



Możliwość wykorzystania witaminy D3 w prewencji włóknienia płuc poprzez hamowanie zjawiska EMT: przegląd wyników badań *in vitro*, *in vivo* oraz z udziałem pacjentów

Potential use of vitamin D3 in prevention of pulmonary fibrosis by inhibiting the EMT phenomenon: a review of *in vitro*, *in vivo* and clinical studies

Wiktorija Gawryś^{1,B-D,F}, Marta Kinga Lemieszek^{1,A,C,E-F}✉

¹ Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Gawryś W, Lemieszek MK. Możliwość wykorzystania witaminy D3 w prewencji włóknienia płuc poprzez hamowanie zjawiska EMT: przegląd wyników badań *in vitro*, *in vivo* oraz z udziałem pacjentów. Med Og Nauk Zdr. doi: 10.26444/monz/200682

■ Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT) prowadzące do przekształcenia komórek nabłonkowych w mezenchymalne, odgrywa istotną rolę w naprawie i regeneracji tkanek. O ile w warunkach fizjologicznych wygaśnięcie zapalenia powoduje zatrzymanie EMT, o tyle przewlekły stan zapalny napędza ten proces, prowadząc do włóknienia. Z uwagi na kluczową rolę EMT w patologicznej przebudowie tkanek słuszne wydaje się ukierunkowanie terapii zwłóknień na hamowaniu tego zjawiska. Użyteczna w tym zakresie może być witamina D3. Celem niniejszej pracy było przedstawienie możliwości wykorzystania witaminy D3 w prewencji włóknienia płuc.

Metody przeglądu. W artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat wpływu witaminy D3 na zjawisko EMT w wybranych chorobach płuc, tj. IPF, POChP, AZPP, astmie alergicznej. Analizie poddano prace oryginalne dostępne w bazach PubMed i Google Scholar.

Opis stanu wiedzy. Wyniki badań *in vitro*, *in vivo*, a także z udziałem pacjentów jednoznacznie wykazały, że witamina D3, a zwłaszcza jej aktywna biologiczna forma, tj. kalcytriol, skutecznie hamuje proces EMT typu II, leżący u podłoża włóknienia płuc. Korzystne działanie witaminy D3 obejmowało: zwiększenie ekspresji receptora VDR; obniżenie ekspresji czynników inicjujących EMT; wyciszenie przekazywania sygnałów w szlakach związanych z TGF- β ; obniżenie ekspresji czynników transkrypcyjnych nadzorujących EMT; utrzymanie fenotypu nabłonkowego poprzez modulację ekspresji markerów epitelialnych oraz mezenchymalnych związanych z EMT.

Podsumowanie. Zaprezentowany hamujący wpływ witaminy D3 na zjawisko EMT sugeruje, że przywrócenie fizjologicznego stężenia tego metabolitu u pacjentów z IPF, POChP, AZPP oraz astmą alergiczną może stanowić istotny element

prewencji włóknienia płuc oraz patologicznej przebudowy tkanek.

■ Słowa kluczowe

witamina D3, kalcydiol, cholekalcyferol, kalcytriol, włóknienie płuc, EMT

■ Abstract

Introduction and Objective. Epithelial-mesenchymal transition (EMT), which transforms epithelial cells into mesenchymal cells, plays an important role in tissue repair and regeneration. While in physiological conditions the cessation of inflammation causes the suppression of EMT, chronic inflammation drives this process, ultimately leading to fibrosis. Due to the key role of EMT in pathological tissue remodelling, it seems reasonable to focus fibrosis therapy on inhibiting this phenomenon. Vitamin D3 may be useful in this field. The aim of this study was to present the possibilities of using vitamin D3 to prevent lung fibrosis.

Review methods. The article presents the current state of knowledge on the effect of vitamin D3 on the EMT phenomenon in selected lung diseases, i.e. IPF, COPD, AZPP, and allergic asthma. Original articles available in the PubMed and Google Scholar databases were analyzed. Brief description of the state of knowledge The results of *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies revealed that vitamin D3, and especially its biologically active form, i.e. calcitriol, effectively inhibits the EMT type II underlying lung fibrosis. The beneficial effects of vitamin D3 included: increased expression of the VDR receptor; decreased expression of EMT initiating factors; silencing of signals transduction in TGF- β -related pathways; down-regulation of transcription factors supervising EMT; maintenance of the epithelial phenotype by modulating the expression of epithelial and mesenchymal markers associated with EMT.

Summary. The presented inhibitory effect of vitamin D3 on the EMT phenomenon suggests that restoration of the physiological level of this metabolite in patients with IPF,

✉ Adres do korespondencji: Marta Kinga Lemieszek, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin, Polska
E-mail: martalemieszek@gmail.com

Nadesłano: 20.11.2024; zaakceptowano: 31.01.2025; publikacja online: 17.02.2025

COPD, AZPP, and allergic asthma may be an important element in the prevention of lung fibrosis and pathological tissue remodelling.

Key words

pulmonary fibrosis, vitamin D3, cholecalciferol, EMT, calcidiol, calcitriol

WPROWADZENIE

Przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT) jest ściśle skoordynowanym procesem, w wyniku którego komórki nabłonkowe ulegają przekształceniu w komórki mezenchymalne. EMT odgrywa ważną rolę podczas embriogenezy, rozwoju narządów oraz naprawy tkanek, aczkolwiek leży także u podłoża chorób nowotworowych oraz włóknienia tkanek i narządów [1]. Na tej podstawie wyróżnia się trzy typy EMT: I – związany z embriogenezą, organogenezą oraz morfogenezą tkanek, II – odpowiedzialny za przebudowę i naprawę tkanek w warunkach stanu zapalnego oraz III – kluczowy w progresji nowotworów oraz ich przerzutowaniu. Spośród nich typ II jest ściśle powiązany z procesem włóknienia [2].

Włóknienie płuc obserwowane jest w przebiegu kilku poważnych chorób płuc, do których zalicza się m.in. przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP), idiopatyczne włóknienie płuc (IPF) oraz alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych (AZPP) [3, 4]. Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania zmian zwłóknieniowych dochodzi do stopniowej utraty funkcji płuc, a ostatecznie do niewydolności oddechowej. W konsekwencji choroby płuc, w przebiegu których dochodzi do włóknienia, charakteryzują się wysokim wskaźnikiem śmiertelności. Złe rokowania wynikają przede wszystkim z braku skutecznych metod prewencji oraz leczenia [5]. U podstaw włóknienia płuc leży EMT typu II, zatem hamowanie opisanego powyżej procesu wydaje się rozsądną strategią terapeutyczną. W tym kontekście duże nadzieje pokładane są w metabolitach witaminy D3 [6].

Witamina D3 należy do kluczowych rozpuszczalnych w tłuszczach witamin z grupy D. W odróżnieniu od witaminy D2 (występującej głównie w grzybach i roślinach), witamina D3 wytwarzana jest w skórze zwierząt pod wpływem promieniowania UVB. Witamina D3, oprócz regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej i wodno-elektrolitowej organizmu, pełni wiele innych istotnych funkcji biologicznych. Do tej pory wykazano jej rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, a także procesach związanych z proliferacją, różnicowaniem, przeżyciem oraz adhezją komórek [6]. Dzięki badaniom przeprowadzonym w ostatnich latach odkryto, że witamina D3 skutecznie hamuje zjawisko EMT, a w konsekwencji proces włóknienia płuc [1, 4, 6].

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań *in vitro*, *in vivo* oraz z udziałem pacjentów, potwierdzające skuteczność witaminy D3 w hamowaniu zjawiska EMT typu II we włóknieniu płuc obserwowanym w IPF, POChP, AZPP i astmie alergicznej. Szczególną uwagę poświęcono mechanizmom molekularnym odpowiedzialnym za korzystny wpływ metabolitów witaminy D3 na przebieg EMT, w tym interakcjom z receptorem witaminy D (VDR), przekazywaniu sygnałów w szlakach zależnych od transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β ; głównego induktora EMT) oraz modulacji ekspresji kluczowych markerów EMT.

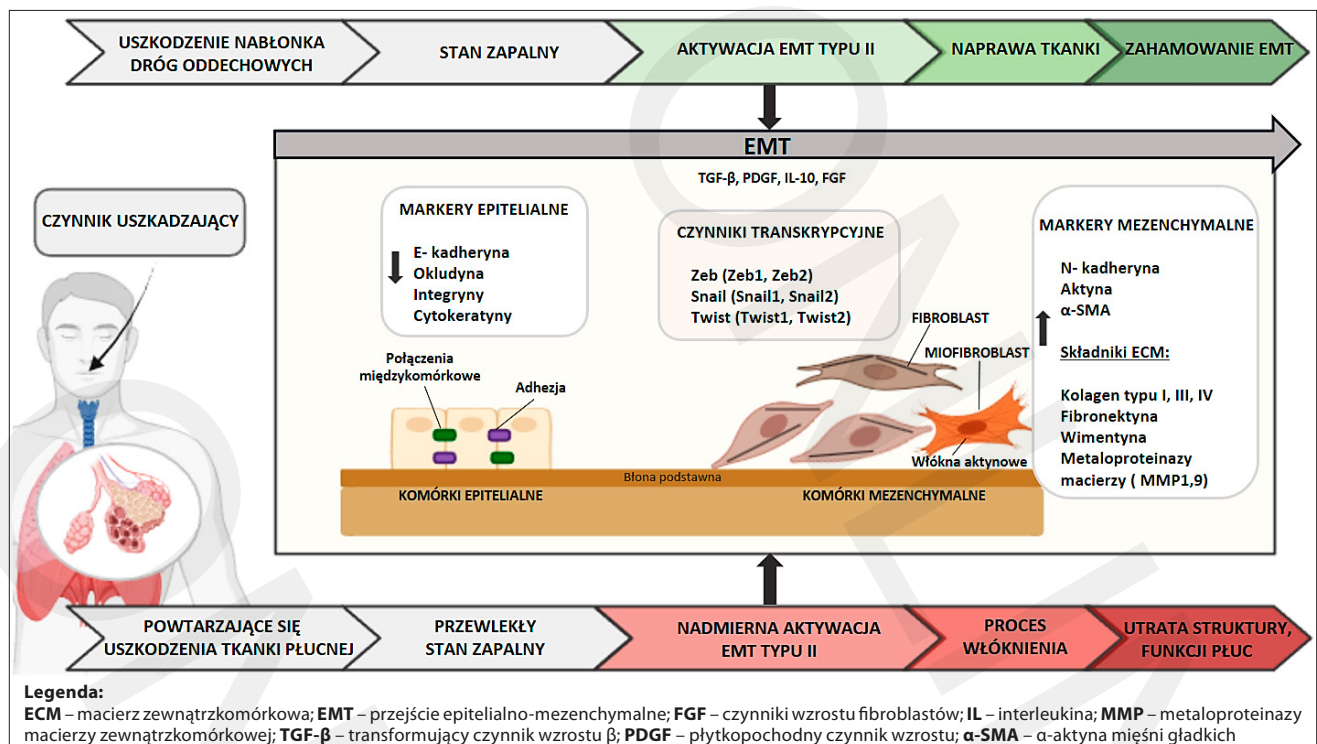
METODY PRZEGLĄDU

Przeładowanie literatury dokonano przy użyciu baz danych PubMed i Google Scholar. Podczas wyszukiwania użyto terminów: „EMT – epithelial mesenchymal transition”, „lung fibrosis”, „pulmonary fibrosis”, „vitamin D3”, „cholecalciferol”, „calcidiol”, „calcitriol”, „IPF – idiopathic pulmonary fibrosis”, „COPD – chronic obstructive pulmonary disease”, „asthma”, „hypersensitivity pneumonities”, „alergic alveolitis”, w różnych konfiguracjach. Wybrano prace oryginalne badające wpływ witaminy D3 i jej metabolitów na zjawisko EMT typu II w modelach *in vitro*, *in vivo* oraz w badaniach z udziałem pacjentów. W szczególności skupiono się na pracach analizujących wpływ witaminy D3 na przekazywanie sygnałów w szlakach związanych z EMT (przede wszystkim w szlaku TGF- β) oraz poziom ekspresji markerów epithelialnych i mezenchymalnych w chorobach płuc, w przebiegu których dochodzi do włóknienia lub patologicznej przebudowy tkanek (IPF, POChP, AZPP, astma alergiczna).

FIZJOLOGICZNE I PATOLOGICZNE OBLCZE EMT TYPU II

EMT to zjawisko polegające na przekształceniu komórek o fenotypie nabłonkowym w komórki o fenotypie mezenchymalnym. W jego wyniku komórki nabłonkowe tracą swoje charakterystyczne właściwości – zanikają oddziaływania międzykomórkowe, zaburzona zostaje polarność komórek, a w konsekwencji zanika uporządkowanie charakterystyczne dla tkanki nabłonkowej [7]. Obserwowane zmiany związane są z modyfikacjami w ekspresji wielu białek, w tym markerów powierzchniowych oraz białek odpowiedzialnych za kontakty międzykomórkowe i oddziaływanie z macierzą zewnątrzkomórkową (m.in. E-kadheryna i kładyna zastępowane są przez N-kadherynę i fibronektynę) oraz za rearanżację cytoszkieletu (m.in. filamenty cytokeratynowe zostają zastąpione przez wimentynę) [8]. Zmiany w ekspresji markerów EMT są ściśle regulowane przez szereg czynników transkrypcyjnych, wśród których najważniejszymi są Zeb, Snail i Twist. Proces EMT prowadzi do utraty inhibicji kontaktowej przez komórki, zaburzone zostają podziały komórkowe i procesy różnicowania. W wyniku wskazanych przemian komórki nabłonkowe zaczynają przypominać komórki mezenchymalne, wykazujące zwiększoną ruchliwość i inwazyjność. Ponadto powstałe komórki mezenchymalne odpowiedzialne są za produkcję oraz odkładanie składników macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również za jej przebudowę, która ostatecznie prowadzi do naprawy uszkodzonej tkanki [2].

EMT typu II, odpowiedzialna za regenerację lub naprawę uszkodzonej tkanki płuc, przebiega w warunkach stanu zapalnego, który inicjuje i nadzoruje ten proces. W warunkach fizjologicznych wygaśnięcie zapalenia powoduje zatrzymanie przejścia epithelialno-mezenchymalnego i naprawę uszkodzenia [2]. Przewlekła ekspozycja na czynniki środowiskowe (np. antygeny środowiskowe, dym papierosowy, pyły), stwarza patologiczne warunki, w których przewlekły stan zapalny



Rycina 1. Rola EMT typu II w fizjologicznym procesie naprawy tkanki oraz jako predyktora procesu włóknienia płuc
 Źródło: przygotowano na podstawie informacji zawartych w: [2]

powoduje uszkodzenie nabłonka dróg oddechowych prowadzące do włóknienia płuc (ryc. 1) [3, 7, 9].

EMT typu II powiązано z włóknieniem płuc w przebiegu IPF, POChP i AZPP, jak również z patologiczną przebudową tkanek obserwowaną w astmie. Sensowne zatem wydaje się oparcie terapii włóknienia płuc na hamowaniu procesu EMT [3].

MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA WITAMINY D3 W PREWENCJI WŁÓKNIENIA PŁUC POPRZECZ HAMOWANIE ZJAWISK ZWIĄZANYCH Z EMT

W ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań stała się możliwość wykorzystania metabolitów witaminy D3, a w szczególności jej aktywnej formy, czyli kalcytriolu, w prewencji włóknienia płuc. Kalcytriol powstaje w wyniku przemian metabolicznych witaminy D3, której głównym źródłem u zwierząt jest proces syntezy, zachodzący w skórze pod wpływem promieniowania ultrafioletowego (UVB). Obecny w naskórku 7-dehydrocholesterol ulega konwersji do prewitaminy D3, a następnie właściwej postaci witaminy D3, tj. cholekalcyferolu. W kolejnym etapie, który odbywa się w wątrobie, witamina D3 zostaje przekształcona do 25-hydroksycholekalcyferolu, znanego również jako kalcydiol (25(OH)-VD3). Stanowi on główną formę witaminy D3, krążącej w organizmie i jego pomiar w surowicy wykorzystuje się jako marker poziomu witaminy D3 w organizmie. W następnym etapie, zachodzącym głównie w nerkach, kalcydiol ulega kolejnej hydroksylacji. W jej wyniku powstaje aktywna biologicznie forma witaminy D3, czyli wspomniany wcześniej kalcytriol (1,25(OH)₂-VD3; 1,25-dihydroksycholekalcyferol). Z uwagi na szeroki zakres aktywności biologicznych oraz specyfikę działania kalcytriol należy do hormonów [6, 10, 11].

Spośród licznych funkcji biologicznych witaminy D3 w ostatnich latach zainteresowanie badaczy skupiło się na jej roli we włóknieniu płuc. Powiązania witaminy D3 z procesem włóknienia stwierdzono na podstawie wyników badań pacjentów ze zmianami zwłóknieniowymi płuc w przebiegu IPF oraz POChP, u których obserwowano zwiększający się wraz z progresją choroby niedobór witaminy D3 w surowicy. Na tej podstawie zasugerowano, że niedobór witaminy D3 sprzyja zaostrzeniom objawów we wskazanych chorobach i w konsekwencji może być markerem ich progresji [12–15]. Ponadto odkrycia te stały się podstawą do przeprowadzenia badań mających na celu ocenę terapeutycznego wpływu suplementacji witaminą D3 na proces włóknienia. Badania przeprowadzone w różnych modelach włóknienia płuc wykazały, że suplementacja metabolitami witaminy D3, a w szczególności kalcytriolem, może skutecznie hamować proces włóknienia płuc [3]. Choć szczegółowy mechanizm jej działania nie został jeszcze w pełni poznany, dostępne źródła literatury zgodnie wskazują, że podstawę stanowi jej zdolność do hamowania EMT typu II. Jednocześnie wykazano, że rola witaminy D3 w tym zakresie jest niezwykle złożona i obejmuje wpływ na ekspresję receptora VDR (receptor witaminy D), czynników inicjujących, czynników transkrypcyjnych, przekazywanie sygnałów w szlakach indukujących EMT typu II, a poprzez wskazane działania na regulację poziomu ekspresji białek warunkujących przekształcenie nabłonka płuc w komórki mezenchymalne [5].

Wpływ witaminy D3 na EMT poprzez receptor VDR

Aktywność biologiczna witaminy D3 ściśle zależy od jej interakcji z receptorem VDR, należącym do grupy receptorów steroidowo-retinoidowych aktywowanych ligandami [5]. Analiza poziomu ekspresji mRNA oraz białka VDR np. w komórkach pierwotnych fibroblastów płuc myszy C57BL/6 potwierdziła, że receptor ten występuje niemal we wszystkich

komórkach, w tym również tkanki płuc [16]. Utworzenie kompleksu VDR-kalcytriol oraz jego translokacja do jądra komórkowego, a następnie jego przyłączenie do regionów odpowiedzi na witaminę D (VDRE) szeregu genów, decyduje o wystąpieniu określonych aktywności biologicznych witaminy D3. Warto wspomnieć, że obecnie znanych jest ponad 1 tys. genów, ekspresję których nadzoruje witamina D3, co ma bezpośrednie przełożenie na wszechstronne działanie tego metabolitu. Powstanie kompleksu VDR-kalcytriol jest zatem etapem krytycznym w kontekście aktywności biologicznej witaminy D3 [6]. Dowodu potwierdzającego to zjawisko dostarczyły badania, w których inkubacja ludzkich komórek pierwotnych pęcherzyków płucnych typu II (A11) z antagonistą receptora VDR-ZK159222 spowodowała zahamowanie efektu terapeutycznego witaminy D3 [17]. Na aktywność biologiczną kalcytriolu wpływa również poziom VDR. Zmniejszona ekspresja VDR w płucach myszy C57BL/6J z IPF indukowanym bleomycyną [18] oraz u pacjentów ze zwłóknieniem płuc w przebiegu POChP [19] korelowała z niedoborem witaminy D3 oraz z progresją choroby. Wyniki tych badań wykazały istnienie związku między zaburzeniem aktywności kalcytriolu a zwłóknieniem płuc, jednocześnie wskazując na możliwość powstrzymania rozwoju patologicznych zmian poprzez uzupełnienie niedoboru witaminy D3. Słuszność tej hipotezy potwierdziły badania, w których dzięki uzupełnieniu niedoboru witaminy D3 zaobserwowano przywrócenie prawidłowego poziomu ekspresji receptora VDR. Co więcej, na podstawie tych wyników autorzy zasugerowali, że to właśnie poprzez przywrócenie prawidłowego poziomu VDR witamina D3 hamuje proces EMT, a docelowo zwłóknienie płuc [20]. Inkubacja ludzkich komórek raka niedrobnokomórkowego płuca, będącego modelem komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II (A549) z cholekalcyferolem, spowodowała zahamowanie procesu EMT indukowanego ekstraktem dymu papierosowego. Jednocześnie w komórkach A549 wykazano wzrost aktywności białka VDR w jądrze komórkowym. Na podstawie tych odkryć stwierdzono, że witamina D3 wpływa na przywrócenie prawidłowej sygnalizacji VDR, w konsekwencji hamując EMT typu II [20]. Doniesienia te znajdują także potwierdzenie w badaniach z wykorzystaniem witaminy D3 w mysim modelu astmy alergicznej [21] oraz w mysim modelu IPF z wykorzystaniem parykalcytolu (syntetyczny analog witaminy D3, agonista VDR) [22]. Zdaniem autorów obserwowane w odpowiedzi na analizowane metabolity zahamowanie EMT, a w konsekwencji proces zwłóknienia płuc, były ściśle powiązane z przywróceniem przez witaminę D3 prawidłowego poziomu ekspresji receptora VDR [21, 22].

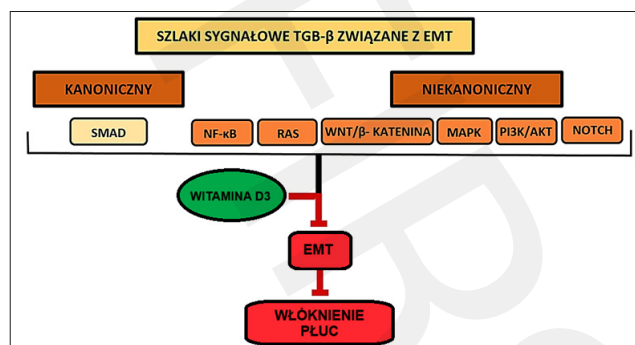
Wpływ witaminy D3 na EMT związany z modulacją poziomu TGF- β

TGF- β reguluje w organizmie szereg procesów biologicznych związanych z rozwojem, odpowiedzią immunologiczną, naprawą tkanek, a także nowotworzeniem [23]. Zdolność TGF- β do wywołania EMT potwierdzono w ludzkich fibroblastach płuc (HPF) [24], w modelu komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II (A549) [25], w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli (BEAS-2B) [26] oraz w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli (NL20) [27]. Co ważne, również wyniki badań pacjentów ze zwłóknieniem płuc, np. w przebiegu POChP, potwierdziły podwyższony poziom TGF- β , który korelował z podwyższonym poziomem ekspresji markerów EMT w surowicy badanych osób [19].

Większość źródeł literatury zgodnie wskazuje TGF- β jako czynnik kluczowy w indukcji EMT, zatem obniżenie jego ekspresji jest jednym z ważnych celów w terapii zwłóknień płuc. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że witamina D3, a w szczególności kalcytriol, wykazuje w tym zakresie wysoką skuteczność. U predestynowanych do zwłóknienia myszy szczepu C57BL/6J kalcytriol obniżył poziom ekspresji białka TGF- β w płucach, skutecznie hamując proces EMT indukowany bleomycyną [28]. Ponadto, kalcydiol oraz kalcytriol obniżyły poziom ekspresji TGF- β w mysim modelu AZPP indukowanym antygenem *Pantoea agglomerans* [29]. Wyniki opisanych badań wskazują, że witamina D3 poprzez bezpośredni wpływ na obniżenie poziomu ekspresji TGF- β skutecznie hamuje proces EMT typu II.

Wpływ witaminy D3 na przekazywanie sygnałów w szlakach związanych z TGF- β

Uruchomienie w komórkach nabłonka przemian charakterystycznych dla EMT może zachodzić w odpowiedzi na sygnały TGF- β , przekazywane z jego receptora na powierzchni komórek, na drodze kanonicznej (szlak TGF- β /Smad) lub niekanonicznej (szlaki alternatywne) [30]. Szlak TGF- β /Smad jest głównym mechanizmem transdukcji sygnałów, poprzez który TGF- β aktywuje EMT w komórkach płuc. Należy nadmienić, że istnieją również alternatywne szlaki sygnalizacyjne, które uczestniczą w transdukcji sygnałów TGF- β , np. system renina-angiotensyna (RAS), szlak Wnt/ β -katenina, kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPKs), kinaza fosfatidyloinozytolu 3 (PI3K/AKT) oraz Notch [6]. Szlaki te nie tylko wspomagają transdukcję sygnałów czynnika TGF- β , ale tworzą również złożoną sieć sygnalizacyjną, umożliwiającą precyzyjną kontrolę procesu EMT [30]. Przeprowadzone badania dowiodły, że witamina D3, poprzez obniżenie ekspresji genów kodujących kluczowe komponenty wskazanych szlaków, wpływa na zahamowanie przekazywanych przez nie sygnałów, w konsekwencji hamując proces EMT (ryc. 2).



Rycina 2. Potencjalny mechanizm prewencji zwłóknienia płuc związany z hamowaniem przez witaminę D3 przekazywania sygnałów w szlakach indukujących EMT typu II

Źródło: przygotowano na podstawie informacji zawartych w: [6, 30].

Szlak TGF- β /Smad

W kanonicznym szlaku TGF- β /Smad wiązanie TGF- β z receptorami błonowymi powoduje aktywację białek Smad2 i Smad3 poprzez ich fosforylację. Białka te tworzą kompleks, który następnie wiąże się do Smad4 i ulega translokacji do jądra komórkowego, w efekcie czego wpływa na ekspresję genów regulujących EMT [30]. Przeprowadzone dotychczas badania naukowe wykazały, że niedobór witaminy D3 nasila

przekazywanie sygnałów w szlaku TGF- β /Smad, a zwiększona jego aktywność jest związana z progresją włóknienia. Do takich wniosków doszli m.in. autorzy badań na mysim modelu włóknienia płuc indukowanym bleomycyną, którzy zaobserwowali zwiększony poziom TGF- β i związaną z nim nasiloną fosforylację Smad3 u myszy z niedoborem witaminy D3 [18]. Podwyższony poziom fosforylacji Smad2 i Smad3 oraz podwyższoną ekspresję TGF- β w tkance płuc zaobserwowano również u pacjentów z POChP, u których oznaczono istotny niedobór witaminy D3 w surowicy [19]. Możliwość wykorzystania metabolitów witaminy D3 w wyciszeniu przekazywania sygnałów w szlaku TGF- β /Smad i w konsekwencji hamowania indukcji EMT oceniono w badaniach *in vitro*. Kalcetriol hamował fosforylację białek Smad2 i Smad3 w ludzkich fibroblastach płuc (MRC-5) [19], a cholekalcyferol zmniejszał fosforylację Smad3 w mysich komórkach pierwotnych fibroblastów płuc (MLFs), co zdaniem autorów sugeruje, że witamina D3 zapobiega zmianom zwłóknieniowym płuc [12]. W innym badaniu, w którym wykorzystano hodowlę komórek będących modelem ludzkich komórek nabłonka pęcherzyków płucnych (A549), wykazano, że cholekalcyferol nie tylko skutecznie hamuje ekspresję białek indukujących szlak TGF- β /Smad, ale także podwyższa poziom ekspresji Smad7, czyli inhibitora tego szlaku. Zdaniem autorów wskazuje to na zahamowanie procesu EMT w analizowanych komórkach [20].

Alternatywne szlaki TGF- β

W ostatnich latach jest coraz więcej badań, które wskazują na hamowanie procesu EMT przez metabolity witaminy D3 poprzez modulację przekazywania sygnałów TGF- β w szlakach alternatywnych. Jednym z tych szlaków jest system renina-angiotensyna (RAS), kojarzony głównie z regulacją ciśnienia krwi oraz gospodarki wodno-elektrolitowej [22]. Wykazano, że kluczowy element tego szlaku, czyli angiotensyna II (Ang II), indukuje produkcję białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz ekspresję TGF- β , czyli głównych markerów EMT [5]. Potwierdzono, że poziom ekspresji Ang II jest podwyższony u pacjentów z IPF, u których stwierdzono również obniżony poziom ACE – enzymu odpowiedzialnego za konwersję tego białka. Dzięki zastosowaniu inhibitorów szlaku RAS, w tym bezpośredniego inhibitora ACE (ACEi) oraz bloкера receptora Ang II (ARB), zaobserwowano obniżenie wskaźników progresji oraz śmiertelności u pacjentów z IPF [31]. Ponadto wykazano, że przewlekły niedobór witaminy D3 jest czynnikiem indukującym proces włóknienia u myszy szczepu (C57BL/6J), a patologiczne zmiany związane są ze zwiększoną ekspresją (na poziomie mRNA i białek) kluczowych komponentów szlaku RAS, tj. angiotensynogenu (Agt), reniny, enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE1) i receptora angiotensyny typu I (AT1R) [32]. Zastosowanie witaminy D3 w postaci parykalcytolu w mysim modelu IPF hamowało ekspresję kluczowych elementów szlaku RAS (renina, ACE, AGT, AT1R, Ang II), a w konsekwencji zmniejszało zmiany indukowane bleomycyną [22]. Zdolność kalcetriolu do hamowania włóknienia poprzez hamowanie przekazywania sygnałów w szlaku RAS, oznaką czego był spadek poziomu Ang II i TGF- β , potwierdzono również w mysich fibroblastach płuc (MLg2908) [22].

Kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK) należą do rodziny serynowych/treoninowych kinaz białkowych, pełniących istotną rolę w alternatywnej transdukcji sygnałów TGF- β , a poprzez to EMT. Liczne badania wskazują, że witamina D3 skutecznie hamuje sygnalizację na drodze

MAPK poprzez hamowanie fosforylacji białek kluczowych dla tego szlaku, m.in. p38 oraz ERK. W badaniach *in vitro* terapia cholekalcyferolem powodowała obniżenie ekspresji białek p-p38 oraz p-ERK w ludzkich komórkach fibroblastów płuc (HPF) inkubowanych z TGF- β [24]. Obniżenie fosforylacji wspomnianych białek obserwowano także po podaniu witaminy D3 u myszy C57BL/6N z włóknieniem płuc indukowanym bleomycyną. Wyniki tych eksperymentów korelowały z danymi dotyczącymi obniżenia poziomu ekspresji kluczowych markerów EMT, a także osłabienia oznak włóknienia [24]. Obniżony poziom białka p38 odkryto także w innym badaniu, w którym myszom C57BL/6J z włóknieniem płuc indukowanym bleomycyną, podano kalcetriol. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zdolność kalcetriolu do hamowania EMT oraz zasugerowano jego rolę w łagodzeniu zwłóknienia płuc poprzez wyciszenie przekazywania sygnałów w szlaku MAPK [28].

Szlak Wnt/ β -katenina odgrywa kluczową rolę w procesach związanych z proliferacją, migracją, różnicowaniem oraz odnową komórek. Ostatnie badania wskazują również na zaangażowanie tego szlaku w promowanie włóknienia poprzez stymulację różnicowania miofibroblastów, produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zwiększanie ekspresji TGF- β [33, 34]. W konsekwencji inhibicja szlaku Wnt/ β -katenina może odgrywać ważną rolę w hamowaniu progresji włóknienia płuc, a obiecujący potencjał w tym zakresie wykazuje witamina D3 [35–37]. W szczurzych komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych inkubowanych z kalcetriolem, a następnie TGF- β 1, zaobserwowano obniżenie ekspresji β -kateniny oraz jej translokacji do jądra komórkowego, czego następstwem było zahamowanie EMT [38]. Obniżony poziom β -kateniny, korelujący ze zmniejszoną ekspresją kluczowych markerów EMT, stwierdzono także w modelu ludzkich komórek nabłonka pęcherzyków płucnych (A549) po preinkubacji z cholekalcyferolem oraz ekspozycji na ekstrakt dymu papierosowego i TGF- β [20]. Zdolność kalcetriolu do hamowania przekazywania sygnałów w szlaku Wnt/ β -katenina potwierdzają również badania *in vivo*, w których kalcetriol zmniejszył przebudowę dróg oddechowych u szczurów Sprague-Dawley, indukowaną owoalbuminą, co związane było z obniżeniem ekspresji Wnt5a i β -kateniny na poziomie mRNA oraz białka [39].

Oprócz opisanych powyżej szlaków, dostępne źródła literatury sugerują wpływ witaminy D3 na zahamowanie przekazywania sygnałów w innych szlakach regulujących EMT typu II. Doniesienia naukowe wskazują m.in., że witamina D3 może ograniczać syntezę ECM oraz indukcję EMT poprzez hamowanie przekazywania sygnałów w szlaku PI3K/Akt, a także ograniczać transdukcję sygnałów w szlaku NF- κ B, odgrywającym kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej, niezbędnej do wytworzenia środowiska sprzyjającego EMT typu II [28].

Wpływ witaminy D3 na poziom ekspresji markerów EMT

Badania ostatnich lat wskazują na kluczową rolę powstałych w wyniku EMT komórek mezenchymalnych, głównie miofibroblastów, we włóknieniu płuc. Nowo powstałe komórki mezenchymalne odpowiedzialne są za zwiększoną produkcję oraz odkładanie składników macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance płucnej. Końcowym przejawem przekształcenia komórek nabłonkowych w komórki mezenchymalne są zmiany w poziomie ich markerów [40]. Badania wykazały, że

Tabela 1. Wpływ witaminy D3 na poziom ekspresji markerów EMT w modelach *in vitro* oraz *in vivo*

Model badawczy	Forma witaminy D3	Wpływ terapii witaminą D3 na poziom ekspresji markerów EMT (Wzrost ↑ Obniżenie ↓)	Źródło
Linia komórkowa MLFs (mysie komórki pierwotnych fibroblastów płuc – wyizolowane od myszy C57/BL6) stymulowana TGF-β	Cholekalciferol	↓ Kolagen typu I, III (mRNA) ↓ α-SMA (mRNA)	[12]
Linia komórkowa NIH/3T3 (mysie komórki fibroblastów)	Kalcytriol	↓ α-SMA (mRNA, białko) ↓ Fibronektyna (mRNA, białko) ↓ Prokolagen typu I, III (mRNA, białko) ↓ Kolagen typu III (mRNA)	[16]
Mysie komórki pierwotnych fibroblastów płuc myszy C57BL/6 stymulowane TGF-β1	Kalcytriol	↓ α-SMA (mRNA, białko) ↓ Fibronektyna (mRNA, białko) ↓ Prokolagen typu I (mRNA, białko)	[16]
Linia komórkowa ATII (ludzkie komórki pierwotnych pęcherzyków płucnych typu II) stymulowana TGF-β1	Kalcydiol/ Kalcytriol	↑ E-kadheryna (mRNA, białko) ↓ N-kadheryna (mRNA, białko) ↓ Wimentyna (mRNA) ↓ Kolagen typu I (mRNA) ↓ α-SMA (mRNA, białko)	[17]
Linia komórkowa A549 (ludzkie komórki raka niedrobnokomórkowego płuca, będące modelem komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II) stymulowana 5% ekstraktem dymu papierosowego (CSE)/ 5% CSE + TGFβ	Cholekalciferol	↑ E-kadheryna (białko) ↓ α-SMA (białko) ↓ β-katenina (białko)	[20]
Linia komórkowa HPF (ludzkie komórki fibroblastów płuc) stymulowana TGF-β	Cholekalciferol	↓ Kolagen typu I (mRNA, białko) ↓ α-SMA (mRNA, białko)	[24]
Linia komórkowa A549 (ludzkie komórki raka niedrobnokomórkowego płuca, będące modelem komórek nabłonka pęcherzyków płucnych typu II) stymulowana TGF-β	Kalcytriol	↑ E-kadheryna (białko) ↓ N-kadheryna (białko) ↓ Wimentyna (białko) ↓ Fibronektyna (mRNA) ↓ Kolagen typu I (mRNA) ↓ Snail (białko) ↓ β-katenina (białko)	[25]
Linia komórkowa BEAS-2B (ludzkie komórki nabłonka oskrzeli) stymulowana TGF-β1/TGF-β2	Kalcytriol	↑ E-kadheryna (mRNA, białko) ↓ N-kadheryna (mRNA, białko) ↓ Snail (mRNA, białko) ↓ Wimentyna (mRNA, białko) ↓ MMP2 i MMP9 (mRNA, białko)	[26]
Szczurza linia komórkowa nabłonka pęcherzyków płucnych stymulowana TGF-β	Kalcytriol	↑ E-kadheryna (białko) ↓ α-SMA (białko) ↓ Fibronektyna (białko) ↓ β-katenina (białko) ↓ MMP-9 (białko) ↓ Snail (mRNA)	[38]
Linia komórkowa HFL1 (ludzkie płodowe komórki fibroblastów tkanki płucnej) stymulowana TGF-β	Kalcytriol	↑ Cdh1 (mRNA) ↓ Wimentyna (mRNA, białko) ↓ MMP-9 (mRNA)	[41]
Myszy C57/BL6 (mysi model IPF indukowany bleomycyną)	Cholekalciferol	↓ Hydroksyprolina (białko) ↓ Kolagen typu I (mRNA) ↓ α-SMA (mRNA, białko)	[12]
Myszy C57/BL6 (mysi model uszkodzenia płuc w zespole ostrej niewydolności oddechowej (ARDS) indukowany LPS (<i>Escherichia coli</i>) 055: B5)	Kalcydiol/ Kalcytriol	↓ α-SMA (białko)	[17]
Myszy BALB/c (mysi model astmy alergicznej indukowany mieszkanką alergenów (HRA) zawierającą: roztocza kurzu domowego (HDA, ang. <i>house dust mite</i>), ekstrakt ambrozji oraz ekstrakt <i>Alternaria alternata</i>)	Witamina D3	↑ E-kadheryna (białko) ↓ N-kadheryna (białko) ↓ Wimentyna (białko)	[21]
Myszy C57BL/6 (mysi model IPF indukowany bleomycyną (BLM))	Parykalcytol (syntetyczny analog witaminy D3)	↓ α-SMA (mRNA, białko) ↓ Fibronektyna (mRNA, białko) ↓ Kolagen typu I (mRNA, białko) ↓ Kolagen typu III, IV (mRNA)	[22]
Myszy C57BL/6N (mysi model IPF indukowany bleomycyną)	Cholekalciferol	↓ Hydroksyprolina (białko) ↓ Kolagen typu I (białko) ↓ α-SMA (białko)	[24]
Myszy C57BL/6J (mysi model IPF indukowany bleomycyną)	Kalcytriol	↓ α-SMA (białko)	[28]
Myszy C57BL/6J (mysi model AZPP indukowany antygenem <i>Pantoea agglomerans</i>)	Kalcydiol/ Kalcytriol	↓ Hydroksyprolina (składnik kolagenu) (białko) ↓ Kolagen typu I (białko) ↓ Fibronektyna (białko)	[29]
Szczury Sprague-Dawley (mysi model astmy indukowany owalbuminą)	Kalcytriol	↓ Kolagen (białko) ↓ α-SMA (białko) ↓ β-katenina (mRNA, białko)	[39]

Źródło: [12, 16, 17, 20–22, 24–26, 28, 29, 38, 39, 41].

u pacjentów z włóknieniem płuc występuje obniżony poziom markerów epitelialnych (E-kadheryny), a zwiększona ekspresja markerów mezenchymalnych (wimentyny, α -SMA). Zmiany te są charakterystyczne dla procesu EMT [19]. Witamina D3 poprzez interakcję z receptorem VDR, regulację ekspresji czynników odpowiedzialnych za inicjację oraz aktywność szlaków sygnałowych związanych z procesem EMT, moduluje ekspresję markerów EMT, w konsekwencji hamując proces włóknienia płuc [40]. Dotychczas wykazano, że witamina D3 zwiększa w komórkach nabłonka ekspresję E-kadheryny, czyli białka adhezyjnego odpowiadającego za utrzymanie połączeń międzykomórkowych. Jego zmniejszony poziom jest jednym z najbardziej charakterystycznych wskaźników aktywacji EMT, ponieważ następująca wówczas dezorganizacja połączeń międzykomórkowych jest niezbędnym etapem w uzyskaniu przez komórki fenotypu mezenchymalnego [17, 20, 21, 25, 26, 38]. W utrzymaniu adhezji komórek nabłonkowych z E-kadheryną współpracuje m.in. β -katenina. Badania dowiodły, że witamina D3 hamuje translokację β -kateniny do jądra komórkowego, uniemożliwiając mu indukcję ekspresji genów związanych z procesem EMT [20, 25, 26, 38, 39]. W odróżnieniu od markerów epitelialnych, witamina D3 obniża poziom ekspresji markerów mezenchymalnych. Badania wykazały, że mniejsza ona ekspresję białek bezpośrednio związanych z transformacją fenotypową komórek nabłonka, takich jak N-kadheryna (zdolności migracyjne i inwazyjne) i aktywna (przebudowa cytoszkieletu), oraz składników ECM [17, 21, 25]. W przebiegu włóknienia płuc nadmierna aktywacja EMT prowadzi do zaburzeń w aktywności nowo powstałych komórek mezenchymalnych, w wyniku czego dochodzi do zwiększonej ekspresji białek takich jak: kolagen typu I-IV i XVIII, α -SMA, wimentyna, fibronektyna, kwas hialuronowy, a także związanych z przebudową ECM metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP1, 2, 3, 9) [6]. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że podanie witaminy D3 powoduje spadek ekspresji, a w konsekwencji odkładania w tkance płucnej białek takich jak: kolagen typu I [12, 16, 17, 22, 24–26, 29], kolagen typu III [12, 16, 22] kolagen typu IV [22], α -SMA [12, 16, 17, 20, 22, 24, 28, 38, 39] wimentyna [17, 21, 25, 26, 41] fibronektyna [16, 22, 29, 38] oraz MMP2 [26] i MMP9 [26, 38, 41]. Ponadto badania potwierdziły, że witamina D3 nadzoruje poziom kluczowych czynników transkrypcyjnych, regulujących ekspresję markerów EMT. Wykazano, że witamina D3 wycisza ekspresję czynników Snail1 oraz Snail2, których zwiększony poziom koreluje z utratą cech nabłonkowych oraz nabywaniem przez komórki cech mezenchymalnych [25, 26, 38]. Uzyskane wyniki badań wskazują, że witamina D3 poprzez przywrócenie właściwych poziomów ekspresji markerów EMT typu II jest w stanie skutecznie hamować ten proces (tab. 1).

PODSUMOWANIE

Zaprezentowane wyniki badań jednoznacznie wskazują na zdolność metabolitów witaminy D3, a w szczególności kalcytriolu, do hamowania procesu EMT typu II, leżącego u podłoża włóknienia płuc. Wykryte korzystne działanie witaminy D3 związane jest ze zwiększaniem ekspresji receptora VDR, obniżeniem poziomu ekspresji czynników inicjujących EMT (w tym TGF- β), obniżeniem poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych nadzorujących EMT (w tym

Snail), zahamowaniem transdukcji sygnałów w szlakach związanych z TGF- β , a ostatecznie z utrzymaniem fenotypu nabłonkowego poprzez modulację ekspresji markerów epitelialnych oraz mezenchymalnych EMT. Zaprezentowane wyniki sugerują, że uzupełnienie deficytów witaminy D3 u pacjentów z IPF, POChP oraz AZPP może stanowić istotny element prewencji włóknienia płuc w przebiegu tych chorób.

PODZIĘKOWANIA

Badania finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na realizację grantu pt.: „Ocena możliwości wykorzystania witaminy D3 w prewencji i leczeniu włóknienia płuc w przebiegu alergicznego zapalenia pęcherzyków płuc – badania in vivo” UMO-2020/38/E/NZ7/00366

PIŚMIENNICTWO

1. Larriba M J, García de Herreros A, Muñoz A. Vitamin D and the epithelial to mesenchymal transition. *Stem cells int.* 2016;2016(1):6213872. <https://doi.org/10.1155/2016/6213872>
2. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. *Cells.* 2021;10(7):1587. <https://doi.org/10.3390/cells10071587>
3. Gaudet M, Plesa M, Mogas A, et al. Recent advances in vitamin D implications in chronic respiratory diseases. *Respir Res.* 2021;23(1):252. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02147-x>
4. Chojnacki M, Lemieszek MK. Role of vitamin D3 in selected pulmonary diseases with particular emphasis on lung fibrosis. *Ann Agr Env Med.* 2023;30(1):31–44. <https://doi.org/10.26444/aaem/161583>
5. Ma D, Peng L. Vitamin D and pulmonary fibrosis: a review of molecular mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(9):3171.
6. Monti N, Cucina A. Fibrosis: A Role for Vitamin D. *Org J Biol Sci.* 2020;4(1):26–41. <https://doi.org/10.13133/2532-5876/16960>
7. He H, Ji X, Cao L, et al. Medicine Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition to Treat Airway Remodeling and Pulmonary Fibrosis Progression. *Can Respir J.* 2023;2023(1):3291957. <https://doi.org/10.1155/2023/3291957>
8. Salton F, Volpe MC, Confalonieri M. Epithelial-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina.* 2019;55:83. <https://doi.org/10.3390/medicina55040083>
9. Hill C, Jones M G, Davies D E, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to pulmonary fibrosis via aberrant epithelial/fibroblastic cross-talk. *J lung health dis.* 2019;3(2):31. <https://doi.org/10.29245/2689-999X/2019/2.1149>
10. Gayan Ramirez G, Janssens W. Vitamin D actions: the lung is a major target for vitamin D, FGF23, and Klotho. *JBM Plus.* 2021;5(12):e10569. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10569>
11. Olmos-Ortiz A, Avila E, Durand-Carbajal M, et al. Regulation of Calcitriol Biosynthesis and Activity: Focus on Gestational Vitamin D Deficiency and Adverse Pregnancy Outcomes. *Nutrients.* 2015;7(1):443–480. <https://doi.org/10.3390/nu7010443>
12. Tzilas V, Bouros E, Barbayianni I, et al. Vitamin D prevents experimental lung fibrosis and predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2019;55:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2019.01.003>
13. Lehouck A, Mathieu C, Carremans C, et al. High doses of vitamin D to reduce exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2012;156(2):105–114. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-2-201201170-00004>
14. Yang L, Zhai Z, Zhang J. The role of serum 1, 25-Dihydroxy vitamin D3 and PCT in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Gen Med.* 2022;15:8081. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S386984>
15. Fu L, Fei J, Tan Z, et al. Low vitamin D status is associated with inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 2021;206(3):515–523. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000964>
16. Ramirez A M, Wongtrakool C, Welch T, et al. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β 1 in lung fibroblasts

- and epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118(3):142–150. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2009.11.004>
17. Zheng S, Yang J, Hu X, et al. Vitamin D attenuates lung injury via stimulating epithelial repair, reducing epithelial cell apoptosis and inhibits TGF- β induced epithelial to mesenchymal transition. *Biochem pharmacol.* 2020;177:113955. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113955>
18. Li SR, Tan ZX, Chen YH, et al. Vitamin D deficiency exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis partially through aggravating TGF- β /Smad2/3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Respir res.* 2019;20:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1232-6>
19. Fei J, Fu L, Cao W, et al. Low vitamin D status is associated with epithelial-mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 2019;203(6):1428–1435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900229>
20. Sari E, Oztay F, Tasci AE. Vitamin D modulates E-cadherin turnover by regulating TGF- β and Wnt signalings during EMT-mediated myofibroblast differentiation in A459 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;202:105723. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2020.105723>
21. Fischer KD. Analysis of immunomodulatory effects of vitamin D in epithelial-mesenchymal transition and airway remodeling in allergic airway inflammation. Creighton University; 2015.
22. Chang J, Nie H, Ge X, et al. Vitamin D suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting the local renin-angiotensin system in the lung. *Sci Rep.* 2021;11(1):16525. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96152-7>
23. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β signaling in lung health and disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2460. <https://doi.org/10.3390/ijms19082460>
24. Zhu W, Ding Q, Wang L, et al. Vitamin D3 alleviates pulmonary fibrosis by regulating the MAPK pathway via targeting PSAT1 expression in vivo and in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2021;101:108212. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108212>
25. Jiang F, Yang Y, Xue L, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 attenuates TGF- β -induced pro-fibrotic effects in human lung epithelial cells through inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *Nutrients.* 2017;9(9):980. <https://doi.org/10.3390/nu9090980>
26. Fischer KD, Agrawal DK. Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition. *Respir Res.* 2014;15:1–13. <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-015-0301-8>
27. Lemieszek MK, Rzeski W, Golec M, et al. Pantoea agglomerans chronic exposure induces epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells and mice lungs. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;194:110416. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110416>
28. Tan ZX, Chen YH, Xu S, et al. Calcitriol inhibits bleomycin-induced early pulmonary inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition in mice. *Toxicol Lett.* 2016;240(1):161–171. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.022>
29. Lemieszek MK, Chojnacki M, Paśnik I, et al. Beneficial Impact of Inhaled 25 (OH)-Vitamin D3 and 1, 25 (OH) 2-Vitamin D3 on Pulmonary Response in the Murine Model of Hypersensitivity Pneumonitis. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10289. <https://doi.org/10.3390/ijms251910289>
30. Ye Z, Hu Y. TGF β 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Mol Med.* 2021;48(1):1–14. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4965>
31. Kreuter M, Lederer DJ, Molina-Molina M, et al. Association of angiotensin modulators with the course of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2019;156(4):706–714. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.04.015>
32. Shi Y, Liu T, Yao LI, et al. Chronic vitamin D deficiency induces lung fibrosis through activation of the renin-angiotensin system. *Sci Rep.* 2017;7(1):3312. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03474-6>
33. Cao H, Wang C, Chen X, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells and pulmonary fibrosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):13644. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28968-9>
34. Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal transduct target ther.* 2022;7(1):3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
35. Chen X, Shi C, Meng X, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating the expression of TGF- β 1 and FGF-2. *Exp Mol Pathol.* 2016;101(1):22–30. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.04.003>
36. Shi J, Li F, Luo M, et al. Distinct roles of Wnt/ β -catenin signaling in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017(1):3520581. <https://doi.org/10.1155/2017/3520581>
37. Fang Y, Tian J, Fan Y, et al. Latest progress on the molecular mechanisms of idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Biol Rep.* 2020;47(12):9811–9820. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06000-6>
38. Xiong XR, Tian XL, Huo RJ, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits transforming growth factor β 1-induced epithelial-mesenchymal transition via β -catenin pathway. *Chin Med J.* 2020;133(11):1298–1303. <https://doi.org/10.1097/CM9.00000000000000830>
39. Huang Y, Wang L, Jia XX, et al. Vitamin D alleviates airway remodeling in asthma by down-regulating the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2019;68:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.061>
40. Pieniążek M, Donizy P, Ziętek M, et al. Rola szlaków sygnalizacyjnych związanych z TGF- β w patogenezie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) jako głównego elementu warunkującego progresję choroby nowotworowej. *Postepy Hig Med Dosw (online).* 2012;66:583–591.
41. Sobczak M, Pawliczak R. Does vitamin D work synergistically with anti-asthmatic drugs in airway remodeling? *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):12798. <https://doi.org/10.3390/ijms232112798>