

На правах рукописи

Аблякимов Эльмар Тофикович

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

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Симферополь — 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского.

Научный руководитель:

Кривенцов Максим Андреевич, доктор медицинских наук, доцент.

Официальные оппоненты:

Власов Тимур Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патофизиологии с курсом клинической патофизиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Першина Ольга Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «____» _____ 2026 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского по адресу: 295051 г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» и на сайте <http://cfuv.ru/>

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.2.318.01

доктор медицинских наук, доцент

Зяблицкая Евгения Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Иммунное воспаление и его морфогенетические проявления остаются центральными проблемами современной биомедицины ввиду их ключевой роли в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и опухолевых заболеваний. Особое значение приобретают гранулематозные реакции – форма хронического неспецифического воспаления, характеризующаяся формированием макрофагальных агрегатов, эпителиоидных клеток и фиброза, которые определяют клинические исходы при инфекционных (туберкулез, сифилис, гистоплазмоз) и неинфекционных (аутоиммунные, онкологические и профессиональные болезни) заболеваниях. Среди неинфекционных патологий ведущее место занимают аутоиммунные заболевания.

Аутоиммунные заболевания охватывают свыше 140 нозологических единиц, включая гранулематозные формы (саркоидоз, болезнь Крона, первичный билиарный холангит, гранулематоз с полиангиитом) (Doppalapudi H., 2024; Hu P., 2024; Jeyabaladevan P., 2024; Tao S., 2024) и системные органоспецифические негранулематозные процессы (ревматоидный артрит, СКВ, системная склеродермия, синдром Шегрена) (Huang B., 2025; Jin Y., 2024; Liu L., 2025; Yang M. M., 2025). Их распространенность неуклонно растет, параллельно с глобальной пандемией дефицита витамина D (VD – vitamin D), в т.ч. в Российской Федерации, что предполагает связь с иммунорегуляторными нарушениями (Азизова Н. Д., 2024; Aslam J., 2025; Athanassiou L., 2023; Illescas-Montes R., 2019; Zhao S. S., 2023).

Несмотря на прогресс в молекулярной иммунологии, механистическое понимание регуляции морфогенеза гранулём и возможности целенаправленного модулирования этих процессов остаются недостаточно разработанными, что затрудняет создание эффективных терапевтических стратегий, и в результате терапия аутоиммунных заболеваний и синдромов (включая гранулематозные) по-прежнему носит преимущественно симптоматический характер и базируется на высоких дозах глюкокортикоидов и цитостатиков (Goodman R. S., 2023; Hysa E., 2023). Отсутствие чёткого знания клеточно-молекулярного патогенеза, в частности межклеточных иммунных взаимодействий в очаге воспаления, ограничивает развитие более селективных и безопасных методов лечения, поэтому актуально изучение новых физиологических иммуномодуляторов. Это особенно актуально в условиях роста резистентности к лекарственной терапии, а также в свете растущего интереса к иммуномодуляторам с более избирательным и безопасным действием.

Выявление ключевых звеньев рецептора витамина D (VDR – vitamin D receptor) – опосредованной регуляции морфогенеза воспаления имеет прямое прикладное значение: оно создаст основу для разработки селективных молекулярных препаратов и репозиционирования аналогов витамина D в клинических ситуациях, где критичен контроль формирования гранулём и предупреждение фиброза. В то же время большинство клинических исследований сосредоточено на терапии, тогда как фундаментальные механизмы остаются слабо изученными или вовсе игнорируются; это особенно важно в контексте связи

витамина D с иммунорегуляторными контрольными точками (ИКТ), такими как PD-L1 (programmed death ligand-1). Через VDR (с учётом полиморфизмов) VD модулирует функцию иммуноцитов и регуляцию экспрессии PD-L1, что напрямую влияет на антигенпрезентацию, межклеточные взаимодействия и иммунный контроль в очаге воспаления. Детальное морфологическое и молекулярное исследование этих эффектов обосновывает целенаправленную модификацию VDR-зависимых путей и поддерживается данными крупных РКИ (VITAL; Hahn J., 2022).

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 (VDR) 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.

Научная новизна исследования. 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 (дендритные клетки, макрофаги) 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 углубляют 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 исследования. 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 иммунорегуляторного воздействия витамина D и оценить его место в межклеточной интеграции, что открывает перспективы дальнейших исследований в этой области.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с использованием современных методов исследования и обработки данных. Предметом исследования являются закономерности межклеточных взаимодействий в реализации иммунного воспаления. Выполнен эксперимент на белых крысах, использованы гистологические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические и

статистические методы. Работа одобрена комитетом по биоэтике «Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского» (протокол №11 от 21.11.2024 г.).

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 гранул, 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 работы. О достоверности полученных данных свидетельствует большой объем исследований; формирование необходимых групп сравнения; использование комплекса методик; всестороннее сравнение количественных показателей исследуемых параметров между группами и адекватный статистический анализ. 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).

Личный вклад автора. Диссертантом создана периферическая (интрадермальная) модель SOD А-инициированного иммунного гранулематозного воспаления путем модификации более ранней модели саркоидоза легких. Планирование и проведение эксперимента, обработка результатов, аналитическая и

статистическая оценка проведены лично автором, а также научные публикации подготовлены лично и в соавторстве.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих результаты, научные положения и выводы. Из них 6 статей опубликованы в рецензируемых изданиях, включенных в базы данных Scopus (Q1 и Q4) и перечень ВАК Российской Федерации. Пять из 10 работ выполнены без соавторства. Дополнительно 4 публикации представлены в сборниках материалов научных 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. 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Работа проведена на 75 крысах-самцах линии Wistar массой 200-300 граммов. Исследования выполняли в соответствии с Хельсинской декларацией «Международные рекомендации по проведению медикобиологических исследований с использованием животных» (1985) и правилами, принятыми Законом РФ от 14.05.1993 4979-1 (ред. от 28.12.2024) «О ветеринарии» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Крысы находились на стандартном пищевом рационе в условиях свободного доступа к воде и пище. Световой режим - естественный.

Животные случайно поделены на 2 серии: контрольную (30 крыс) и экспериментальную (45 крыс). В контрольной серии животных выделили три группы: первая контрольная группа (КГ 1) – несенсибилизированные животные (5 крыс); КГ 2 – животные, сенсибилизированные полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) без коррекции (10 крыс); КГ 3 – животные, без коррекции и сенсибилизированные 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 ЭГ 1 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) сенсибилизировали SOD A из расчета 50 мкг SOD A, растворенных в 0,25 мл

полного адьюванта Фрейнда, на каждого животного. В этот же день животные ЭГ 2 начали получать парикальцитол (с момента сенсибилизации 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 ЭГ 3 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 внутривентрально 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, несмотря на то, что существуют и другие схемы введения VD. 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).

Для гистологических исследований образцы тканей фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин для приготовления срезов 4–5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и изучали в проходящем свете (микроскоп Olympus CX-33, увеличение 40×100×600). Для идентификации клеточных популяций в очаге воспаления использовали следующие поликлональные антитела против CD1a, CD13, CD20, CD68, PD-L1 и VDR. Для установления изменения цитокинового профиля оценивали относительную экспрессию мРНК для генов IL-1 β , TNF- α и IL-10.

Количественные данные обрабатывали с помощью пакета программ Microsoft Excel 2019 и RStudio. Исходя из количества выборок и случайного распределения рядов сравнения, установленного по критерию Колмогорова-Смирнова, применяли U-критерия Манна-Уитни. Результаты экспериментального исследования выражали с помощью медианы (M), первого (Q1) и третьего квартиля (Q3) в виде M [Q1; Q3]. Различия считали статистически достоверными при значении P (вероятность ошибки) < 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ экспериментальных групп выявил общие закономерности в очаге саркоидоз-подобного воспаления. В большинстве групп отмечалось снижение числа CD68⁺ клеток и увеличение количества CD20⁺ клеток, а также повышение экспрессии PD-L1, сопровождавшееся уменьшением популяции CD3⁺ клеток. Подобные изменения наблюдались во всех экспериментальных группах, за исключением третьей (Рисунок 1 и 2).

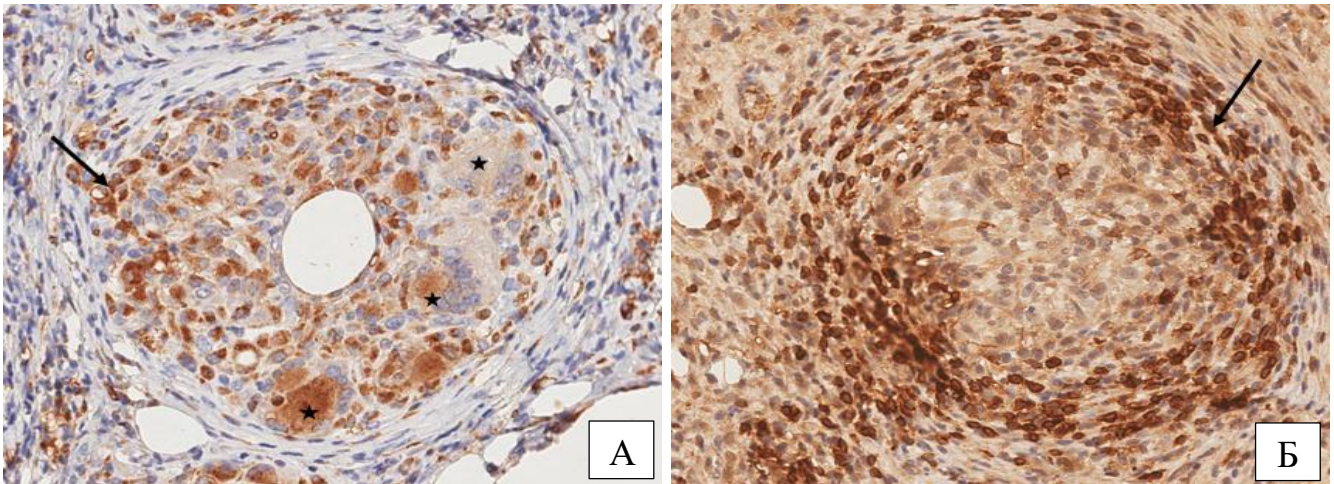


Рисунок 1. Инфильтрация тканей $CD68^+$ (А) и $CD3^+$ -клетками (Б) у экспериментальной крысы первой группы. 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. $\times 400$.

Примечание: А – $CD68^+$ макрофагальные клетки (стрелка), гигантские клетки по типу Пирогова-Лангханса (звездочка), Б – Т-клетки в перифокальной области (стрелка)

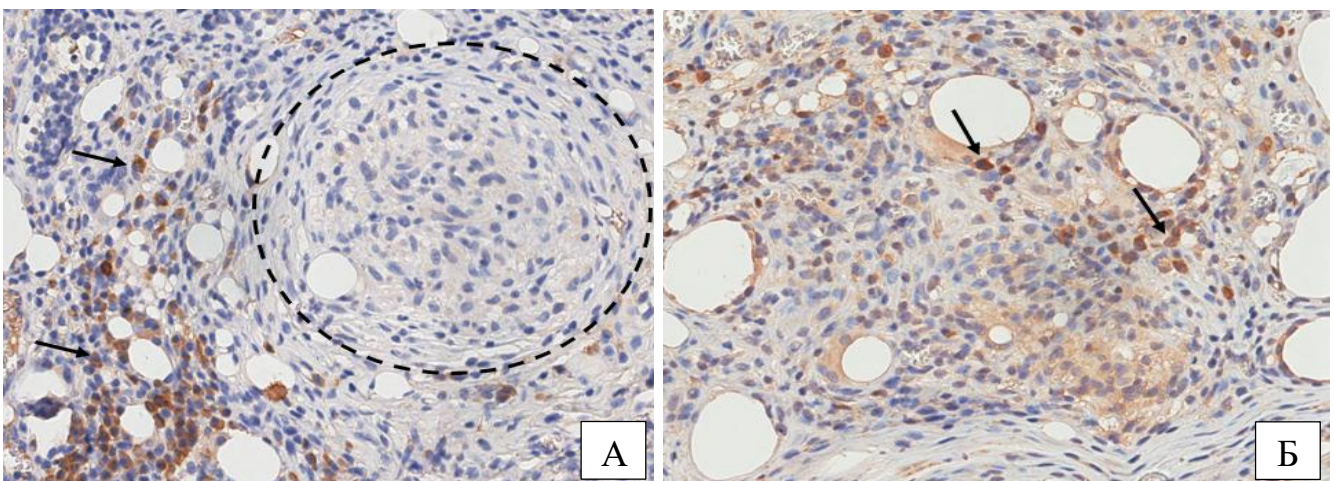


Рисунок 2. Экспрессия В-клеточного маркера $CD20$ у экспериментальной крысы первой группы (А) и экспрессия маркера PD-L1 иммунными клетками экспериментальной крысы второй группы (Б). 35-е сутки эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание с докраской ядер гематоксилином. Ув. $\times 400$.

Примечание: А – зрелая иммунная гранулема (пунктирная округлая область), В-лимфоциты (стрелка), Б – PD-L1 позитивные клетки (стрелка).

В то же время при общих изменениях клеток в отдельных группах выявлены внутригрупповые различия, вероятно обусловленные биологическими, иммунологическими или генетическими факторами: в ЭГ 2 отмечены уникальные количественные сдвиги $CD1a^+$, указывающие на селективное действие парикальцитола через лиганд-ассоциированную активацию VDR, а в ЭГ 1 – значимое снижение экспрессии мРНК $IL-1\beta$.

Изменения клеточного состава в очаге воспаления (рисунок 3) при лиганд-опосредованной активации VDR указывают на комплексное влияние парикальцитола на клетки врожденного и адаптивного иммунитета, что отражается на формировании иммунной гранулемы. Изменения клеточных профилей связаны с иммуномодулирующим действием парикальцитола на цитокиновый баланс: повышалась экспрессия мРНК гена противовоспалительного IL-10, тогда как среди провоспалительных цитокинов значимое снижение выявлено только для IL-1 β в ЭГ1 (рисунок 4).



Рисунок 3 – Количественные изменения клеточных популяций в очаге иммунного гранулематозного воспаления.

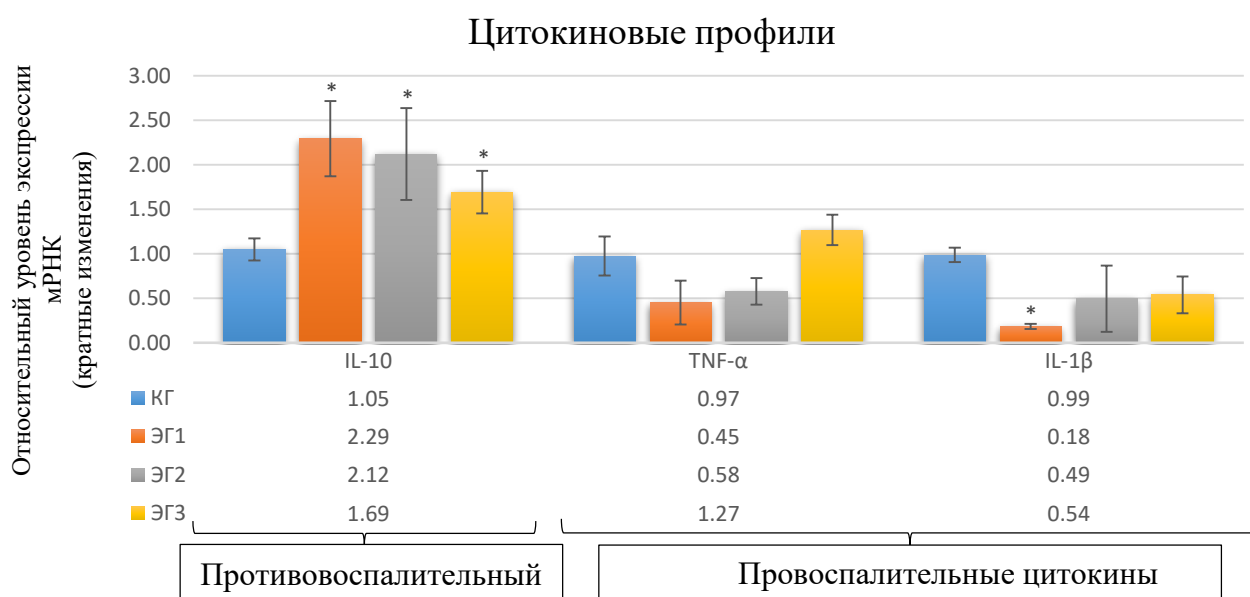


Рисунок 4 – Изменение уровня экспрессии мРНК генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в очаге воспаления.

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

Изменения количества CD68⁺ клеток носили однонаправленный характер во всех ЭГ и проявлялись их снижением в 2,3, 1,6 и 1,9 раза в ЭГ 1, 2 и 3 соответственно, на фоне лиганд-опосредованной активации VDR. Наиболее выраженные изменения в ЭГ 1 вероятно обусловлены тем, что ЭГ 1 получала парикальцитол до сенсibilизации антигеном SOD A, тогда как наименьший эффект в ЭГ 3 может быть связан с тем, что эта группа получала парикальцитол на протяжении 15 дней, в отличие от ЭГ 1 (35 дней). Интересно, что среди всех ингибированных клеточных популяций, CD68⁺ клетки продемонстрировали наибольшую степень подавления. Так, количество CD68⁺ клеток в очаге 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. Прямое действие – индукция апоптоза (Bajbouj K., 2021), слияния макрофагов в гигантские клетки типа Пирогова-Лангханса и гигантские клетки инородных тел (Ohta M., 1986) с формированием зрелых иммунных гранул, а также поляризацией макрофагов с уменьшением провоспалительного M1-фенотипа (Liang S., 2019; Zhen H., 2023). С другой стороны, парикальцитол может оказывать косвенное действие на макрофаги через систему ИКТ (PD-L1/PD-1), в частности PD-1, экспрессируемым CD3⁺ клетками. Так, в ЭГ 1 и ЭГ 2 выявлено статистически достоверное увеличение экспрессии PD-L1 в 11 и 9 раз, соответственно.

Механизм стимуляции PD-L1 витамином D на антиген-презентирующие клетки (АПК) неизвестен. Однако известны сигнальные пути ее регуляции: IFN- γ (Interferon- γ) $\rightarrow$ JAK1/JAK2 (Janus kinase) $\rightarrow$ STAT1/STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) $\rightarrow$ IRF1 (Interferon Regulatory Factor 1) $\rightarrow$ транскрипция PD-L1 (Xie Y., 2023), а также NF- κ B, активируемый TNF- α и IL-1 β (Zhang Z., 2023). Кроме этого, VD через VDREs (Doost M. E., 2024; Shri Preethi M., 2022) может увеличить экспрессию PD-L1 на АПК через общие пути STAT3, IRF1, PI3K/PKT (PI3K: phosphoinositide 3-kinase; AKT: protein kinase B) с прямым контролем транскрипции и новым путем VDR-VD/PD-L1/PD-1. Также эффекты на АПК опосредованы изменением цитокинового профиля.

Парикальцитол модулирует синтез IL-1 β и IL-10, влияя на иммунные клетки (Lopez D. V., 2021). Уменьшение CD68⁺ клеток коррелировало с 5,5-кратным снижением мРНК IL-1 β по сравнению с КГ за счет VDR-активации и уменьшению активированных макрофагов — главных продуцентов IL-1 β (Rafique A., 2019). мРНК гена TNF- α (синтезируемого CD68⁺) не изменялась статистически значимо ни в одной ЭГ, вероятно, из-за различий в транскрипционной регуляции.

Увеличение экспрессии мРНК гена противовоспалительного IL-10 в 2,18 раза в ЭГ 1 по сравнению с контролем, оказалось наибольшим среди всех изучаемых групп, что вероятно обусловлено противовоспалительной поляризацией макрофагов с увеличением M2-фенотипа, а также ростом CD20⁺ клеток — продуцентов IL-10.

Парентеральное введение парикальцитола оказывало влияние не только на клетки врожденного иммунитета ($CD68^+$ клетки), но также и на клетки адаптивного иммунитета ($CD3^+$ и $CD20^+$ клетки).

В ЭГ 1 и ЭГ 2 количество $CD3^+$ клеток снизилось на 13,3 % и 10,8 % соответственно относительно КГ. Примечательно, что парикальцитол, вводимый до сенсibilизации SOD A (ЭГ 1), вызывал более заметные сдвиги в численности макрофагов и Т-клеток по сравнению с ЭГ 2, где препарат применяли после первого контакта с антигеном. Вероятно, это связано с повышенной чувствительностью сенсibilизированных Т-клеток к VD после предварительной модуляции. Таким образом, лиганд-активация VDR проявляется интенсивнее при отсутствии выраженных провоспалительных сигналов (например, $\uparrow IL-1\beta$). Кроме того, роль может играть длительность терапии: 35 дней в ЭГ 1 против 25 дней в ЭГ 2.

Парикальцитол снижал количество $CD3^+$ клеток в очаге иммунного гранулематозного воспаления, что может быть обусловлено как прямым (через VDR), так и косвенным действием (через ось VDR-VD/PD-L1/PD-1, увеличение $IL-10$ и противовоспалительную поляризацию лимфоцитов) (Cantorna M. T., 2015). Последнее связано с лиганд-ассоциированной активацией VDR в Th2-клетках и Treg-лимфоцитах, которые подавляют функцию Th1- и Th17-клеток (Lee G. R., 2018; Ji S., 2023).

В ЭГ 3, которая отражала иммунологическую фазу стадии разрешения иммунного ответа, количество $CD3^+$ клеток не достигло статистической значимости. Это может объясняться тем, что активация каскада внутриклеточных провоспалительных сигнальных путей в $CD3^+$ клетках, запускаемых антигеном SOD A, хронологически опережает активацию внутриклеточных противовоспалительных сигнальных путей, связанных с лиганд-ассоциированной активацией VDR.

Изменения количества $CD20^+$ клеток отражали состояние гуморальной иммунной системы в очаге гранулематозного воспаления и носили односторонний характер во всех ЭГ, аналогично $CD68^+$ клеткам, только со знаком плюс. Парикальцитол увеличивал количество $CD20^+$ клеток в 7, 17 и 3 раза в ЭГ 1, 2 и 3 соответственно, по сравнению с КГ, на фоне лиганд-опосредованной активации VDR, что также может быть обусловлено как косвенным, так и непосредственным влиянием парикальцитола на $CD20^+$ клетки в очаге воспаления.

Прямое действие парикальцитола на В-клетки отражается увеличением относительной экспрессии мРНК гена $IL-10$ во всех ЭГ, аналогично динамике $CD20^+$ клеток, в 2,18, 1,07 и 1,61 раза в ЭГ 1, 2 и 3 соответственно, по сравнению с КГ. В то же время, не прямое действие, вероятно, связано с VD-VDR опосредованной Th2-зависимой активацией $CD20^+$ клеток, что подтверждается данными ИГХ, а также возможной миграцией В-клеток из периферической крови и костного мозга. При наличии общих трансформаций со стороны клеточного и цитокинового профилей, в отдельных экспериментальных группах выявлены особые внутригрупповые изменения. В частности, только $CD1a^+$ клетки и $IL-1\beta$ показали индивидуальные преобразования в ЭГ 2 и 1 соответственно.

Увеличение числа CD1a⁺ клеток в 3,67 раза при снижении CD68⁺ клеток в 1,64 раза по сравнению с КГ может указывать на доминирующую роль ДК (дендритные клетки) над макрофагами в эпидермальной сенсibilизации на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR. В отличие от ЭГ 3 с неизменным цитокиновым профилем (без увеличения ключевых мРНК генов IL-1 β /TNF- α , недостаточным для активации ДК), в ЭГ 1 парикальцитол не влиял на антигенпрезентацию CD1a⁺ клеток до сенсibilизации (первого контакта с SOD A), поскольку CD1a⁺ клетки не фагоцитируют антиген.

Значительное снижение относительной экспрессии мРНК IL-1 β наблюдалось только в ЭГ, что может быть, как прямым (подавление гена как мишени VD), так и косвенным (уменьшение активированных макрофагов – главных продуцентов IL-1 β) (Rafique A., 2019). Отсутствие изменений в ЭГ 2 и 3, вероятно, связано с меньшей продолжительностью терапии парикальцитолом: 35 дней в ЭГ 1, 25 – в ЭГ 2, 15 – в ЭГ 3. Изменения клеток, интерлейкинов и ИКТ привели к характерным структурным сдвигам гранулемы: на 35-е сутки в ЭГ 1 и 2 увеличилось число зрелых гранул в 4 и 3 раза соответственно по сравнению с КГ. Вышеописанные механизмы представлены в виде общей патофизиологической схемы межклеточных взаимодействий в очаге гранулематозного иммунного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR (рисунок 5).

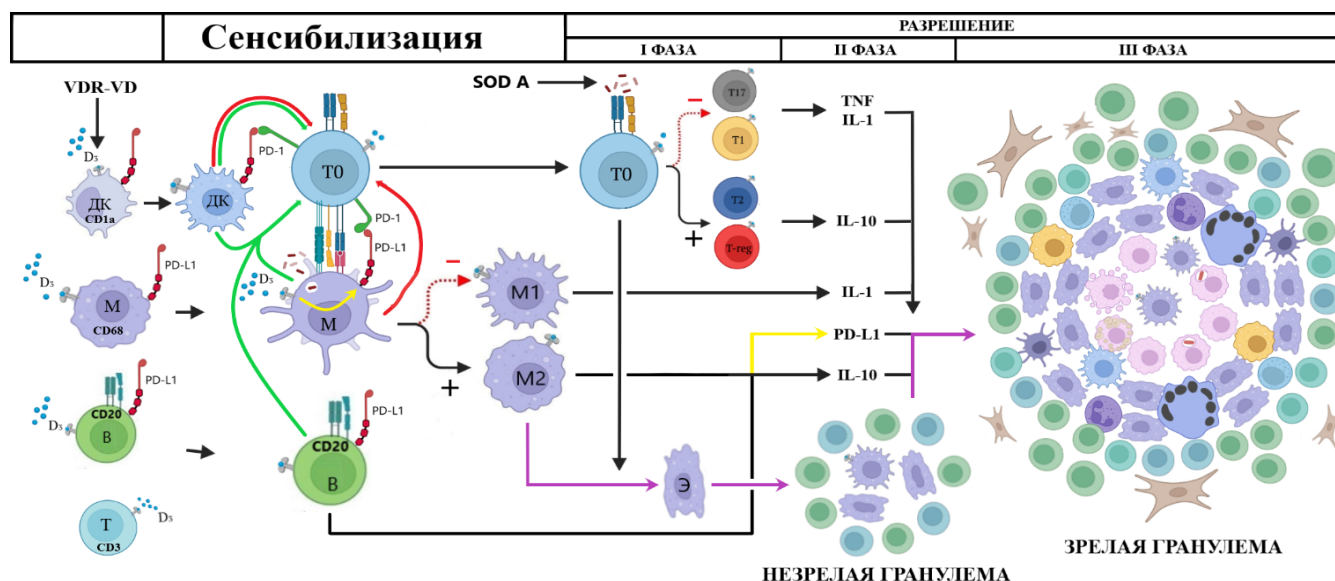


Рисунок 5 – Межклеточные взаимодействия в очаге иммунного гранулематозного воспаления на фоне лиганд-ассоциированной активации VDR.

Примечание: Т, Т0, Т1, Т2, Т17, 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 взаимодействия, SOD A – супероксиддисмутаза A, знак «+» – увеличение, знак «-» – уменьшение клеток

Заключение. В результате исследования создана периферическая (интрадермальная) модель SOD A-инициированного диффузного саркоидоз-подобного гранулематозного воспаления, а также установлена связь между терапией парикальцитола и активацией ИКТ (PD-L1). В данном эксперименте исследованы неклассические эффекты витамина D с акцентом на межклеточные взаимодействия в очаге воспаления. На модели продемонстрированы эффекты и сформулированы фундаментальные патогенетические обоснования применения парикальцитола для коррекции негативных последствий воспалительных (аутоиммунных) заболеваний. Полученные результаты легли в основу выводов.

ВЫВОДЫ

1. Интрадермальное введение синтетического пептида SOD A 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 A 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 β), выраженной реакцией сосудов микроциркуляторного русла и разрастанием фиброзной капсулы.

6. Внутривентральное 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аблякимов Э.Т., Кривенцов М.А. Гистопатологические изменения на фоне супероксиддисмутаза-А индуцированного гранулематозного воспаления // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2024. – Т. 14, № 1. – С. 5–9.
2. Аблякимов Э.Т., Кривенцов М.А. Лиганд-ассоциированная активация рецепторов витамина D и потенциальные точки приложения её эффектов в морфогенезе иммунного воспаления: обзор литературы // Acta Biomedica Scientifica. – 2024. – Т. 9, № 3. – С. 79–89.
3. Аблякимов Э.Т., Кривенцов М.А. Экспериментальная модель супероксиддисмутаза А-индуцированного саркоидоз-подобного иммунного воспаления // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2024. – Т. 19, № 4. – С. 316–323.
4. Аблякимов Э.Т. Иммуногистохимическая оценка экспрессии CD20 при гранулематозном воспалении на фоне введения парикальцитола // Современные проблемы науки и образования. – 2025. – № 1. – С. 25.
5. Ablyakimov E.T., Kriventsov M.A., Kubyshkin A.V. Paricalcitol promotes the maturation of immune granulomas in an experimental model of superoxide dismutase A-induced inflammation // Inflammation Research. – 2025 May 12; 74(1):78. – DOI: 10.1007/s00011-025-02050-3. – PMID: 40355595.
6. Аблякимов Э.Т. Особенности распределения клеток, экспрессирующих кластер дифференцировки 1А, в условиях аутоиммунного воспаления при использовании парикальцитола // Современные проблемы науки и образования. – 2025. – № 2. – С. 32.
7. Аблякимов Э.Т. Лиганд-ассоциированная активация рецепторов витамина D и потенциальные точки приложения его эффектов в морфогенезе иммунного воспаления // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 150-летию со дня рождения Н.А. Семашко «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – Симферополь, 2024. – С. 236–238.
8. Аблякимов Э.Т., Кривенцов М.А. Иммуномодулирующие эффекты парикальцитола при саркоидоз-подобном гранулематозном воспалении // Клиническая патофизиология. – 2024. – Т. 30, № 2 (прил.). – С. 3–4.
9. Аблякимов Э.Т. Иммуномодулирующие эффекты парикальцитола на CD20⁺ клетки при гранулематозном воспалении // Материалы 64-й международной

научно-практической конференции «Advances in Science and Technology». – Москва, 2024. – С. 27–28.

10. Аблякимов Э.Т. Морфологическая оценка влияния парикальцитола на иммунное воспаление // Материалы II научно-практической конференции «Наука Крыма: от истоков к современности – Симферополь, 2024. – С. 374–377.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПК – антиген представляющие клетки

ДК – дендритная клетка

ИГХ – иммуногистохимия

ИКТ – иммунные контрольные точки

КГ – контрольная группа

ЭГ – экспериментальная группа

CD – кластер дифференциации (cluster of differentiation)

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

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

SOD A – супероксиддисмутаза A (superoxide dismutase A)

VD – витамин D (vitamin D)

VDR – рецептор витамина D (vitamin D receptor)