выраженное снижение численности CD68⁺ клеток, что свидетельствует о высокой восприимчивости клеток с выраженной экспрессией VDR к действию парикальцитола. Одновременно наблюдалось снижение количества CD3⁺ клеток, что может быть, как прямым результатом воздействия препарата через активацию VDR, так и косвенным эффектом, обусловленным увеличением экспрессии иммунного контрольного белка PD-L1. Повышение уровня PD-L1, коррелирующего с созреванием иммунных гранулём, указывает на возможное развитие компенсаторного механизма, направленного на подавление чрезмерного воспалительного ответа и предотвращение разрушительной активности Т-клеток.

Кроме того, существенное увеличение численности CD20⁺ клеток во всех экспериментальных группах подчёркивает важную роль гуморального иммунитета в патогенезе иммунной гранулемы. Такая динамика, наряду с ростом экспрессии мРНК гена противовоспалительного цитокина IL-10 и одновременным снижением экспрессии мРНК гена провоспалительного цитокина IL-1 β подчёркивает выраженность иммуномодулирующего эффекта парикальцитола. Увеличение зрелых гранулём свидетельствует о том, что препарат способствует не только количественному изменению клеточных популяций, но и качественному модифицированию процессов клеточного слияния и формирования структурного иммунного инфильтрата.

Активация VDR может приводить к изменению экспрессии широкого спектра генов, затрагивая такие сигнальные пути, как STAT3, NF- κ B и PI3K/AKT. Увеличение экспрессии PD-L1 может служить ключевым механизмом регуляции активности АПК и Т-клеток в очаге воспаления, способствуя снижению интенсивности провоспалительного ответа. Эти данные демонстрируют потенциал парикальцитола в качестве инструмента для профилактики и терапии

аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний, поскольку оптимальное введение препарата, особенно на ранних стадиях формирования воспаления, позволяет достигать более выраженного иммуномодулирующего эффекта.

Важной особенностью исследования является зависимость эффективности иммуно-модулирующего действия от временного режима терапии. Результаты показывают, что предварительное введение парикальцитола до сенсibilизации обеспечивает наиболее стабильный противовоспалительный эффект: наблюдается существенное снижение экспрессии показателей воспаления, коррекция клеточного состава инфильтрата и нормализация цитокинового баланса. В то же время, применение препарата в поздних стадиях иммунного ответа приводит к менее выраженной регуляции, что, вероятно, обусловлено уже активными провоспалительными сигнальными каскадами.

Полученные данные открывают перспективу для дальнейшего изучения молекулярных механизмов взаимодействия витамина D, его активных аналогов и иммунных контрольных точек. Рекомендуется проведение дополнительных исследований, направленных на:

1. Детальное изучение влияния генетического полиморфизма гена VDR на чувствительность клеток к действию парикальцитола.
2. Анализ комбинированного применения парикальцитола с другими иммуно-модулирующими препаратами для оценки синергических эффектов.
3. Разработку оптимальных схем и дозовых режимов для достижения максимального терапевтического эффекта при лечении аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний.

На основании представленных экспериментальных данных можно сделать вывод, что лиганд-ассоциированная активация VDR посредством введения парикальцитола оказывает значимое иммуномодулирующее действие. Препарат способен:

1. Снижать количество макрофагов и Т-лимфоцитов;
2. Стимулировать экспрессию иммунного контрольного белка PD-L1;

3. Сдвигать баланс иммунного ответа в сторону гуморального с повышением активности В-лимфоцитов;

4. Увеличивать экспрессию мРНК гена противовоспалительного цитокина IL-10 и уменьшать провоспалительный цитокин IL-1 β ;

5. Индуцировать созревание гранулем, что свидетельствует о преобладании процессов репарации и нивелировании воспаления.

Учитывая ограниченность экспериментальных данных и понимание механизмов действия на клеточном и тканевом уровнях, это исследование следует рассматривать как пилотное исследование иммуномодулирующего действия парикальцитола на гранулематозное воспаление. Следует отметить ряд ограничений данного исследования. Во-первых, экспериментальная модель, основанная на образовании подкожной гранулемы, может не в полной мере воспроизводить сложность и микроокружение гранулематозных заболеваний. Во-вторых, хотя исследование продемонстрировало значительное влияние парикальцитола на созревание гранулем и иммунную модуляцию, механизмы действия, в частности связь между активацией VDR и повышением уровня PD-L1, скорее предположительны, чем выяснены непосредственно с помощью молекулярных анализов. В-третьих, данное исследование было сосредоточено на оценке отдельных иммунных маркеров (CD68, CD1a, CD3, CD20 и PD-L1) с использованием поликлональных антител, а также на оценке ограниченного набора цитокинов (IL-1 β , IL-10, TNF- α), в то время как другие значимые цитокины и молекулы иммунных контрольных точек, способные влиять на гранулематозное воспаление, остались вне рамок анализа. Для более глубокого понимания механизмов, лежащих в основе эффекта парикальцитола, необходимы дальнейшие исследования, включающие оценку более широкого спектра субпопуляций иммунных клеток (например, с использованием проточной цитометрии) и цитокинов, а также анализ их функциональной активности и фенотипических характеристик.

Таким образом, формирование и созревание иммунной гранулемы представляет собой комплексный и динамический процесс, определяемый

синергизмом и антагонизмом межклеточных взаимодействий, регулируемых парикальцитолом. Оптимизация времени введения и дозировки парикальцитола выступает ключевым фактором в достижении устойчивого противовоспалительного эффекта, что имеет высокую клиническую значимость для терапии воспалительных заболеваний. Полученные результаты подтверждают потенциал применения витамина D и его аналогов в качестве таргетных иммуномодулирующих средств, что открывает новые пути для развития персонализированной медицины в области иммунологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования впервые было проведено фенотипическое исследование распределения клеточных популяций в очаге SOD A-индуцированного иммунного гранулематозного воспаления, включая CD1a⁺, CD3⁺, CD20⁺, CD68⁺ и PD-L1⁺ клетки, на фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D. В частности, были изучены особенности экспрессии мРНК провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Продемонстрировано, что искусственно синтезированная микробная супероксиддисмутаза A достоверно вызывает развитие саркоидоз-подобного воспаления, которое, согласно данным литературы, можно считать эталоном экспериментального гранулематозного воспаления. С целью индуцирования саркоидоз-подобного воспаления была создана периферическая (интрадермальная) модель SOD A-инициированного иммунного гранулематозного воспаления путём модификации более ранней модели саркоидоза лёгких.

В ходе проведенного исследования была изучена лиганд-ассоциированная активация VDR и ее влияние на морфогенез иммунного гранулематозного воспаления. Результаты эксперимента показали, что парикальцитол, синтетический аналог VD, оказывает значительное влияние на клеточный состав и цитокиновый профиль в условиях гранулематозного воспаления, индуцированного SOD A.

Исследование подтвердило, что парикальцитол способствует созреванию иммунных гранул, увеличивая количество зрелых гранул и гигантских клеток по типу Пирогова-Лангханса. Он также влияет на распределение и активность Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и ДК, а также способствует сдвигу цитокинового профиля в противовоспалительную сторону, что способствует уменьшению негативных последствий воспаления. Исследования показали, что наиболее значительные изменения наблюдались не только в клеточном иммунитете, но и в гуморальном иммунитете, что коррелировало с формированием зрелых иммунных гранулём.

Введение парикальцитола до и во время сенсibilизации SOD A продемонстрировало более выраженный противовоспалительный эффект по сравнению с введением после введения разрешающей дозы SOD A.

Показано наличие положительной связи между лиганд-ассоциированной активацией рецепторов витамина D и белков иммунных контрольных точек (PD-L1) в очаге гранулематозного воспаления. В мировой литературе имеется крайне ограниченное количество исследований, посвященных данным результатам.

Мы считаем, что модифицированная нами модель иммунного воспаления может быть использована для других исследований. Результаты исследования подчеркивают важность синтетического агониста витамина D как потенциального иммуномодулятора, способного влиять на патогенез иммунных заболеваний и открывают новые горизонты для разработки терапевтических стратегий на основе парикальцитола, особенно в качестве профилактического лекарственного средства.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе представлено теоретическое обобщение результатов, касающихся закономерностей морфогенеза экспериментально индуцированного гранулематозного воспаления у крыс в условиях парентерального введения парикальцитола.

1. Интрадермальное введение синтетического пептида супероксиддисмутазы А крысам способствует развитию диффузного саркоидоз-подобного гранулематозного воспаления с преобладанием CD68⁺ и CD3⁺ клеток.

2. На фоне саркоидоз-подобного воспаления парентеральное введение парикальцитола приводит к структурно-функциональным преобразованиям в очаге гранулематозного воспаления, с тенденцией к созреванию иммунной гранулемы за счет эпителиоидной и гигантоклеточной трансформации с уменьшением доли клеток макрофагального (CD68⁺) и лимфоидного ряда (CD3⁺).

3. Во всех группах выявлена выраженная экспрессия рецепторов витамина D во всех ключевых популяциях клеток иммунного воспаления. Установлена значимая положительная связь между экспрессией белка PD-L1 и лиганд-ассоциированной активацией рецепторов витамина D, особенно в экспериментальных группах 1 и 2 – в 11 и 9 раз, соответственно (во всех случаях, $p < 0,0001$).

4. На фоне лиганд-ассоциированной активации рецепторов витамина D выявлено увеличение относительной экспрессии мРНК генов противовоспалительного IL-10 во всех экспериментальных группах (в среднем в 1,62 раза, $p = 0,05$), со значительным снижением экспрессии мРНК гена IL-1 β в экспериментальной группе 1 в 5,5 раза ($p = 0,05$); изменение экспрессии мРНК гена TNF- α во всех группах оказалось статистически недостоверным.

5. Структурно-функциональные преобразования в очаге саркоидоз-подобного гранулематозного воспаления при парентеральном введении парикальцитола до и во время сенсibilизации супероксиддисмутазой А носят

наиболее выраженный характер. Изменения характеризуются увеличением количества зрелых иммунных гранул (в 4 и 3 раза в экспериментальных группах 1 и 2 соответственно, $p = 0,003$), изменением их клеточного состава (уменьшение $CD68^+$ и $CD3^+$ клеток, увеличение гигантских и $CD20^+$ клеток) и цитокинового профиля (увеличение экспрессии мРНК гена $IL-10$ и уменьшение экспрессии мРНК гена $IL-1\beta$), выраженной реакцией сосудов микроциркуляторного русла и разрастанием фиброзной капсулы.

6. Внутрив брюшное введение парикальцитола оказывает иммуномодулирующее воздействие на морфогенез иммунной гранулемы с изменением распределения популяций клеток макрофагального и лимфоидного ряда, увеличением экспрессии PD-L1 и сдвигом цитокинового профиля в противовоспалительную сторону. Эти особенности действия парикальцитола объясняют выявленные структурно-функциональные преобразования в очаге воспаления и различия между группами и схемами введения. Полученные данные подчёркивают важность витамина D (парикальцитола) как потенциального терапевтического средства для коррекции негативных последствий иммунного воспаления, особенно на этапе профилактики.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перспективы дальнейших исследований связаны с углублённым изучением парикальцитола как иммуномодулятора при гранулематозных и аутоиммунных процессах. Особое внимание следует уделить раннему применению препарата в фазе сенсibilизации, оптимизации дозировок и схем введения, а также комплексной оценке его влияния на цитокиновый профиль и морфологические характеристики гранулём. Важным направлением остаётся разработка экспериментальных моделей саркоидоз-подобного воспаления для тестирования аналогов витамина D и анализа механизмов межклеточной интеграции. Дополнительно перспективным является включение иммуногистохимической оценки PD-L1 и VDR в диагностические протоколы, что позволит сочетать молекулярный мониторинг с морфологическим контролем эффективности терапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Оптимизация схем введения парикальцитола.

Введение препарата на ранних стадиях воспаления способствует созреванию гранулем и снижению активности провоспалительного $IL-1\beta$.

Рекомендуется использовать дозу 200 нг/животное как эффективную для достижения противовоспалительного эффекта без признаков токсичности.

. Разработка экспериментальных моделей.

Модифицированная модель SOD A-индуцированного саркоидоз-подобного воспаления может быть использована для дальнейших исследований иммуномодуляторов. Рекомендуется применять данную модель для оценки новых аналогов витамина D и изучения механизмов межклеточной интеграции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПК – антиген представляющие клетки

АТ – антитело

БАВ – биологически активные вещества

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ДК – дендритная клетка

ИГХ – иммуногистохимия

ИКТ – иммунные контрольные точки

КГ – контрольная группа

ПКАТ – поликлональное антитело

ЭГ – экспериментальная группа

CD – кластер дифференциации (cluster of differentiation)

DBP – витамин D-связывающий протеин (vitamin D-binding protein)

IFN- γ – интерферон- γ (interferon- γ)

PD-L1 – программируемый лиганд смерти-1 (programmed death ligand-1)

SOD A – супероксиддисмутаза A (superoxide dismutase A)

TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

VD – витамин D (vitamin D)

VDR – рецептор витамина D (vitamin D receptor)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азизова Н. Д., Алиева Н. Р., Ахмедова Д. И. и др. Витамин D: от простого к сложному : монография / под ред. Е. И. Кондратьевой, Е. В. Лошковой. – Москва : Пресстайм Плюс, 2024. – 431 с.
2. Атлас белков человека (The Human Protein Atlas). Tissue expression of VDR [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111424-VDR/tissue> (дата обращения: 25.05.2025). – Дата обновления базы: октябрь 2024.
3. Головатюк К. А., Лагутина Д. И., Михайлова А. А. et al. 100 лет витамину D. Уровень обеспеченности витамином D в пандемию новой коронавирусной инфекции // Российский журнал персонализированной медицины. – 2022. – Т. 2, No 6. – С. 33–41. – DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-33-41.
4. Громова О. А., Торшин И. Ю. Витамин D : смена парадигмы : 2-е изд., перераб. и доп. / О. А. Громова, И. Ю. Торшин ; под ред. Е. И. Гусева, И. Н. Захарова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 736 с.
5. Джелен Б. Сводные таблицы в Microsoft Excel 2021 и Microsoft 365: перевод с английского / А. Ю. Гинько. – Москва: DMK Press, 2023. – 554 с. – ISBN 978-5-93700-127-6.
6. Каронова Т. Л., Андреева А. Т., Головатюк К. А. et al. Инфицированность SARS-CoV-2 в зависимости от уровня обеспеченности витамином D // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67, No 5. – С. 20–28. – DOI: 10.14341/probl12820.
7. Каронова Т. Л., Головатюк К. А., Михайлова А. А. et al. Результаты третьего этапа первого российского многоцентрового неинтервенционного регистрового исследования по изучению частоты дефицита и недостаточности витамина D в Российской Федерации у взрослых // Остеопороз и остеопатии. – 2023. – Т. 26, No 1. – С. 13–23. – DOI: 10.14341/osteo12964.

8. Мальцев С. В. Современные аспекты применения витамина D в клинической практике // Российский медицинский журнал. Мать и дитя. – 2022. – Т. 5, No 3. – С. 244–252. – DOI: 10.32364/2618-8430-2022-5-3-244-252.
9. РЛСнет [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://rlsnet.ru> (дата обращения: 01.06.2025).
10. Снопов С. А. Механизмы действия витамина D на иммунную систему // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 6. – С. 499–530.
11. Соловьёв В. И. Анализ данных в экономике: теория вероятностей, прикладная статистика, обработка и анализ данных в Microsoft Excel: учебник / В. И. Соловьёв. – Москва: Кнорус, 2023. – 497 с. – ISBN 978-5-406-10701-0.
12. Стекольников А. А., Щербаков Г. Г., Яшин А. В. Лабораторные животные: учебное пособие для вузов / А. А. Стекольников, Г. Г. Щербаков, А. В. Яшин. – 2-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 316 с. – (Серия «Ветеринария»). – ISBN 978-5-8114-8129-3.
13. Abhiraman G. C., Householder K. D., Rodriguez G. E. et al. Redirecting Immune Signaling with Cytokine Adaptors // Nature Communications. – 2025 Mar 11. – Vol. 16, No 1. – P. 2432. – DOI: 10.1038/s41467-025-57681-1.
14. Abiri B., Sarbakhsh P., Vafa M. Randomized study of the effects of vitamin D and/or magnesium supplementation on mood, serum levels of BDNF, inflammation, and SIRT1 in obese women with mild to moderate depressive symptoms // Nutritional Neuroscience. – 2022 Oct. – Vol. 25, No 10. – P. 2123–2135. – DOI: 10.1080/1028415X.2021.1945859.
15. Abu-Elnasr Awwad A., Hasan R. A., Hablas M. G. A. et al. Impact of vitamin D in children with chronic tonsillitis (immunohistochemical study of CD68 polarisation and proinflammatory cytokines estimation) // Scientific Reports. – 2023 May 17. – Vol. 13, No 1. – P. 8014. – DOI: 10.1038/s41598-023-33970-x.
16. Acar S., Özkan B. Vitamin D metabolism [Электронный ресурс] // Vitamin D. – London : IntechOpen, 2021. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97180> (дата обращения: 01.06.2025).

17. Adelman K., Lis J. T. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans // *Nature Reviews Genetics*. – 2012 Oct. – Vol. 13, No 10. – P. 720–731. – DOI: 10.1038/nrg3293.
18. Ađar M., Gungör K., Gungör N. D. et al. Vitamin D supplementation inhibits NF- κ B signaling pathway in lean and obese women with PCOS // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2022 Jun. – Vol. 26, No 11. – P. 3973–3977. – DOI: 10.26355/eurrev_202206_28967.
19. Ahmad N., Ansari S. A., Aleysae N. A. et al. Hereditary Vitamin D Resistant Rickets (HVDRR) Case Series: Phenotype, Genotype, Conventional Treatment, and Adjunctive Cinacalcet Therapy // *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*. – 2024. – Vol. 30, No 2. – P. 74–80. – DOI: 10.5114/pedm.2024.139367.
20. Ahmadzadeh K., Vanoppen M., Rose C. D. et al. Multinucleated Giant Cells: Current Insights in Phenotype, Biological Activities, and Mechanism of Formation // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022 Apr 11. – Vol. 10. – P. 873226. – DOI: 10.3389/fcell.2022.873226.
21. Akimbekov N. S., Digel I., Sherkhan D. K. et al. Vitamin D and Phosphate Interactions in Health and Disease // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2022. – Vol. 1362. – P. 37–46. – DOI: 10.1007/978-3-030-91623-7_5.
22. Al Shoyaib A., Archie S. R., Karamyan V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should It Be Used in Experimental Animal Studies? // *Pharmaceutical Research*. – 2019 Dec 23. – Vol. 37, No 1. – P. 12. – DOI: 10.1007/s11095-019-2745-x.
23. Amer J., Salhab A., Hussini E. et al. Osteopontin neutralization increases vitamin D receptors on NKT cells and ameliorates liver fibrosis by promoting their activity // *Frontiers in Pharmacology*. – 2024 Nov 25. – Vol. 15. – Article 1484278. – DOI: 10.3389/fphar.2024.1484278.
24. Ao T., Kikuta J., Ishii M. The effects of vitamin D on immune system and inflammatory diseases // *Biomolecules*. – 2021 Nov 3. – Vol. 11, No 11. – Article 1624. – DOI: 10.3390/biom11111624.

25. Arora J., Wang J., Weaver V. et al. Novel insight into the role of the vitamin D receptor in the development and function of the immune system // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2022 May. – Vol. 219. – Article 106084. – DOI: 10.1016/j.jsbmb.2022.106084.
26. Aslam J., Sohailuddin M., Abbas S. M. et al. The Schematic Assessment of Vitamin D Deficiency in Relation to Autoimmune Disorders and Its Implications in Internal Medicine // *Cureus*. – 2025 Apr 24. – Vol. 17, No 4. – P. e82949. – DOI: 10.7759/cureus.82949.
27. Athanassiou L., Kostoglou-Athanassiou I., Koutsilieris M. et al. Vitamin D and Autoimmune Rheumatic Diseases // *Biomolecules*. – 2023 Apr 21. – Vol. 13, No 4. – P. 709. – DOI: 10.3390/biom13040709.
28. Axis Sp. z o.o. Руководство пользователя: весы серии ACN [Электронный ресурс]. – Гданьск: Axis Sp. z o.o., 2024. – PDF-файл. – Режим доступа: <https://www.axis.pl/en/module/lyofilemanager/index.php?fc=module&module=lyofilemanager&controller=documents&getDocument=1&id=382> (дата обращения: 25.05.2025).
29. Ayadi S., Ayari M., Bahlous A. et al. Prevalence and Risk Factors for Vitamin D Deficiency in Crohn Disease Patients: A Tunisian Study [French] // *Tunis Med.* – 2023 Dec 5. – Vol. 101, No 12. – P. 907–911. – PMID: 38477199.
30. Aygun H. Vitamin D can reduce severity in COVID-19 through regulation of PD-L1 // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2022. – Vol. 395, No 4. – P. 487–494. – DOI: 10.1007/s00210-022-0221.
31. Bader D. A., Abed A., Mohammad B. A. et al. The effect of weekly 50,000 IU vitamin D3 supplements on the serum levels of selected cytokines involved in cytokine storm: a randomized clinical trial in adults with vitamin D deficiency // *Nutrients*. – 2023 Feb 27. – Vol. 15, No 5. – P. 1188. – DOI: 10.3390/nu15051188.
32. Baeza C., Pintor-Chocano A., Carrasco S. et al. Paricalcitol Has a Potent Anti-Inflammatory Effect in Rat Endothelial Denudation-Induced Intimal Hyperplasia // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024 Apr 28. – Vol. 25, No 9. – P. 4814. – DOI: 10.3390/ijms25094814.

33. Bajbouj K., Sahnoon L., Shafarin J. et al. Vitamin D-Mediated Anti-cancer Activity Involves Iron Homeostatic Balance Disruption and Oxidative Stress Induction in Breast Cancer // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021 Nov 8. – Vol. 9. – P. 766978. – DOI: 10.3389/fcell.2021.766978.
34. Bakhtiari-Dovvombaygi H., Izadi S., Zare M. et al. Vitamin D3 administration prevents memory deficit and alteration of biochemical parameters induced by unpredictable chronic mild stress in rats // *Scientific Reports*. – 2021 Aug 11. – Vol. 11, No 1. – Article 16271. – DOI: 10.1038/s41598-021-95850-6.
35. Balasooriya N. N., Elliott T. M., Neale R. E. et al. The association between vitamin D deficiency and multiple sclerosis: an updated systematic review and meta-analysis // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2024 Oct. – Vol. 90. – Article 105804. – DOI: 10.1016/j.msard.2024.105804.
36. Barwick B. G., Scharer C. D., Martinez R. J. et al. B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA methylation // *Nature Communications*. – 2018 May 15. – Vol. 9, No 1. – Article 1900. – DOI: 10.1038/s41467-018-04234-4.
37. Basile V., Allegra A., Marini H. R. et al. Influence of Vitamin D and Its Analogues in Type-B Lymphomas // *Current Oncology*. – 2025 Feb 26. – Vol. 32, No 3. – P. 135. – DOI: 10.3390/currenol32030135.
38. Berriche-Yahi N., Tahar A., Asselah H. et al. Effets d'une supplémentation orale en vitamine D3 chez des patients atteints de la maladie de Crohn : modulation des phases cliniques poussée/rémission par le profil cytokinique pro-inflammatoire et du stress oxydant [Effects of oral vitamin D3 supplementation in Crohn's disease patients: modulation of clinical active/remission phases by pro-inflammatory cytokines profile and oxidative stress] // *Annales de Biologie Clinique (Paris)*. – 2022 Feb 1. – Vol. 80, No 1. – P. 29–46. – French. – DOI: 10.1684/abc.2021.1698.
39. Bhat G. H., Guldin S., Khan M. S. et al. Vitamin D Status in Psoriasis: Impact and Clinical Correlations // *BMC Nutrition*. – 2022 Oct 19. – Vol. 8, No 1. – P. 115. – DOI: 10.1186/s40795-022-00610-y.

40. Bishop L., Ismailova A., Dimeloe S. et al. Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory // *JBMR Plus*. – 2020 Sep 15. – Vol. 5, No. 1. – Article e10405. – DOI: 10.1002/jbm4.10405.
41. Bong D., Sohn J., Lee S. V. Brief Guide to RT-qPCR // *Molecules and Cells*. – 2024 Dec. – Vol. 47, No 12. – P. 100141. – DOI: 10.1016/j.mocell.2024.100141.
42. Brom V. C., Burger C., Wirtz D. C. et al. The role of immune checkpoint molecules on macrophages in cancer, infection, and autoimmune pathologies // *Frontiers in Immunology*. – 2022 Mar 28. – Vol. 13. – Article 837645. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.837645.
43. Brooks P. J., Glogauer M., McCulloch C. A. et al. An overview of the derivation and function of multinucleated giant cells and their role in pathologic processes // *American Journal of Pathology*. – 2019 Jun. – Vol. 189, No 6. – P. 1145–1158. – DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.02.006.
44. Bscheider M., Butcher E. C. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells // *Immunology*. – 2016 Jul. – Vol. 148, No 3. – P. 227–236. – DOI: 10.1111/imm.12610.
45. Butcher M. J., Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice // *Faculty Reviews*. – 2021 Mar 15. – Vol. 10. – Article 30. – DOI: 10.12703/r/10-30.
46. Bychinin M. V., Klypa T. V., Mandel I. A. et al. Effect of Vitamin D3 Supplementation on Cellular Immunity and Inflammatory Markers in COVID-19 Patients Admitted to the ICU // *Scientific Reports*. – 2022 Nov 3. – Vol. 12, No 1. – P. 18604. – DOI: 10.1038/s41598-022-22045-y.
47. Cantorna M. T., Arora J. Two lineages of immune cells that differentially express the vitamin D receptor // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2023 Apr. – Vol. 228. – Article 106253. – DOI: 10.1016/j.jsbmb.2023.106253.
48. Cantorna M. T., Snyder L., Lin Y. D. et al. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells // *Nutrients*. – 2015 Apr 22. – Vol. 7, No. 4. – P. 3011–3021. – DOI: 10.3390/nu7043011.

49. Cao H., Xiang Y., Zhang S. et al. PD-L1 regulates inflammatory programs of macrophages from human pluripotent stem cells // *Life Science Alliance*. – 2023 Nov 10. – Vol. 7, No. 2. – Article e202302461. – DOI: 10.26508/lisa.202302461.
50. Cao L., Che X., Qiu X. et al. M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer // *Cancer Management and Research*. – 2019. – Vol. 11. – P. 6125–6138. – DOI: 10.2147/CMAR.S199832.
51. Carlberg C. Genomic Signaling of Vitamin D // *Steroids*. – 2023. – Vol. 198. – Article 109271. – DOI: 10.1016/j.steroids.2023.109271.
52. Carlberg C. Vitamin D and Its Target Genes // *Nutrients*. – 2022 Mar 24. – Vol. 14, No 7. – P. 1354. – DOI: 10.3390/nu14071354.
53. Carrion C., Guérin E., Gachard N. et al. Adult bone marrow three-dimensional phenotypic landscape of B-cell differentiation // *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. – 2019. – Vol. 96, No. 1. – P. 30–38. – DOI: 10.1002/cyto.b.21747.
54. Chai L., Ni J., Ni X. et al. Association of CYP24A1 gene polymorphism with colorectal cancer in the Jiamusi population // *PLoS One*. – 2021 Jun 30. – Vol. 16, No. 6. – Article e0253474. – DOI: 10.1371/journal.pone.0253474.
55. Chen S., Saeed A. F. U. H., Liu Q. et al. Macrophages in Immunoregulation and Therapeutics // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023 May 22. – Vol. 8, No 1. – P. 207. – DOI: 10.1038/s41392-023-01452-1.
56. Chen Y., Bharrhan S., Xu J. et al. B cells promote granulomatous inflammation during chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice // *PLoS Pathogens*. – 2023. – Vol. 19, No. 3. – Article e1011187. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1011187.
57. Choueiri T. K., Albiges L., Barthélémy P. et al. Tivozanib Plus Nivolumab Versus Tivozanib Monotherapy in Patients with Renal Cell Carcinoma Following an Immune Checkpoint Inhibitor: Results of the Phase 3 TiNivo-2 Study // *Lancet*. – 2024 Oct 5. – Vol. 404, No 10460. – P. 1309–1320. – DOI: 10.1016/S0140-6736(24)01758-6. – Epub 2024 Sep 13. – Erratum in: *Lancet*. 2024 Oct 26;404(10463):1644. DOI: 10.1016/S0140-6736(24)02186-X.

58. Chung C., Silwal P., Kim I. et al. Vitamin D-cathelicidin axis: at the crossroads between protective immunity and pathological inflammation during infection // *Immune Network*. – 2020 Feb 11. – Vol. 20, No. 2. – Article e12. – DOI: 10.4110/in.2020.20.e12.
59. Ciesielska-Figlon K., Lisowska K. A. The Role of the CD28 Family Receptors in T-Cell Immunomodulation // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, No 2. – P. 1274. – DOI: 10.3390/ijms25021274.
60. Comelekoglu U., Aktas S., Demirbag B. et al. Effect of low-level 1800 MHz radiofrequency radiation on the rat sciatic nerve and the protective role of paricalcitol // *Bioelectromagnetics*. – 2018 Dec. – Vol. 39, No. 8. – P. 631–643. – DOI: 10.1002/bem.22149.
61. Coperchini F., Chiovato L., Croce L., Magri F., Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2020 Dec. – Vol. 53. – P. 25–32. – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.003.
62. Courbebaisse M., Cavalier E. Vitamin D in 2020: an old pro-hormone with potential effects beyond mineral metabolism // *Nutrients*. – 2020 Nov 3. – Vol. 12, No. 11. – Article 3378. – DOI: 10.3390/nu12113378.
63. Dankers W., Colin E. M., van Hamburg J. P. et al. Vitamin D in autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential // *Frontiers in Immunology*. – 2017 Jan 20. – Vol. 7. – Article 697. – DOI: 10.3389/fimmu.2016.00697.
64. Daunke T., Beckinger S., Rahn S. et al. Expression and Role of the Immune Checkpoint Regulator PD-L1 in the Tumor-Stroma Interplay of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // *Frontiers in Immunology*. – 2023 Jun 28. – Vol. 14. – P. 1157397. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1157397.
65. de Gruijter N. M., Jebson B., Rosser E. C. Cytokine production by human B cells: role in health and autoimmune disease // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2022 Dec 31. – Vol. 210, No. 3. – P. 253–262. – DOI: 10.1093/cei/uxac090.

66. de Jong E., Smits H., Kapsenberg M. Dendritic cell-mediated T cell polarization // Springer Seminars in Immunopathology. – 2005. – Vol. 26, No. 3. – P. 289–307. – DOI: 10.1007/s00281-004-0167-1.
67. Demirbağ B., Aktaş S., Çömelekoğlu Ü. et al. Protective effect of paricalcitol in rat testicular damage induced by subchronic 1800 MHz radiofrequency radiation // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2023 Nov 5. – Vol. 680. – P. 42–50. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.09.024. – Epub 2023 Sep 12.
68. Dimitrov V., Bouttier M., Boukhaled G. et al. Hormonal vitamin D up-regulates tissue-specific PD-L1 and PD-L2 surface glycoprotein expression in humans but not mice // Journal of Biological Chemistry. – 2017 Dec 15. – Vol. 292, No. 50. – P. 20657–20668. – DOI: 10.1074/jbc.M117.793885.
69. Divanoglou N., Komninou D., Stea E. A. et al. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Serum Vitamin D Levels in a Greek Rural Population (Velestino Study) // Lifestyle Genomics. – 2021. – Vol. 14, No 3. – P. 81–90. – DOI: 10.1159/000514338.
70. Domazet Bugarin J., Dosenovic S., Ilic D. et al. Vitamin D supplementation and clinical outcomes in severe COVID-19 patients — randomized controlled trial // Nutrients. – 2023 Feb 28. – Vol. 15, No. 5. – Article 1234. – DOI: 10.3390/nu15051234.
71. Donati S., Palmi G., Aurilia C. et al. Calcifediol: Mechanisms of Action // Nutrients. – 2023 Oct 17. – Vol. 15, No 20. – P. 4409. – DOI: 10.3390/nu15204409.
72. Dong Y., Chen L., Huang Y. et al. Sixteen-Week Vitamin D3 Supplementation Increases Peripheral T Cells in Overweight Black Individuals: Post hoc Analysis of a Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial // Nutrients. – 2022 Sep 22. – Vol. 14, No 19. – P. 3922. – DOI: 10.3390/nu14193922.
73. Doost M. E., Hong J., Broatch J. E. et al. Synergistic Activation of VDR-RXR Heterodimers by Vitamin D and Retinoids in Human Kidney and Brain Cells // Cells. – 2024 Nov 14. – Vol. 13, No 22. – P. 1878. – DOI: 10.3390/cells13221878.
74. Doppalapudi H., Markus J. T., Parekh U. Granulomatous hepatitis // StatPearls [Электронный ресурс]. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024 Jan–.

- 2024 Sep 10. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537317/> (дата обращения: 01.06.2025). – PMID: 33231985.
75. Doyle D., Browne U., Brickley A. et al. Vitamin D-Induced Hypercalcaemia and Acute Kidney Injury in Sarcoidosis // *BMJ Case Reports*. – 2023 Jan 23. – Vol. 16, No 1. – P. e250580. – DOI: 10.1136/bcr-2022-250580.
76. Duan Z., Luo Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021 Mar 26. – Vol. 6, No. 1. – Article 127. – DOI: 10.1038/s41392-021-00506-6.
77. Duhalde Vega M., Olivera D., Gastão Davanzo G. et al. PD-1/PD-L1 Blockade Abrogates a Dysfunctional Innate-Adaptive Immune Axis in Critical β -Coronavirus Disease // *Science Advances*. – 2022 Sep 23. – Vol. 8, No 38. – P. eabn6545. – DOI: 10.1126/sciadv.abn6545.
78. Effat H., Abohashem R. S., Sharaky M. et al. Vitamin D promotes anticancer effects of low-concentration cisplatin-treated non-small cell lung cancer cells via inhibiting the JAK2/STAT3 and TGF- β /SMAD4 pathways // *Archives of Pharmacal Research (Weinheim)*. – 2025 Mar. – Vol. 358, No. 3. – Article e2400933. – DOI: 10.1002/ardp.202400933.
79. El Abd A., Dasari H., Dodin P. et al. The Effects of Vitamin D Supplementation on Inflammatory Biomarkers in Patients with Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials // *Frontiers in Immunology*. – 2024 Mar 13. – Vol. 15. – P. 1335968. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1335968.
80. El-Bassiouny N. A., Helmy M. W., Hassan M. A. E. et al. The cardioprotective effect of vitamin D in breast cancer patients receiving adjuvant doxorubicin based chemotherapy // *Clinical Breast Cancer*. – 2022 Jun. – Vol. 22, No 4. – P. 359–366. – DOI: 10.1016/j.clbc.2022.01.008.
81. Fangal V. D., Kılıç A., Mirzakhani H. et al. Vitamin D Exerts Endogenous Control over TH2 Cell Fate and Immune Plasticity // *iScience*. – 2025 Feb 26. – Vol. 28, No 4. – P. 112117. – DOI: 10.1016/j.isci.2025.112117.

82. Felício J., Moraes L., Lemos G. et al. High dose cholecalciferol supplementation causing morning blood pressure reduction in patients with type 1 diabetes mellitus and cardiovascular autonomic neuropathy // *Scientific Reports*. – 2024 Mar 16. – Vol. 14, No. 1. – Article 6374. – DOI: 10.1038/s41598-024-56934-1.
83. Feng S., Shen Y., Zhang H. et al. Human Cytomegalovirus Tegument Protein UL23 Promotes Gastric Cancer Immune Evasion by Facilitating PD-L1 Transcription // *Molecular Medicine*. – 2025 Feb 11. – Vol. 31, No 1. – P. 57. – DOI: 10.1186/s10020-025-01114-8.
84. Fisher S. A., Rahimzadeh M., Brierley C. et al. The role of vitamin D in increasing circulating T regulatory cell numbers and modulating T regulatory cell phenotypes in patients with inflammatory disease or in healthy volunteers: A systematic review // *PLoS One*. – 2019 Sep 24. – Vol. 14, No. 9. – Article e0222313. – DOI: 10.1371/journal.pone.0222313.
85. Galus L. et al. Vitamin D supplementation increases objective response rate and prolongs progression-free time in patients with advanced melanoma undergoing anti-PD1 therapy // *Cancer*. – 2023 Apr 24. – DOI: 10.1002/cncr.34718.
86. Gasperini B., Falvino A., Piccirilli E. et al. Methylation of the Vitamin D Receptor Gene in Human Disorders // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023 Dec 20. – Vol. 25, No 1. – P. 107. – DOI: 10.3390/ijms25010107.
87. Ghaseminejad-Raeini A., Ghaderi A., Sharafi A. et al. Immunomodulatory Actions of Vitamin D in Various Immune-Related Disorders: A Comprehensive Review // *Frontiers in Immunology*. – 2023 Jul 14. – Vol. 14. – P. 950465. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.950465.
88. Gianella F., Hsia C. C., Sakhaee K. The role of vitamin D in sarcoidosis // *Faculty Reviews*. – 2020. – Vol. 9. – Article 14. – DOI: 10.12703/b/9-14.
89. Gil Á., Plaza-Diaz J., Mesa M. D. Vitamin D: Classic and Novel Actions // *Annals of Nutrition and Metabolism*. – 2018. – Vol. 72, No. 2. – P. 87–95. – DOI: 10.1159/000486536.

90. Giorgi F. M., Ceraolo C., Mercatelli D. The R Language: An Engine for Bioinformatics and Data Science // *Life* (Basel). – 2022 Apr 27. – Vol. 12, No. 5. – Article 648. – DOI: 10.3390/life12050648.
91. Goodman R. S., Johnson D. B., Balko J. M. Corticosteroids and Cancer Immunotherapy // *Clinical Cancer Research*. – 2023 Jul 14. – Vol. 29, No 14. – P. 2580–2587. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-3181.
92. Gordon S. R., Maute R. L., Dulken B. W. et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity // *Nature*. – 2017. – Vol. 545, No. 7655. – P. 495–499. – DOI: 10.1038/nature22396.
93. Gospodarska E., Dastidar R. G., Jaroslawska J. et al. Transcriptomic Profiling of Immune Modulation Induced by Vitamin D3 in the VitDPAS and VitDHiD Cohort Studies // *Scientific Reports*. – 2025 May 19. – Vol. 15, No 1. – P. 17334. – DOI: 10.1038/s41598-025-02495-w.
94. Guidry C., Fricke R. G., Ram R. et al. Imaging of Sarcoidosis: A Contemporary Review // *Radiologic Clinics of North America*. – 2016 May. – Vol. 54, No. 3. – P. 519–534. – DOI: 10.1016/j.rcl.2015.12.009.
95. Guo M. Vitamin D supplementation improves the therapeutic effect of mometasone on allergic rhinitis // *Acta Biochimica Polonica*. – 2023 Sep 16. – Vol. 70, No 3. – P. 583–589. – DOI: 10.18388/abp.2020_6637.
96. Gurkan N. Vitamin D supplementation during pregnancy inhibits the activation of fetal membrane NF- κ B pathway // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2022 Aug. – Vol. 26, No. 16. – P. 5926–5931. – DOI: 10.26355/eurev_202208_29532.
97. Hahn J., Cook N. R., Alexander E. K. et al. Vitamin D and marine omega 3 fatty acid supplementation and incident autoimmune disease: VITAL randomized controlled trial // *BMJ*. – 2022 Jan 26. – Vol. 376. – Article e066452. – DOI: 10.1136/bmj-2021-066452.
98. Hartley G. P., Chow L., Ammons D. T. et al. Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation // *Cancer*

- Immunology Research. – 2018 Oct. – Vol. 6, No. 10. – P. 1260–1273. – DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0537.
99. Haussler M. R., Livingston S., Sabir Z. L. et al. Vitamin D Receptor Mediates a Myriad of Biological Actions Dependent on Its 1,25-Dihydroxyvitamin D Ligand: Distinct Regulatory Themes Revealed by Induction of Klotho and Fibroblast Growth Factor-23 // *JBMR Plus*. – 2020 Dec 3. – Vol. 5, No 1. – P. e10432. – DOI: 10.1002/jbm4.10432.
100. Heine G., Niesner U., Chang H. D. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells // *European Journal of Immunology*. – 2008 Aug. – Vol. 38, No. 8. – P. 2210–2218. – DOI: 10.1002/eji.200838216.
101. Hernando G. Modern Approaches and Theoretical Extensions to the Multivariate Kolmogorov-Smirnov Test: Dissertation. Wright-Patterson Air Force Base, Ohio: Air Force Institute of Technology, 2022. – 205 p.
102. Holick M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention // *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. – 2017. – Vol. 18. – P. 153–165. – DOI: 10.1007/s11154-017-9424-1.
103. Hoseini R., Rahim H. A., Ahmed J. K. Concurrent alteration in inflammatory biomarker gene expression and oxidative stress: how aerobic training and vitamin D improve T2DM // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. – 2022 Jun 22. – Vol. 22, No 1. – P. 165. – DOI: 10.1186/s12906-022-03645-7.
104. Hou S., Wang W., Chen G. et al. Identification of a Secreted Superoxide Dismutase (SOD) from *Nocardia seriolae* Which Induces Apoptosis in Fathead Minnow (FHM) Cells // *Journal of Fish Diseases*. – 2021 Jan. – Vol. 44, No 1. – P. 63–72. – DOI: 10.1111/jfd.13268.
105. Hu P., Xiao H., Alba M. A. et al. Myeloperoxidase-ANCA IgG induces different forms of small vessel vasculitis based on type of synergistic immune stimuli // *Kidney International*. – 2024 Nov. – Vol. 106, No. 5. – P. 870–886. – DOI: 10.1016/j.kint.2024.08.022.

106. Huang B., Guo F., Chen J. et al. Regulation of B-cell function by miRNAs impacting Systemic lupus erythematosus progression // *Gene*. – 2025 Jan 15. – Vol. 933. – Article 149011. – DOI: 10.1016/j.gene.2024.149011.
107. Huang Y., Lu C. Z., Wang C. C. et al. Establishment and identification of a C57B/6 mouse sarcoidosis granuloma model // *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*. – 2013. – Vol. 36, No. 8. – P. 587–591.
108. Hwang J., You H., Kwon D. H. et al. Transcriptome Analysis of T Cells from *Ldlr*^{-/-} Mice and Effects of in Vitro Vitamin D Treatment // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2023 Oct 28. – P. 109510. – DOI: 10.1016/j.jnutbio.2023.109510.
109. Hysa E., Vojinovic T., Gotelli E. et al. The dichotomy of glucocorticosteroid treatment in immune-inflammatory rheumatic diseases: an evidence-based perspective and insights from clinical practice // *Reumatologia*. – 2023. – Vol. 61, No 4. – P. 283–293. – DOI: 10.5114/reum/170845.
110. Illescas-Montes R., Melguizo-Rodríguez L., Ruiz C. et al. Vitamin D and autoimmune diseases // *Life Sciences*. – 2019 Sep 15. – Vol. 233. – Article 116744. – DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116744.
111. Jacob S., Nair A. B., Morsy M. A. Dose Conversion Between Animals and Humans: A Practical Solution // *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. – 2022. – Vol. 56, No 3. – P. 600–607. – DOI: 10.5530/IJPER.56.3.108.
112. Jain A., Irizarry-Caro R. A., McDaniel M. M. et al. T cells instruct myeloid cells to produce inflammasome-independent IL-1 β and cause autoimmunity // *Nature Immunology*. – 2020 Jan. – Vol. 21, No. 1. – P. 65–74. – DOI: 10.1038/s41590-019-0559-y.
113. Jankowski M., Hämäläinen E., Taipale M. et al. Vitamin D and lipopolysaccharide jointly induce a distinct epigenetic and transcriptional program in human monocytes // *Scientific Reports*. – 2025 Jul 28. – Vol. 15, No 1. – P. 27480. – DOI: 10.1038/s41598-025-10921-2.
114. Jeyabaladevan P., Jain M., Bloom P. Successful surgical management of uveitic glaucoma in a sarcoidosis patient with cutaneous manifestations // *BMJ Case*

- Reports. – 2024 Dec 10. – Vol. 17, No. 12. – Article e261361. – DOI: 10.1136/bcr-2024-261361.
115. Ji S., Liu H., Pachella L. et al. Use of Immune Checkpoint Inhibitors in Solid Organ Transplant Recipients with Advanced Cutaneous Malignancies // *Frontiers in Transplantation*. – 2023 Oct 30. – Vol. 2. – P. 1284740. – DOI: 10.3389/frtra.2023.1284740.
116. Jiang L. J., Rong Z. H., Zhang H. F. The Changes of Treg and Th17 Cells Relate to Serum 25(OH)D in Patients with Initial-Onset Childhood Systemic Lupus Erythematosus // *Frontiers in Pediatrics*. – 2023 Aug 23. – Vol. 11. – P. 1228112. – DOI: 10.3389/fped.2023.1228112.
117. Jimbu L., Mesaros O., Neaga A. et al. The Potential Advantage of Targeting Both PD-L1/PD-L2/PD-1 and IL-10-IL-10R Pathways in Acute Myeloid Leukemia // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2021 Oct 29. – Vol. 14, No. 11. – Article 1105. – DOI: 10.3390/ph14111105.
118. Jin Y., Wang Y., Feng M. et al. Sphingosine-1-phosphate alleviates Sjögren's syndrome-like symptoms via inducing autophagy and regulating status of Treg cells in NOD mice // *International Immunopharmacology*. – 2024 Dec 25. – Vol. 143, Pt 3. – Article 113514. – DOI: 10.1016/j.intimp.2024.113514.
119. Jones G. 100 YEARS OF VITAMIN D: Historical aspects of vitamin D // *Endocrine Connections*. – 2022 Apr 22. – Vol. 11, No. 4. – Article e210594. – DOI: 10.1530/EC-21-0594.
120. Judson M. A. Granulomatous Sarcoidosis Mimics // *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 8. – DOI: 10.3389/fmed.2021.680989.
121. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S. et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2001. – Vol. 194. – P. 863–869. – DOI: 10.1084/jem.194.6.863.
122. Kamali A. N., Bautista J. M., Eisenhut M. et al. Immune Checkpoints and Cancer Immunotherapies: Insights into Newly Potential Receptors and Ligands //

- Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy. – 2023 Aug 30. – Vol. 11. – P. 25151355231192043. – DOI: 10.1177/25151355231192043.
123. Kanannejad Z., Soleimani S., Ghahramani Z. et al. Immune Checkpoint Molecules in Prevention and Development of Asthma // *Frontiers in Immunology*. – 2023 Feb 14. – Vol. 14. – P. 1070779. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1070779.
124. Khazan N., Quarato E. R., Singh N. A. et al. Vitamin D Receptor Antagonist MeTC7 Inhibits PD-L1 // *Cancers*. – 2023 Jun 30. – Vol. 15, No 13. – P. 3432. – DOI: 10.3390/cancers15133432.
125. Kim S., Park G. Y., Park J. S. et al. Regulation of positive and negative selection and TCR signaling during thymic T cell development by capicua // *eLife*. – 2021 Dec 13. – Vol. 10. – Article e71769. – DOI: 10.7554/eLife.71769.
126. Kireev F. D., Lopatnikova J. A., Alshevskaya A. A. et al. Role of Tumor Necrosis Factor in Tuberculosis // *Biomolecules*. – 2025 May 12. – Vol. 15, No 5. – P. 709. – DOI: 10.3390/biom15050709.
127. Kong X., Zhang J., Chen S. et al. Immune checkpoint inhibitors: breakthroughs in cancer treatment // *Cancer Biology and Medicine*. – 2024 May 24. – Vol. 21, No 6. – P. 451–472. – DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0055.
128. Konijeti G. G., Arora P., Boylan M. R. et al. Vitamin D Supplementation Modulates T Cell-Mediated Immunity in Humans: Results from a Randomized Control Trial // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2016 Feb. – Vol. 101, No 2. – P. 533–538. – DOI: 10.1210/jc.2015-3599.
129. Koyuncu D., Tavolara T., Gatti D. M. et al. B cells in perivascular and peribronchiolar granuloma-associated lymphoid tissue and B-cell signatures identify asymptomatic Mycobacterium tuberculosis lung infection in Diversity Outbred mice // *Infection and Immunity*. – 2024 Jul 11. – Vol. 92, No. 7. – Article e0026323. – DOI: 10.1128/iai.00263-23.
130. Lebedev A. S., Shevlyakov A. D., Ilyin N. P. et al. The Neurosteroid Hormone Vitamin D: Modern Prospects // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2024. – Vol. 60. – P. 2152–2171. – DOI: 10.1134/S0022093024060024.

131. Lee G. R. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018 Mar 3. – Vol. 19, No. 3. – Article 730. – DOI: 10.3390/ijms19030730.
132. Lemire J. M., Adams J. S., Sakai R., Jordan S. C. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells // *Journal of Clinical Investigation*. – 1984 Aug. – Vol. 74, No. 2. – P. 657–661. – DOI: 10.1172/jci111465.
133. Lemke D., Klement R. J., Schweiger F. et al. Vitamin D Resistance as a Possible Cause of Autoimmune Diseases: A Hypothesis Confirmed by a Therapeutic High-Dose Vitamin D Protocol // *Frontiers in Immunology*. – 2021 Apr 7. – Vol. 12. – P. 655739. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.655739.
134. Li H., Zandberg D. P., Kulkarni A. et al. Distinct CD8+ T Cell Dynamics Associate with Response to Neoadjuvant Cancer Immunotherapies // *Cancer Cell*. – 2025 Apr 14. – Vol. 43, No 4. – P. 757–775.e8. – DOI: 10.1016/j.ccell.2025.02.026.
135. Li J., Kim S. Y., Lainez N. M. et al. Macrophage-Regulatory T Cell Interactions Promote Type 2 Immune Homeostasis Through Resistin-Like Molecule α // *Frontiers in Immunology*. – 2021 Jul 19. – Vol. 12. – P. 710406. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.710406.
136. Li M., Luo L., Lin C. et al. Vitamin D3 mitigates autoimmune inflammation caused by activation of myeloid dendritic cells in SLE // *Experimental Dermatology*. – 2024 Jan. – Vol. 33, No. 1. – Article e14926. – DOI: 10.1111/exd.14926.
137. Liang S., Cai J., Li Y., Yang R. 1,25 Dihydroxy Vitamin D3 induces macrophage polarization to M2 by upregulating T cell Ig mucin 3 expression // *Molecular Medicine Reports*. – 2019 May. – Vol. 19, No. 5. – P. 3707–3713. – DOI: 10.3892/mmr.2019.10047.
138. Liao D., Fan Q., Bao L. The role of superoxide dismutase in the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 66, No. 6. – P. 480–488. – DOI: 10.7883/yoken.66.480.
139. Lin J., Niu Z., Xue Y. et al. Chronic vitamin D3 supplementation alleviates cognition impairment via inhibition of oxidative stress regulated by

- PI3K/AKT/Nrf2 in APP/PS1 transgenic mice // *Neuroscience Letters*. – 2022 Jul 13. – Vol. 783. – Article 136725. – DOI: 10.1016/j.neulet.2022.136725.
140. Lin P. L., Myers A., Smith L. et al. Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent *Mycobacterium tuberculosis* infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model // *Arthritis & Rheumatism*. – 2010. – Vol. 62. – P. 340–350. – DOI: 10.1002/art.27271.
141. Lin X., Song B., Cao L. et al. PD-1 Suppression Enhances HIV Reactivation and T-Cell Immunity via MAPK/NF- κ B Signaling // *European Journal of Medical Research*. – 2025 Apr 4. – Vol. 30, No 1. – P. 237. – DOI: 10.1186/s40001-025-02427-4.
142. Liu J., Hamrouni A., Wolowiec D. et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-gamma and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, No. 1. – P. 296–304. – DOI: 10.1182/blood-2006-10-051482.
143. Liu L., Ding M., Zheng M. et al. Transformable peptide blocks NF- κ B/I κ B α pathway through targeted coating I κ B α against rheumatoid arthritis // *Biomaterials*. – 2025 Mar. – Vol. 314. – Article 122839. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122839.
144. Liu Y., Xu Y., Zhao R. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D deficiency accelerates inflammatory response by up-regulating inositol 1,4,5-triphosphate receptor in Coxsackievirus B3-induced acute myocarditis // *International Immunopharmacology*. – 2025 Jul 20. – Vol. 163. – P. 115256. – DOI: 10.1016/j.intimp.2025.115256.
145. Lopez A. G., Kerlan V., Desailoud R. Non-Classical Effects of Vitamin D: Non-Bone Effects of Vitamin D // *Annales d'Endocrinologie (Paris)*. – 2021 Feb. – Vol. 82, No 1. – P. 43–51. – DOI: 10.1016/j.ando.2020.12.002.
146. Lopez D. V., Al-Jaberi F. A. H., Damas N. D. et al. Vitamin D Inhibits IL-22 Production Through a Repressive Vitamin D Response Element in the il22

- Promoter // *Frontiers in Immunology*. – 2021 Aug 2. – Vol. 12. – P. 715059. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.715059.
147. Lopez D. V., Al-Jaberi F. A. H., Woetmann A. et al. Macrophages Control the Bioavailability of Vitamin D and Vitamin D-Regulated T Cell Responses // *Frontiers in Immunology*. – 2021 Sep 21. – Vol. 12. – Article 722806. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.722806.
148. Lovely G. A., Sen R. Evolving adaptive immunity // *Genes & Development*. – 2016 Apr 15. – Vol. 30, No. 8. – P. 873–875. – DOI: 10.1101/gad.281014.116.
149. Lu D., Lan B., Din Z. et al. A vitamin D receptor agonist converts CD4+ T cells to Foxp3+ regulatory T cells in patients with ulcerative colitis // *Oncotarget*. – 2017 Jun 27. – Vol. 8, No. 32. – P. 53552–53562. – DOI: 10.18632/oncotarget.18614.
150. Luo W. J., Dong X. W., Ye H. et al. Vitamin D 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Reduces Lipid Accumulation in Hepatocytes by Inhibiting M1 Macrophage Polarization // *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. – 2024 Dec 15. – Vol. 16, No 12. – P. 4685–4699. – DOI: 10.4251/wjgo.v16.i12.4685.
151. Ma J. G., Wu G. J., Xiao H. L. et al. Vitamin D has an effect on airway inflammation and Th17/Treg balance in asthmatic mice // *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. – 2021 Dec. – Vol. 37, No. 12. – P. 1113–1121. – DOI: 10.1002/kjm2.12441.
152. Maldonado R. A., von Andrian U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells // *Advances in Immunology*. – 2010. – Vol. 108. – P. 111–165. – DOI: 10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5.
153. Manson J. E., Cook N. R., Lee I. M. et al.; VITAL Research Group. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease // *New England Journal of Medicine*. – 2019 Jan 3. – Vol. 380, No. 1. – P. 33–44. – DOI: 10.1056/NEJMoa1809944.
154. Marsman C., Verhoeven D., Koers J. et al. Optimized Protocols for In-Vitro T-Cell-Dependent and T-Cell-Independent Activation for B-Cell Differentiation Studies Using Limited Cells // *Frontiers in Immunology*. – 2022 Jun 29. – Vol. 13. – Article 815449. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.815449.

155. Masbough F., Kouчек M., Koosha M. et al. Investigating the effect of high-dose vitamin D3 administration on inflammatory biomarkers in patients with moderate to severe traumatic brain injury: a randomized clinical trial // *Iranian Journal of Medical Sciences*. – 2024 Oct 1. – Vol. 49, No 10. – P. 643–651. – DOI: 10.30476/ijms.2023.99465.3156.
156. Matilainen J. M., Räsänen A., Gynther P., Väisänen S. The genes encoding cytokines IL-2, IL-10 and IL-12B are primary 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ target genes // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2010 Jul. – Vol. 121, Nos. 1-2. – P. 142–145. – DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.020.
157. Mayne C., Spanier J., Relland L. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis // *European Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 41. – P. 822–832. – DOI: 10.1002/eji.201040632.
158. Michelini S., Sarajlic M., Duschl A., Horejs-Hoeck J. IL-1 β induces expression of costimulatory molecules and cytokines but not immune feedback regulators in dendritic cells // *Human Immunology*. – 2018 Aug. – Vol. 79, No. 8. – P. 610–615. – DOI: 10.1016/j.humimm.2018.06.002.
159. Miller F. W. The Increasing Prevalence of Autoimmunity and Autoimmune Diseases: An Urgent Call to Action for Improved Understanding, Diagnosis, Treatment, and Prevention // *Current Opinion in Immunology*. – 2023 Feb. – Vol. 80. – P. 102266. – DOI: 10.1016/j.coi.2022.102266.
160. Minisola S., Colangelo L., Pepe J. et al. Osteomalacia and Vitamin D Status: A Clinical Update 2020 // *JBMR Plus*. – 2020 Dec 21. – Vol. 5, No. 1. – Article e10447. – DOI: 10.1002/jbm4.10447.
161. Munteanu C., Mârza S. M., Papuc I. The immunomodulatory effects of vitamins in cancer // *Frontiers in Immunology*. – 2024 Oct 7. – Vol. 15. – Article 1464329. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1464329.
162. Naeini A. E., Moeinzadeh F., Vahdat S. et al. The Effect of Vitamin D Administration on Intracellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Levels in Hemodialysis Patients: A Placebo-Controlled, Double-

- Blinded Clinical Trial // *Journal of Research in Pharmacy Practice*. – 2017 Jan-Mar. – Vol. 6, No 1. – P. 16–20. – DOI: 10.4103/2279-042X.200994.
163. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8-е изд. – Washington, DC: National Academies Press, 2011. – 440 с. – DOI: 10.17226/12910. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> (дата обращения: 01.06.2025).
164. Nishikawa M., Yasuda K., Takamatsu M. et al. Generation of novel genetically modified rats to reveal the molecular mechanisms of vitamin D actions // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – Article 5677. – DOI: 10.1038/s41598-020-62048-1.
165. Ohta M., Okabe T., Ozawa K. et al. In vitro formation of macrophage-epithelioid cells and multinucleated giant cells by 1 alpha,25-dihydroxy vitamin D3 from human circulating monocytes // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1986. – Vol. 465. – P. 211–220. – DOI: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb18497.x.
166. Olsson C., Riebeck K., Dohlsten M., Michaelsson E. CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kB and AP-1 activity in mouse T cell blasts // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274, No. 20. – P. 14400–14405. – DOI: 10.1074/jbc.274.20.14400.
167. Pagán A. J., Ramakrishnan L. The formation and function of granulomas // *Annual Review of Immunology*. – 2018. – Vol. 36. – P. 639–665. – DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-100022.
168. Park C. L., Bedard P. L. Moving the Needle on Immune Checkpoint Inhibitors with Novel Targets: Are We Being TIMid or LAGging Behind? // *The Oncologist*. – 2025 Jul 4. – Vol. 30, No 7. – P. oyaf145. – DOI: 10.1093/oncolo/oyaf145.
169. Park C. Y., Han S. N. The Role of Vitamin D in Adipose Tissue Biology: Adipocyte Differentiation, Energy Metabolism, and Inflammation // *Journal of Lipid and Atherosclerosis*. – 2021 May. – Vol. 10, No 2. – P. 130–144. – DOI: 10.12997/jla.2021.10.2.130.
170. Patel R., Nandini, Kharkwal H. et al. Recent Advancements Towards the Use of Vitamin D Isoforms and the Development of Their Synthetic Analogues as New

- Therapeutics // Biomedicines. – 2025 Apr 21. – Vol. 13, No 4. – P. 1002. – DOI: 10.3390/biomedicines13041002.
171. Penna G., Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation // *Journal of Immunology*. – 2000 Mar 1. – Vol. 164, No. 5. – P. 2405–2411. – DOI: 10.4049/jimmunol.164.5.2405.
172. Pereira da Fonseca A., Traidl S., Gutzmer R. et al. Histamine and Th2 Cytokines Independently and Synergistically Upregulate MMP12 Expression in Human M2 Macrophages // *Frontiers in Immunology*. – 2024 Oct 21. – Vol. 15. – P. 1429009. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1429009.
173. Perlman D. M., Sudheendra M. T., Racilla E. et al. Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease Mimicking Sarcoidosis // *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*. – 2021. – Vol. 38, No. 3. – Article e2021025. – DOI: 10.36141/svdld.v38i3.11114.
174. Pishesha N., Harmand T. J., Ploegh H. L. A guide to antigen processing and presentation // *Nature Reviews Immunology*. – 2022. – Vol. 22. – P. 751–764. – DOI: 10.1038/s41577-022-00707-2.
175. Queval C. J., Fearn A., Botella L. et al. Macrophage-specific responses to human- and animal-adapted tubercle bacilli reveal pathogen and host factors driving multinucleated cell formation // *PLoS Pathogens*. – 2021 Mar 15. – Vol. 17, No. 3. – Article e1009410. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1009410.
176. Rafique A., Rejnmark L., Heickendorff L., Møller H. J. 25(OH)D3 and 1.25(OH)2D3 inhibits TNF- α expression in human monocyte derived macrophages // *PLoS One*. – 2019 Apr 12. – Vol. 14, No. 4. – Article e0215383. – DOI: 10.1371/journal.pone.0215383.
177. Rajak P. Immune checkpoint inhibitors: From friend to foe // *Toxicology Reports*. – 2025 Apr 24. – Vol. 14. – P. 102033. – DOI: 10.1016/j.toxrep.2025.102033.
178. Ramasamy I. Vitamin D Metabolism and Guidelines for Vitamin D Supplementation // *Clinical Biochemistry Reviews*. – 2020 Dec. – Vol. 41, No 3. – P. 103–126. – DOI: 10.33176/AACB-20-00006.

179. Ren X., Dong W., Feng J. et al. miR-495 Regulates Cellular Reactive Oxygen Species Levels by Targeting Sod2 to Inhibit Intracellular Survival of Mycobacterium tuberculosis in Macrophages // *Infection and Immunity*. – 2021 Nov 16. – Vol. 89, No 12. – P. e0031521. – DOI: 10.1128/IAI.00315-21.
180. Reschly E. J., Krasowski M. D. Evolution and function of the NR1I nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds // *Current Drug Metabolism*. – 2006 May. – Vol. 7, No. 4. – P. 349–365. – DOI: 10.2174/138920006776873526.
181. Ronchetti S., Ayroldi E., Ricci E. et al. A Glance at the Use of Glucocorticoids in Rare Inflammatory and Autoimmune Diseases: Still an Indispensable Pharmacological Tool? // *Frontiers in Immunology*. – 2021 Jan 21. – Vol. 11. – Article 613435. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.613435.
182. Ruiz V. Y., Calderon T. M., Leon-Rivera R. et al. Single-cell Analysis of CD14+CD16+ Monocytes Identifies a Subpopulation with an Enhanced Migratory and Inflammatory Phenotype // *Frontiers in Immunology*. – 2025 Feb 20. – Vol. 16. – P. 1475480. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1475480.
183. Rynikova M., Adamkova P., Hradicka P. et al. Transcriptomic Analysis of Macrophage Polarization Protocols: Vitamin D3 or IL-4 and IL-13 Do Not Polarize THP-1 Monocytes into Reliable M2 Macrophages // *Biomedicines*. – 2023 Feb 17. – Vol. 11, No 2. – P. 608. – DOI: 10.3390/biomedicines11020608.
184. Samsonova M., Chernyaev A. Pathology of Sarcoidosis and Differential Diagnostics of other Granulomatous Diseases // *IntechOpen*. – 2020. – Article 90693. – DOI: 10.5772/intechopen.90693.
185. Santos C., Monteiro A., Rodrigues R. et al. In Obese Hypertensives Cholecalciferol Inhibits Circulating TH17 Cells but Not Macrophage Infiltration on Adipose Tissue // *Clinical Immunology*. – 2023 Feb. – Vol. 247. – P. 109244. – DOI: 10.1016/j.clim.2023.109244.
186. Saponaro F., Saba A., Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020 Sep 8. – Vol. 21, No. 18. – Article 6573. – DOI: 10.3390/ijms21186573.

187. Sar P. Nuclear Receptor: Structure and Function // Progress in Molecular Biology and Translational Science. – 2023. – Vol. 196. – P. 209–227. – DOI: 10.1016/bs.pmbts.2022.07.014.
188. Schroeder A. B., Dobson E. T. A., Rueden C. T. et al. The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis // Protein Science. – 2021 Jan. – Vol. 30, No. 1. – P. 234–249. – DOI: 10.1002/pro.3993.
189. Selig M., Poehlman L., Lang N. C. et al. Prediction of six macrophage phenotypes and their IL-10 content based on single-cell morphology using artificial intelligence // Frontiers in Immunology. – 2024 Jan 4. – Vol. 14. – Article 1336393. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1336393.
190. Serrano M. A., Cañada J., Moreno J. C., Gurrea G. Solar ultraviolet doses and vitamin D in a northern mid-latitude // Science of the Total Environment. – 2017 Jan 1. – Vol. 574. – P. 744–750. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.102.
191. Sheikh V., Kasapoglu P., Zamani A. et al. Vitamin D3 Inhibits the Proliferation of T Helper Cells, Downregulate CD4+ T Cell Cytokines and Upregulate Inhibitory Markers // Human Immunology. – 2018 Jun. – Vol. 79, No 6. – P. 439–445. – DOI: 10.1016/j.humimm.2018.03.001.
192. Sheng M., Liu W., Lu Z. et al. S100A9 Regulates M1 Macrophage Polarization and Exacerbates Steatotic Liver Ischemia-Reperfusion Injury // Transplant Immunology. – 2024 Dec. – Vol. 87. – P. 102134. – DOI: 10.1016/j.trim.2024.102134.
193. Shevchuk S., Marynych L., Malovana T. et al. Vitamin D Level in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Its Relationship to Disease Course and Bone Mineral Density // Lupus Science & Medicine. – 2023 Aug. – Vol. 10, No 2. – P. e000968. – DOI: 10.1136/lupus-2023-000968.
194. Shi Y., Shi Y., Jie R. et al. Vitamin D: The crucial neuroprotective factor for nerve cells // Neuroscience. – 2024 Nov 12. – Vol. 560. – P. 272–285. – DOI: 10.1016/j.neuroscience.2024.09.042.
195. Shin U., You H., Lee G. Y. et al. The effects of 1,25(OH)2D3 treatment on metabolic reprogramming and maturation in bone marrow-derived dendritic cells

- from control and diabetic mice // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2023 Jan. – Vol. 225. – Article 106197. – DOI: 10.1016/j.jsbmb.2022.106197.
196. Shiri A. M., Zhang T., Bedke T. et al. IL-10 dampens antitumor immunity and promotes liver metastasis via PD-L1 induction // *Journal of Hepatology*. – 2024 Apr. – Vol. 80, No. 4. – P. 634–644. – DOI: 10.1016/j.jhep.2023.12.015.
197. Shri Preethi M., Premkumar K., Asha Devi S. Molecular docking study on vitamin D supplements to understand their interaction with VDR-RXR α heterodimer and VDRE of TAGAP gene // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2022 Aug 24. – P. 1–10. – DOI: 10.1080/07391102.2022.2114939.
198. Sîrbe C., Rednic S., Grama A., Pop T. L. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022 Aug 29. – Vol. 23, No. 17. – Article 9784. – DOI: 10.3390/ijms23179784.
199. Soliman A. M., Soliman M., Shah S. S. H. et al. Molecular Dynamics of Inflammation Resolution: Therapeutic Implications // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2025 May 8. – Vol. 13. – P. 1600149. – DOI: 10.3389/fcell.2025.1600149.
200. Soskic B., Jeffery L. E., Kennedy A. et al. CD80 on Human T Cells Is Associated with FoxP3 Expression and Supports Treg Homeostasis // *Frontiers in Immunology*. – 2021 Jan 8. – Vol. 11. – P. 577655. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.577655.
201. Spector W. G. The granulomatous inflammatory exudate // *International Review of Experimental Pathology*. – 1969. – Vol. 8. – P. 1–55.
202. Srichomchey P., Sukprasert S., Khulasittijinda N. et al. Vitamin D3 Supplementation Promotes Regulatory T-Cells to Maintain Immune Homeostasis After Surgery for Early Stages of Colorectal Cancer // *In Vivo*. – 2023 Jan-Feb. – Vol. 37, No 1. – P. 286–293. – DOI: 10.21873/invivo.13078.
203. Stachowicz-Suhs M., Łabędź N., Milczarek M. et al. Vitamin D3 Reduces the Expression of M1 and M2 Macrophage Markers in Breast Cancer Patients //

- Scientific Reports. – 2024 Sep 27. – Vol. 14, No 1. – P. 22126. – DOI: 10.1038/s41598-024-73152-x.
204. Stanasic T., Ewing E. U., Lindell A. et al. Vitamin D3-VDR and Vitamin A-RAR Affect IL-13 and IFN γ Secretion from Human CD4⁺ T Cells Directly and Indirectly via Competition for Their Shared Co-Receptor RXR // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2025 Jan. – Vol. 101, No 1. – P. e13429. – DOI: 10.1111/sji.13429.
205. Sudjaritruk T., Bunupuradah T., Aурpibul L. et al. Impact of Vitamin D and Calcium Supplementation on Bone Mineral Density and Bone Metabolism Among Thai Adolescents With Perinatally Acquired Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: A Randomized Clinical Trial // *Clinical Infectious Diseases*. – 2021 Nov 2. – Vol. 73, No. 9. – P. 1555–1564. – DOI: 10.1093/cid/ciab547.
206. Sun C., Mezzadra R., Schumacher T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint // *Immunity*. – 2018 Mar 20. – Vol. 48, No. 3. – P. 434–452. – DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.014.
207. Sun Y., Xue J. Expression Profile and Biological Role of Immune Checkpoints in Disease Progression of HIV/SIV Infection // *Viruses*. – 2022 Mar 11. – Vol. 14, No 3. – P. 581. – DOI: 10.3390/v14030581.
208. Swaisgood C. M., Oswald-Richter K., Moeller S. D. et al. Development of a sarcoidosis murine lung granuloma model using Mycobacterium superoxide dismutase A peptide // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 44, No. 2. – P. 166–174. – DOI: 10.1165/rcmb.2009-0350OC.
209. Tao S., Chen Y., Hu W. et al. Is the identification of caseating granuloma in the intestine indicative of tuberculosis? A rare case of Crohn's disease // *Diagnostic Pathology*. – 2024 Oct 22. – Vol. 19, No. 1. – Article 139. – DOI: 10.1186/s13000-024-01566-2.
210. Tesoriere A., Ghirardo R., Terrin F. et al. Tail Fin Regeneration in Zebrafish: The Role of Non-canonical Crosstalk Between STAT3 and Vitamin D Pathway //

- International Journal of Biological Sciences. – 2025 Jan 1. – Vol. 21, No. 1. – P. 271–284. – DOI: 10.7150/ijbs.96400.
211. Tirgar A., Rezaei M., Ehsani M. et al. Exploring the synergistic effects of vitamin D and synbiotics on cytokines profile, and treatment response in breast cancer: a pilot randomized clinical trial // *Scientific Reports*. – 2024 Sep 12. – Vol. 14, No 1. – P. 21372. – DOI: 10.1038/s41598-024-72172-x.
212. Torres M., Casado G., Vigón L. et al.; Multidisciplinary Group of Study of COVID-19 (MGS-COVID); Contributing members of the Multidisciplinary Group of Study of COVID-19 (in alphabetical order). Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2022 Jun. – Vol. 150. – P. 112965. – DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112965. – Epub 2022 Apr 14. – Erratum in: *Biomed Pharmacother*. 2024 Sep;178:117251. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.117251.
213. Trefilio L. M., Bottino L., de Carvalho Cardoso R. et al. The impact of genetic variants related to vitamin D and autoimmunity: A systematic review // *Heliyon*. – 2024 Mar 21. – Vol. 10, No. 7. – Article e27700. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e27700.
214. Trochoutsou I. A., Kloukina V., Samitas K., Xanthou G. Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 15, No. 11. – DOI: 10.2174/1389557515666150727115409.
215. Tsuji A., Yoshikawa S., Morikawa S. et al. Potential tactics with vitamin D and certain phytochemicals for enhancing the effectiveness of immune-checkpoint blockade therapies // *Exploratory Targeted Antitumor Therapy*. – 2023. – Vol. 4, No 3. – P. 460–473. – DOI: 10.37349/etat.2023.00145.
216. Turner P. V., Brabb T., Pekow C., Vasbinder M. A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. – 2011 Sep. – Vol. 50, No. 5. – P. 600–613. – DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-10-000078.

217. Underwood J. L., DeLuca H. F. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization // *American Journal of Physiology*. – 1984 Jun. – Vol. 246, No. 6 Pt 1. – P. E493–E498. – DOI: 10.1152/ajpendo.1984.246.6.E493.
218. Usategui-Martín R., De Luis-Román D. A., Fernández-Gómez J. M. et al. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Nutrients*. – 2022 Jan 15. – Vol. 14, No 2. – P. 360. – DOI: 10.3390/nu14020360.
219. van Driel M., van Leeuwen J. P. T. M. Vitamin D and Bone: A Story of Endocrine and Auto/Paracrine Action in Osteoblasts // *Nutrients*. – 2023 Jan 17. – Vol. 15, No 3. – P. 480. – DOI: 10.3390/nu15030480.
220. Veldman C. M., Cantorna M. T., DeLuca H. F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2000 Feb 15. – Vol. 374, No. 2. – P. 334–338. – DOI: 10.1006/abbi.1999.1605.
221. Venter F. C., Ghitea T. C., Venter A. N. et al. Correlation between vitamin D deficiency (25(OH)D3) and the severity of purulent oropharyngeal infections // *Journal of Clinical Medicine*. – 2025 Apr 1. – Vol. 14, No 7. – P. 2410. – DOI: 10.3390/jcm14072410.
222. Vieira V. M., Hart J. E., Webster T. F. et al. Association between residences in U.S. northern latitudes and rheumatoid arthritis: A spatial analysis of the Nurses' Health Study // *Environmental Health Perspectives*. – 2010. – Vol. 118, No. 7. – P. 957–961. – DOI: 10.1289/ehp.0901861.
223. Vishnyakova P., Poltavets A., Karpulevich E. et al. The Response of Two Polar Monocyte Subsets to Inflammation // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021 Jul. – Vol. 139. – P. 111614. – DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111614.
224. Wafa N., Lamia Y.-D., Mourad A. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa* // *International Immunopharmacology*. – 2016. – P. 94–101. – DOI: 10.1016/j.intimp.2016.01.010.
225. Wahono C. S., Susianti H., Hakim A. L. et al. Randomised clinical trial study: the combination of vitamin D and curcumin piperine attenuates disease activity and

- pro-inflammatory cytokines levels in systemic lupus erythematosus patients // *Current Rheumatology Reviews*. – 2024. – Vol. 20, No 5. – P. 586–594. – DOI: 10.2174/0115733971276106231226071002.
226. Wall-Gremstrup G., Holt R., Yahyavi S. K. et al. High-dose vitamin D3 supplementation shows no beneficial effects on white blood cell counts, acute phase reactants, or frequency of respiratory infections // *Respiratory Research*. – 2024 Jan 4. – Vol. 25, No 1. – P. 11. – DOI: 10.1186/s12931-023-02642-9.
227. Wang C. M., Chen Y. J., Yang B. C. et al. Supplementation with Active Vitamin D3 Ameliorates Experimental Autoimmune Thyroiditis in Mice by Modulating the Differentiation and Functionality of Intrathyroidal T-Cell Subsets // *Frontiers in Immunology*. – 2025 Jan 30. – Vol. 16. – P. 1528707. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1528707.
228. Wang L., Cook N. R., Manson J. E. et al. Associations of Vitamin D-Related Biomarkers With Hypertension and the Renin-Angiotensin System in Men and Women // *American Journal of Hypertension*. – 2024 Nov 15. – Vol. 37, No 12. – P. 953–961. – DOI: 10.1093/ajh/hpae103.
229. Wang W., Ye X., Wang S. Bibliometric analysis of global research on vitamins and cancer between 2003 and 2022 // *Medicine (Baltimore)*. – 2024 Dec 13. – Vol. 103, No. 50. – Article e37108. – DOI: 10.1097/MD.00000000000037108.
230. Wang X., Liu Y. Offense and Defense in Granulomatous Inflammation Disease // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022 Jun 29. – Vol. 12. – P. 797749. – DOI: 10.3389/fcimb.2022.797749.
231. Wang Y., Feng S., Chen J. et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of colorectal cancer: a cross-sectional study // *PLOS ONE*. – 2025 Mar 25. – Vol. 20, No 3. – P. e0320335. – DOI: 10.1371/journal.pone.0320335.
232. Wang Y., Zhu J., DeLuca H. F. Where is the vitamin D receptor? // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2012 Jul 1. – Vol. 523, No. 1. – P. 123–133. – DOI: 10.1016/j.abb.2012.04.001.

233. Watkins S., Harrison T., Mushtaq S. A 12-week double-blind randomised controlled trial investigating the effect of dietary supplementation with 125 µg/d vitamin D in adults with asthma // *British Journal of Nutrition*. – 2024 Sep 28. – Vol. 132, No 6. – P. 738–749. – DOI: 10.1017/S0007114524000953.
234. Williams C., Giovacchini D., Kennedy A. et al. CD28 and TCR Differentially Impact Naïve and Memory T Cell Responses // *Discovery Immunology*. – 2025 Apr 22. – Vol. 4, No 1. – P. kyaf006. – DOI: 10.1093/discim/kyaf006.
235. Wimalawansa S. J. Infections and Autoimmunity-The Immune System and Vitamin D: A Systematic Review // *Nutrients*. – 2023 Sep 2. – Vol. 15, No 17. – P. 3842. – DOI: 10.3390/nu15173842.
236. Workman P., Aboagye E. O., Balkwill F. et al.; Committee of the National Cancer Research Institute. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research // *British Journal of Cancer*. – 2010 May 25. – Vol. 102, No. 11. – P. 1555–1577. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6605642.
237. Wu R., Li S., Liu Y. et al. A high proportion of caseous necrosis, abscess, and granulation tissue formation in spinal tuberculosis // *Frontiers in Microbiology*. – 2023 Aug 14. – Vol. 14. – Article 1230572. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1230572.
238. Xiao Q., Xia Y. Insights into Dendritic Cell Maturation During Infection with Application of Advanced Imaging Techniques // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2023 Mar 2. – Vol. 13. – P. 1140765. – DOI: 10.3389/fcimb.2023.1140765.
239. Xie H., Wu Y., Huang J. et al. NK Cell Exosomes Alleviate PD-L1 Expression and Facilitate Tumor Immunity by Repressing PI3K-AKT-mTOR Signaling // *Immunological Investigations*. – 2025 Apr. – Vol. 54, No. 3. – P. 382–395. – DOI: 10.1080/08820139.2024.2445608.
240. Xie Q., Shao R., Xie Y. et al. [Vitamin D analogues activate vitamin D receptor/glutathione peroxidase 4 pathway to improve ventilator-induced lung injury in mice] // *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. – 2022 Apr. – Vol. 34, No. 4. – P. 383–387. – Chinese. – DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210926-01401.

241. Xie Y., Ding J., Gao J. et al. Triptolide reduces PD-L1 through the EGFR and IFN- γ /IRF1 dual signaling pathways // *International Immunopharmacology*. – 2023 May. – Vol. 118. – Article 109993. – DOI: 10.1016/j.intimp.2023.109993.
242. Xin Y., Wang H., Wang Y. et al. CCL20 mediates the anti-tumor effect of vitamin D3 in p38MAPK/NF- κ B signaling in colitis-associated carcinogenesis // *European Journal of Cancer Prevention*. – 2021 Jan. – Vol. 30, No. 1. – P. 76–83. – DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000582.
243. Yamamoto E., Jørgensen T. N. Immunological effects of vitamin D and their relations to autoimmunity // *Journal of Autoimmunity*. – 2019 Jun. – Vol. 100. – P. 7–16. – DOI: 10.1016/j.jaut.2019.03.002.
244. Yan X., Li X., Liu B. et al. Combination therapy with saxagliptin and vitamin D for the preservation of β -cell function in adult-onset type 1 diabetes: a multi-center, randomized, controlled trial // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023 Apr 20. – Vol. 8, No. 1. – Article 158. – DOI: 10.1038/s41392-023-01369-9.
245. Yang M. M., Boin F., Wolters P. J. Molecular underpinnings of aging contributing to systemic sclerosis pathogenesis // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2025 Jan 1. – Vol. 37, No. 1. – P. 86–92. – DOI: 10.1097/BOR.0000000000001061.
246. Yin X., Chen S., Eisenbarth S. C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells // *Annual Review of Immunology*. – 2021 Apr 26. – Vol. 39. – P. 759–790. – DOI: 10.1146/annurev-immunol-101819-025146.
247. Yiyan S., Yang S., Li D., Li W. Vitamin D Affects the Warburg Effect and Stemness Maintenance of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Regulating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway // *Current Cancer Drug Targets*. – 2022. – Vol. 22, No. 1. – P. 86–95. – DOI: 10.2174/1568009621666210729100300.
248. Yokosuka T., Takamatsu M., Kobayashi-Imanishi W. et al. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2 // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – Vol. 209, No. 6. – P. 1201–1217. – DOI: 10.1084/jem.20112741.

249. Yu W., Li C., Zhang D. et al. Advances in T Cells Based on Inflammation in Metabolic Diseases // *Cells*. – 2022 Nov 10. – Vol. 11, No. 22. – Article 3554. – DOI: 10.3390/cells11223554.
250. Yu Y., Duan X., Wang X. et al. Enhanced therapeutic effects of ginseng-derived exosome-like nanoparticles loaded hyaluronic acid injectable hydrogels for breast tumor treatment // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2025 Apr 7. – Article 142914. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.142914.
251. Zali A., Hajyani S., Salari M. et al. Co-administration of probiotics and vitamin D reduced disease severity and complications in patients with Parkinson's disease: a randomized controlled clinical trial // *Psychopharmacology (Berlin)*. – 2024 Sep. – Vol. 241, No. 9. – P. 1905–1914. – DOI: 10.1007/s00213-024-06606-9.
252. Zamani M. R., Šácha P. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy: What Lies Beyond Monoclonal Antibodies? // *Medical Oncology*. – 2025 Jun 19. – Vol. 42, No 7. – P. 273. – DOI: 10.1007/s12032-025-02822-1.
253. Zaulkffali A. S., MdRazip N. N., Syed Alwi S. S. et al. Vitamins D and E stimulate the PI3K-AKT signalling pathway in insulin-resistant SK-N-SH neuronal cells // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, No. 10. – Article 2525. – DOI: 10.3390/nu11102525.
254. Zhang Y., Xu Y., Zhong W. et al. Vitamin D and Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer: A Synergistic Approach to Enhancing Treatment Efficacy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025 May 9. – Vol. 26, No 10. – P. 4511. – DOI: 10.3390/ijms26104511.
255. Zhang Z., Sun D., Tang H. et al. PER2 binding to HSP90 enhances immune response against oral squamous cell carcinoma by inhibiting IKK/NF- κ B pathway and PD-L1 expression // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2023 Nov. – Vol. 11, No. 11. – Article e007627. – DOI: 10.1136/jitc-2023-007627.
256. Zhao S. S., Mason A., Gjekmarkaj E. et al. Associations between Vitamin D and Autoimmune Diseases: Mendelian Randomization Analysis // *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. – 2023 Oct. – Vol. 62. – P. 152238. – DOI: 10.1016/j.semarthrit.2023.152238.

257. Zhao X., Di Q., Liu H. et al. MEF2C Promotes M1 Macrophage Polarization and Th1 Responses // Cellular & Molecular Immunology. – 2022 Apr. – Vol. 19, No 4. – P. 540–553. – DOI: 10.1038/s41423-022-00841-w.
258. Zhen H., Hu H., Tan C. et al. Regulation of M1/M2 Polarization in LPS-Stimulated Macrophages by 1,25(OH)₂D₃ // Alternative Therapies in Health and Medicine. – 2023 Nov. – Vol. 29, No. 8. – P. 501–505.
259. Zhu L., Qu Y., Yang J. et al. PD-L2 act as an independent immune checkpoint in colorectal cancer beyond PD-L1 // Frontiers in Immunology. – 2024 Dec 2. – Vol. 15. – P. 1486888. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1486888.
260. Żmijewski M. A. Nongenomic Activities of Vitamin D // Nutrients. – 2022 Dec 1. – Vol. 14, No 23. – P. 5104. – DOI: 10.3390/nu14235104.