

DOI: 10.21802/artm.2023.2.26.40

УДК 616-092+616.24+616-018.2+616-08+616-092.9

КОМПЛЕКСНИЙ ВПЛИВ ВІТАМІНУ Д3 ТА АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛ АЦЕТАТУ НА МІКРОЦИРКУЛЯТОРНЕ РУСЛО ЛЕГЕНЬ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНДУКУВАННІ СИСТЕМНОЇ СКЛЕРОДЕРМІЇ

Б.В. Доскалюк, Л.М. Заяць

*Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра патофізіології,**м. Івано-Франківськ, Україна,**ORCID ID: 0000-0003-1650-8928;**ORCID ID: 0000-0003-3265-1273;**e-mail: doskaliuk_bo@ifnmu.edu.ua*

Резюме. Мета. Оцінити вплив вітаміну Д3 (віт Д) та альфа-токоферол ацетату (віт Е) на стан судин мікроциркуляторного русла легень під час експериментального моделювання ССД.

Методи. Дослідження проводилося на статевозрілих щурах лінії Wistar масою 220-240 г. Тварин було розподілено на чотири групи: інтактна, контрольна та дві експериментальні групи. Інтактні тварини не зазнавали жодного впливу, а особини з контрольної групи отримували підшкірні ін'єкції ізотонічного розчину у відповідності до схеми моделювання ССД. Лабораторним щурам в експериментальній групі 1 було індуковано ССД шляхом введення ін'єкцій NaClO 0,5 мл 5% підшкірно тричі на тиждень впродовж шести тижнів поспіль. Тваринам експериментальної групи 2 окрім зазначеної схеми моделювання ССД було проведено корекцію віт Д та Е. Розчини вказаних препаратів вводили внутрішньом'язово в розрахунку на масу щура: розчин віт Е – 10 мг/100г та розчин віт Д – 1000 МО/100 г, відповідно. Введення препаратів для корекції патологічних змін здійснювали паралельно із моделюванням ССД, через 3 тижні від початку експерименту. Загалом дослідження тривало 8 тижнів, після чого оцінювалися його результати.

Результати. У ході проведення морфологічного аналізу зразків тканин легень було виявлено, що комплексне застосування віт Д та Е позитивно вплинуло на стан мікроциркуляторного русла легень у тварин з індукованою ССД. Вдалося встановити зменшення інтенсивності процесів ремоделювання судинного русла легень та поліпшення функціональних показників ендотелію. Спостерігалась тенденція до зменшення периваскулярного набряку та покращення реологічних властивостей крові.

Висновки. Дослідження підтверджує ефективність комплексного застосування віт Д та Е для корекції гемомікроциркуляторних порушень при експериментально індукованій системній склеродермії. Дані результати відкривають перспективи для подальших досліджень у цьому напрямку.

Ключові слова: експериментальне дослідження, легені, системна склеродермія, ендотеліальна дисфункція, морфологія.

Вступ. Системна склеродермія (ССД) – це аутоімунне захворювання сполучної тканини, у якому переважають функціональні та структурні аномалії судин і поступовий фіброз шкіри та внутрішніх органів. Найбільш важким наслідком склеродермії є ураження легень, яке виникає внаслідок аутоімунного запалення, фіброзу, потовщення стінок альвеол та інтими судин, ураження плеври [1].

Обґрунтування дослідження. Окрім фіброзу та імунної дисрегуляції, порушення мікроциркуляції є центральним компонентом у розвитку ССД. Істотне значення для місцевого та системного патогенезу захворювання мають мікроциркуляторні порушення, зумовлені пошкодженням судинної стінки та зміною реологічних властивостей крові [2]. Судинні аномалії мікроциркуляції є ключовими в діагностичному процесі, прогностичній стратифікації та довгостроковому моніторингу пацієнтів з ССД.

При ССД ендотеліальна дисфункція (ЕД) відіграє значну роль у розвитку ураження легень, яке може варіювати від легких до тяжких проявів. Ендотеліальна дисфункція в легеневих артеріях сприяє розвитку васкулопатії, включаючи проліферацію інтими, звуження просвіту та оклюзію судин. Ці структурні

зміни призводять до зниження кровотоку, порушення обміну кисню та розвитку легеневої гіпертензії та фіброзу [3]. Окрім цього, порушення функції ендотелію може призвести до аномальної вазореактивності, що зумовлює невідповідну вазоконстрикцію або недостатню вазодилатацію. Описані розлади сприяють розвитку легеневої гіпертензії (ЛГ), що супроводжується звуженням просвіту судин, надмірною проліферацією клітин гладких м'язів у легеневих артеріях і патологічним ремоделюванням кровоносних судин. Ці зміни призводять до звуження легеневих артерій, підвищення опору легеневих судин і підвищення тиску в легеновому колі кровообігу [4]. Як наслідок розвиватиметься перенапруження правих відділів серця та потенційно – серцева недостатність.

На додачу, ЕД відіграє ключову роль у розвитку та прогресуванні легеневого фіброзу, сприяючи запаленню, активації фібробластів й аномальному відкладенню колагену в легеневій тканині. Порушення мікроциркуляції зумовлює гіпоксію тканин і вивільнення прозапальних і профіброзних факторів, що ще більше загострює фіброзний процес [5].

Порушення функціональної здатності легень та розвиток серцевої недостатності ведуть до різкого

зниження якості життя пацієнтів та їх інвалідизації, що є значним соціо-економічним тягарем як для пацієнтів, так і для медичної системи загалом [6].

Хоча патологічні зміни в мікроциркуляторному руслі шкіри у хворих на ССД відносно легко дослідити, оцінка стану мікросудин легеневої системи в клінічній практиці залишається складною. Особливо важливо також зазначити, що незважаючи на клінічну значущість мікроциркуляторних порушень, досі не розроблено чіткої уніфікованої схеми їхнього менеджменту.

Мета дослідження. Проаналізувати комплексний вплив вітаміну Д3 (віт Д) та альфа-токоферол ацетату (віт Е) на стан судин мікроциркуляторного русла легень під час експериментального моделювання ССД.

Матеріали і методи. Методологія даної роботи визначена відповідно до оновлених рекомендацій ARRIVE 2 щодо звітності про дослідження на тваринах [7].

Піддослідні тварини, їх утримання, догляд та нагляд

У ході проведення експериментального дослідження було використано статевозрілих щурів лінії Wistar вагою 220-240 г, отриманих з віварію Івано-Франківського національного медичного університету (ІФНМУ). Упродовж усього терміну експерименту піддослідні тварини перебували в приміщенні віварію ІФНМУ в індивідуальних одноярусних пластикових клітках з верхньою відкидною стінкою у вигляді металевого каркаса з сіткою. Приміщення належним чином провітрювали та освітлювали, температура повітря становила +20-+24 °C, відносна вологість – 45-65%. Щоб забезпечити чистоту та гігієну, щоденні процедури прибирання включали регулярну зміну підстилки з деревної стружки та миття поїлок та годівниць. Додатково клітки щотижня дезінфікували 2% розчином формаліну.

Усі процедури на тваринах проводились із суворим дотриманням біоетичних принципів медичної та біологічної експериментальної роботи, як це передбачено положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для досліджень та інших наукових цілей. Дослідження схвалено комісією з етики ІФНМУ за № 117/20 від 19.11.20.

Дизайн дослідження

Для цілей нашого дослідження ми розподілили піддослідних тварин на чотири окремі групи: інтактну групу (ІГ), що складається з 15 тварин, контрольну групу (КГ) з 20 тварин, експериментальну групу 1 (ЕГ1) та експериментальну групу 2 (ЕГ2), що складалась із 25 тварин кожна. Рандомізація груп була ретельно виконана з використанням методу мінімізації розбіжностей ваги. Щоб забезпечити максимальну точність проведених інструментальних та лабораторних методів дослідження, ми проводили відбір зразків матеріалу вранці, перед їх щоденним годуванням, таким чином знижуючи ризик будь-яких потенційних побічних ефектів, спричинених щоденним ритмом і біологічною активністю тварин.

Методологія рандомізації

Щоб зменшити ризик можливих помилок під час втручання, тварин з однієї групи було розміщено в спільних маркованих клітках. Процес втручання не

можна було замаскувати, оскільки ізотонічний розчин і гіпохлорит натрію (NaClO) мають видимі відмінності, а інтактна група взагалі не потребувала втручання. Тим не менш, кожен зразок крові чи тканини лабораторних тварин був закодований окремо для забезпечення чистоти проведення лабораторних досліджень та мікроскопії. Крім того, різні групи в експерименті були випадково закодовані (група Х, група Y, група Z, група W), щоб зменшити будь-яку упередженість у ході статистичного аналізу.

Моделювання ССД

Нами було проведено індукцію ССД у піддослідних тварин наступним методом: тварини отримували підшкірні ін'єкції 0,5 мл 5% NaClO тричі на тиждень протягом 6 тижнів поспіль, як повідомлялося раніше [13]. Контрольна група лабораторних щурів отримувала ізотонічний розчин за такою ж схемою введення. Лабораторні тварини ІГ не піддавалися ятрогенному впливу. Лабораторним тваринам з ЕГ №2 крім NaClO вводили розчин віт Е 10мг/100 г маси тіла внутрішньом'язово та розчин віт Д 1000 МО/100 г маси тіла внутрішньом'язово протягом 3 тижнів (друга половина експерименту). Дослідним, контрольним та інтактним групам провели евтаназію шляхом декапітації через 8 тижнів від початку експерименту під тіопенталовим наркозом (внутрішньом'язово в дозі 10 мг/100 г маси щура).

Обсяг вибірки

Оскільки це було пілотне дослідження, для розрахунку розміру вибірки було використано метод «обрахунку ресурсів» [8]. $E = (15 \times 4) - 4 = 56$, що більше ніж 20, тому розмір вибірки можна вважати достатнім для цього дослідження. Крім того, ми взяли до уваги очікуване виснаження або загибель тварин. Враховуючи відносно тривалий період проведення експерименту та модифікацію раніше описаного методу [9], скоригований розмір вибірки для експериментальної групи становив 25 (15/0,6) особин.

Гістологічне дослідження

Гістологічні дослідження проводили на зразках легеневої тканини як контрольної, так і дослідної груп. Зразки тканин фіксували в 10% нейтральному формаліні впродовж 14 днів з багаторазовою зміною фіксуючого розчину для забезпечення належної фіксації. Після попереднього промивання зразки тканин зневоднювали в серії спиртів зростаючої концентрації, заливали в парафін і нарізали на санному мікромомі на зрізи 5-7 мкм. Потім зрізи депарафінізували і фарбували гематоксиліном й еозином. Гістологічні препарати оглядали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа Leica DME, цифрової камери для мікроскопа DCM 900 та камери Nikon Coolpix P5100.

Електронно-мікроскопічне дослідження

Забір зразків легеневої тканини для електронної мікроскопії проводили під кетаміновою анестезією з нижньої частки лівої легені. Процедура збору відповідає стандартним протоколам щодо швидкості та атравматичності. Зразки розміром 1x1x1 мм фіксували в 2,5% розчині глутарового альдегіду в 0,1М фосфатному буфері з рН 7,4 протягом 1 години з наступним промиванням у цьому ж буфері. Потім проводили фіксацію чотириокисом осмію з дегідратацією в етиловому спирті зростаючих концентрацій. При дегідратації в 70° спирті тканинні блоки контрастували в 2% розчині ураніацетату. Тонкі зрізи товщиною 20-50 нм

виготовляли на ультрамикротомі «Tesla VS-490», і контрастували 2% розчином ураніацетату в 70° спирті і розчином Рейнольдса. Матеріал досліджували на електронному мікроскопі «ПЕМ-125К» (Selmi, Україна) та фотографували при збільшеннях від 2000 до 20000 разів.

Результати дослідження. При гістологічному аналізі препаратів легень тварин КГ морфологічна структура досліджуваних особин відповідала нормі (рис. 1). Натомість препарати ЕГ1 характеризувались наявністю порушення структури гемокапілярів легень. Спостерігалось звуження просвіту мікросудин за рахунок потовщення судинної стінки внаслідок набряку та периваскулярної інфільтрації

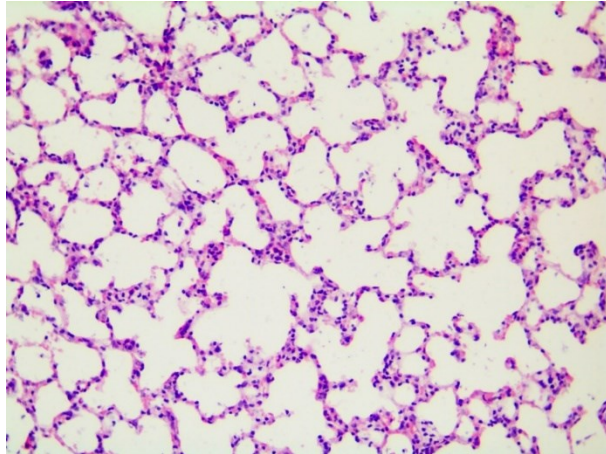


Рис. 1. Гістологічний аналіз зразку легень тварини з контрольної групи. Світлова мікроскопія. Гематоксилін і еозин $\times 200$ [10]

поліморфноядерними клітинами (рис. 2а, 2б). Гістологічна картина зразків тканин лабораторних щурів, які зазнали впливу віт Д та Е, відзначалась тенденцією до покращення. На рис. 3 візуалізується помітне зменшення набрякових процесів у периваскулярному просторі. Інфільтрація поліморфноядерними клітинами зберігається, але її інтенсивність знизилась.

При електронномікроскопічному дослідженні зразків легень особин ЕГ1 було ідентифіковано присутність адгезії та агрегації тромбоцитів (рис. 4), а також агрегати еритроцитів в просвіті гемокапілярів (рис. 5). Унаслідок набухання ендотеліоцитів й агрегації формених елементів помітно звужувався просвіт багатьох гемокапілярів.

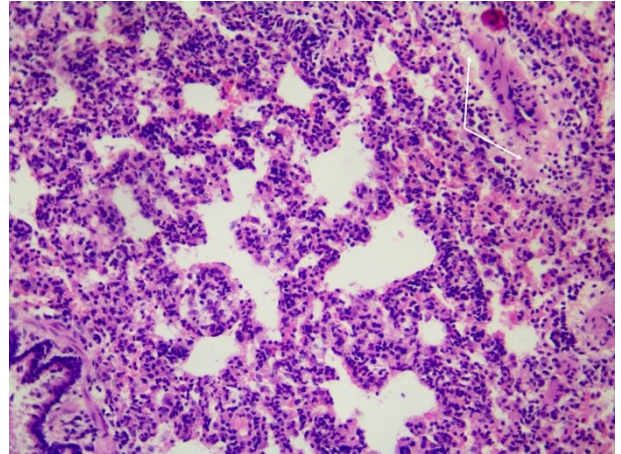


Рис. 2а. Гістологічний аналіз легеневої тканини після багаторазового введення NaClO. Периваскулярний набряк гемокапіляра. Світлова мікроскопія. Гематоксилін і еозин $\times 400$ [10]

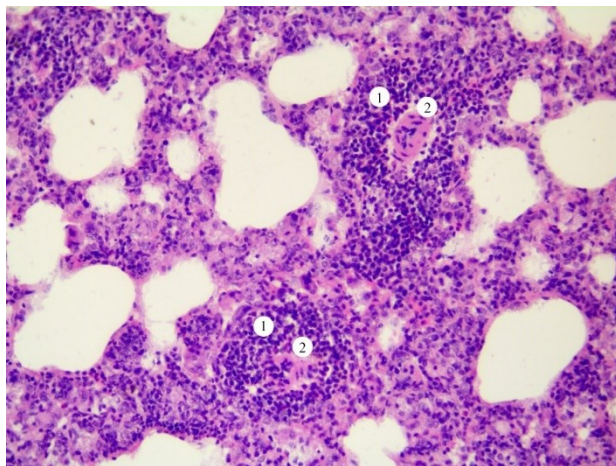


Рис. 2б. Гістологічний аналіз легеневої тканини після багаторазового введення NaClO. Ремоделювання стінки гемокапіляра. Світлова мікроскопія. Гематоксилін і еозин $\times 400$ [10]

Позначення: 1. Периваскулярна інфільтрація поліморфноядерними клітинами. 2. Потовщення стінки мікросудин.

Варто також зазначити, що базальна мембрана гемокапілярів характеризувалась нерівномірним потовщенням з нечіткими контурами. У периферичних частинах ендотеліоцитів були присутніми численні мікропіноцитозні везикули та вакуолі. В окремих гемокапілярах спостерігалися ділянки лізису

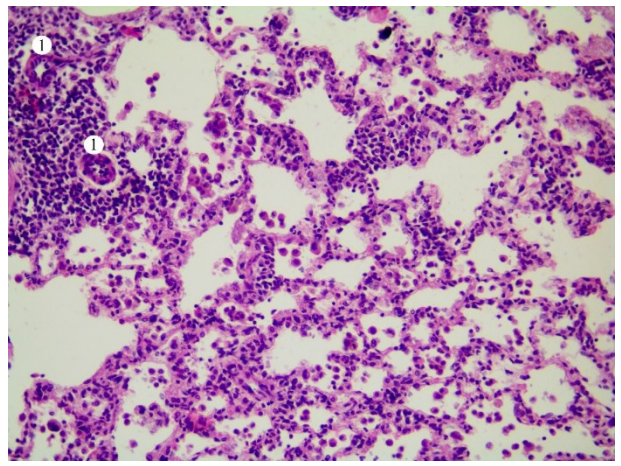


Рис. 3. Світлова мікроскопія препарату легеневої тканини після корекції вітаміном Д та Е. Світлова мікроскопія. Гематоксилін і еозин $\times 400$.

Позначення: 1. Незначний набряк стінки гемокапіляра.

люменальної плазмолемі периферичної частини ендотеліальних клітин, що провокувало вихід внутрішньоклітинного вмісту в просвіт мікросудин.

При застосуванні комбінації віт Д та Е вдалось досягти позитивного ефекту, зумовленого покращенням реологічних властивостей крові та

ультраструктурної характеристики елементів гемомікроциркуляторного русла легень. У просвіті гемокapілярів візуалізувались поодинокі еритроцити та неактивні тромбоцити. Структура ендотеліальних клітин не відзначалась значними альтераціями. Люменальна поверхня клітинної мембрани характеризувалась наявністю чітких контурів та відсутністю мікропіноцитозних пухирців чи цитоплазматичних виростів. У ядрах ендотеліоцитів спостерігалась наявність дрібнозернистого матриксу з рівномірно розподіленими гранулами хроматину. Ядерна оболонка утворювала поодинокі неглибокі інвагінації.

Обговорення результатів. Наше дослідження надає оригінальні дані щодо особливостей

ранніх проявів мікроангіопатії легеневої судин в доклінічній моделі ССД та описує результати корекції вказаних змін препаратами віт Д та Е. Наскільки нам відомо, це перше експериментальне дослідження, спрямоване на виявлення ефектів комбінованої терапії з використанням віт Д і Е на лабораторних тваринах з індукованим ураженням легень, асоційованим із ССД. Хоча віт Д і віт Е окремо вивчалися як можливі варіанти патогенетичного лікування ССД, дані щодо їх спільного впливу на легеневу систему й на стан гемомікроциркуляції обмежені. Наше дослідження показало, що комбінація віт Д і Е позитивно вплинула на стан мікроциркуляторного русла легень.

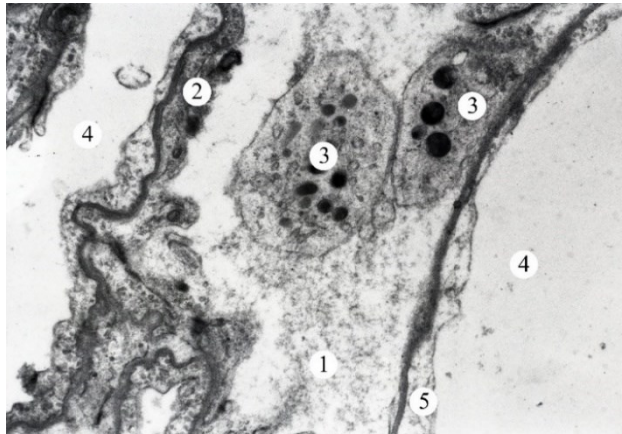


Рис. 4. Ультраструктурні зміни гемокapілярів альвеолярної стінки при індукції системної склеродермії. Електронна мікрофотографія. Збільшення x 9600.

Позначення: 1 – просвіт гемокapіляра; 2 – периферична частина ендотеліоцита; 3 – тромбоцит; 4 – альвеолярний просвіт; 5 – периферична частина альвеола цита І типу.

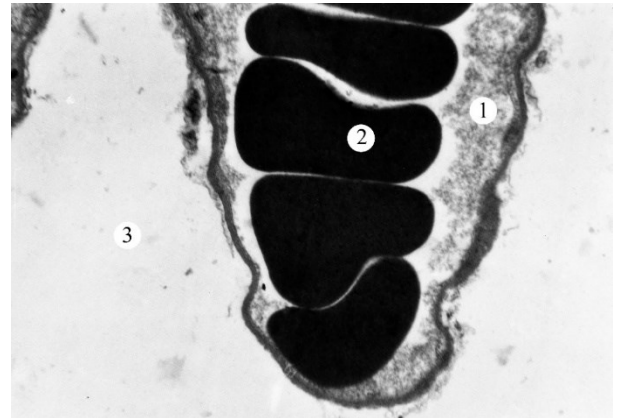


Рис. 5. Сладж еритроцитів у просвіті гемокapіляра стінки альвеоли. Електронна мікрофотографія. Збільшення x 6400.

Позначення: 1 – просвіт гемокapіляра; 2 – еритроцит; 3 – альвеолярний просвіт.

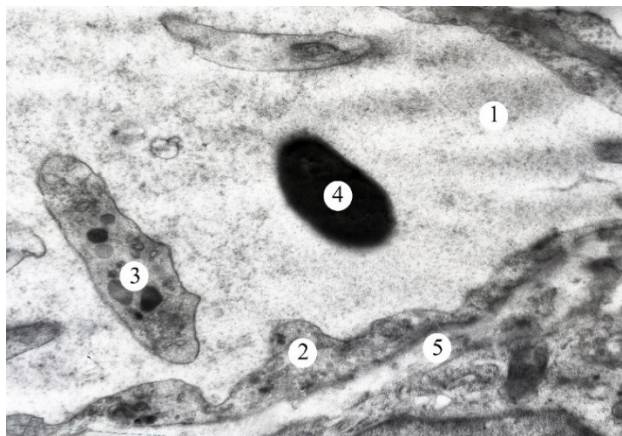


Рис. 6. Ультраструктурна організація гемокapіляра міжальвеолярної перегородки в ході корекції препаратами вітаміну Д та Е. Електронна мікрофотографія. Збільшення x 9600.

Позначення: 1. Просвіт гемокapіляра; 2. Периферійна частина ендотеліоцита; 3. Тромбоцит; 4. Еритроцит; 5. Базальна мембрана.

У ході проведення експерименту, досліджувані патологічні зміни були викликані NaOCl, який розкладається з утворенням гіпохлорної кислоти (HOCl) [10]. Попередні дослідження встановили, що

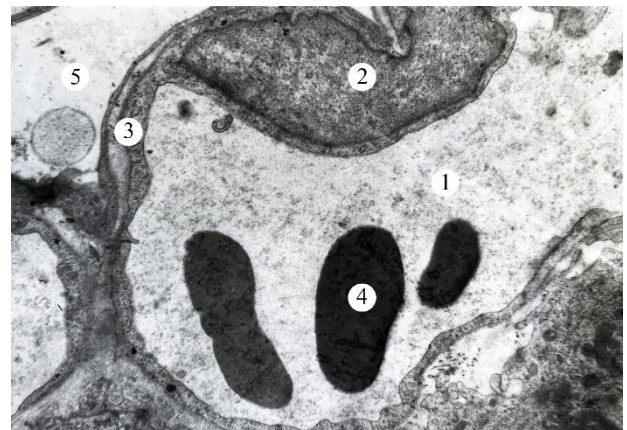


Рис. 7. Субмікроскопічні зміни гемокapіляра стінки альвеоли після корекції вітамінами Д та Е. Електронна мікрофотографія. Збільшення x6400.

Позначення: 1. Просвіт гемокapіляра; 2. Ядро ендотеліоцита; 3. Периферійна частина ендотеліоцита; 4. Еритроцит; 5. Просвіт альвеоли.

НОСІ пошкоджує ендотеліальні клітини, про що свідчить велика кількість ендотеліальних мікрочастинок, зростання рівня sVCAM-1 і sE-селектину, знайдених у

крові лабораторних тварин, які зазнали впливу НОСІ [9].

Молекула адгезії судинних клітин 1 є білком, який бере участь у міжклітинній адгезії та функціонуванні імунної системи. При ССД експресія VCAM-1 на поверхні ендотеліальних клітин посилюється, що може сприяти пошкодженню мікроциркуляції. Zanin-Silva та ін. встановили, що підвищена експресія VCAM-1 пов'язана з судинною дисфункцією та активацією ендотеліальних клітин у пацієнтів з ССД [11]. Ці дані знаходяться в повній відповідності до результатів нашого експерименту, оприлюднених раніше [10]. Нам вдалося підтвердити вищу концентрацію VCAM-1 у плазмі крові експериментальних тварин у порівнянні з контролем (91.25 [85.00-264.98] та 19.50 [13.53-22.20] відповідно, $p < 0.05$), що є доказом активації ендотеліальних клітин на функціональному рівні в рамках цієї моделі. Поряд із підвищенням концентрації VCAM-1 ми спостерігали наявність ремоделювання гемокапілярів легень, що супроводжувалось звууженням просвіту мікросудин унаслідок потовщення судинної стінки внаслідок набряку та периваскулярної інфільтрації поліморфноядерними клітинами [10].

Комплексне застосування віт Д та Е сприяло зменшенню інтенсивності процесів ремоделювання судинного русла легень в експериментальних тварин. Вітамін Е є потужним внутрішньоклітинним антиоксидантом, який має здатність інгібувати процеси пероксидного окислення ліпідів, пригнічуючи синтез активних форм кисню (АФК) [12]. Вітамін Д, у свою чергу, володіє цілою низкою гетерогенних властивостей. Відомо, що віт Д відіграє не лише важливу роль у регуляції цитокінового гомеостазу в організмі, а й здатен чинити вплив на функціональний стан ендотеліоцитів [13]. Імовірно, саме ці властивості вказаних вітамінів дозволили досягти покращення морфологічної картини зразків легень експериментальних тварин.

Поряд із позитивним ефектом на структурному рівні, нами було показано також покращення функціональних показників ендотелію [14]. Було встановлено статистично достовірне зниження концентрації VCAM-1 у плазмі крові лабораторних тварин, які отримували віт Д та Е (91.25 [85.00-264.98] у порівнянні з 44.05 [23.40-48.13]). Отже, наявність позитивного ефекту, підтвердженого як гістологічно, так і лабораторно, дозволяє припускати ефективність застосування віт Д та Е з метою корекції гемодинамічних порушень при індукованій ССД.

Це дослідження має певні обмеження. По-перше, обговорювані зміни були досліджені в умовах експерименту на тваринах і не можуть бути прямо екстрапольованими на пацієнтів із ССД. Крім того, ми не проводили імуногістохімічне дослідження та морфометрію для підтвердження наявності депозитів колагену або ідентифікації типів та кількісних характеристик клітин, що інфільтрують периваскулярний простір.

Таким чином, перспективи подальших досліджень будуть полягати в урізноманітненні методів морфо-функціонального аналізу початкових змін в структурах гемомікроциркуляторної системи легень та їх корекцію віт Д та Е в ході експериментальної індукції ССД.

Висновки. Отже, комплексне застосування вітамінів Д3 та альфа-токоферол ацетату чинить позитивний вплив на стан гемомікроциркуляторного русла легень при експериментально індукованій системній склеродермії, що проявляється покращенням реології крові, зниженням інтенсивності периваскулярного набряку та інфільтрації навколосудинного простору поліморфноядерними клітинами.

References:

1. Doskaliuk B, Zaiats L, Yatsyshyn R, Gerych P, Cherniuk N, Zimba O. Pulmonary involvement in systemic sclerosis: exploring cellular, genetic and epigenetic mechanisms. *Rheumatol Int.* 2020 Oct; 40(10):1555-1569. doi: 10.1007/s00296-020-04658-6.
2. D'Oria M, Gandin I, Riccardo P, Hughes M, Lepidi S, Salton F, et al. Correlation between Microvascular Damage and Internal Organ Involvement in Scleroderma: Focus on Lung Damage and Endothelial Dysfunction. *Diagnostics (Basel).* 2022 Dec 25; 13(1):55. doi: 10.3390/diagnostics13010055.
3. Saygin D, Highland KB, Tonelli AR. Microvascular involvement in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Microcirculation.* 2019 Apr; 26(3):e12440. doi: 10.1111/micc.12440.
4. Di Benedetto P, Ruscitti P, Berardicurti O, Vomero M, Navarini L, Dolo V, Cipriani P, Giacomelli R. Endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2021 Jul; 205(1):12-27. doi: 10.1111/cei.13599.
5. Cutolo M, Soldano S, Smith V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019 Jul; 15(7):753-764. doi: 10.1080/1744666X.2019.1614915.
6. Chen Y, Wu L, J Hernández-Muñoz J, J Miller M, Pope M, Huyan Y, Zhong L. The economic burden of systemic sclerosis-A systematic review. *Int J Rheum Dis.* 2022 Feb; 25(2):110-120. doi: 10.1111/1756-185X.14270.
7. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14; 18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
8. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013 Oct; 4(4):303-6. doi: 10.4103/0976-500X.119726.
9. Servetaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol.* 2009 May 1; 182(9):5855-64. doi: 10.4049/jimmunol.0803705.
10. Doskaliuk B, Zaiats L. Structural and functional characteristics of the pulmonary hemomicrocirculatory bed in induced systemic sclerosis: an experimental study. *Rheumatol Int.* 2023 Jul; 43(7):1341-1347. doi: 10.1007/s00296-023-05328-z.
11. Zanin-Silva DC, Santana-Gonçalves M, Kawashima-Vasconcelos MY, Oliveira MC. Management of Endothelial Dysfunction in Systemic Sclerosis: Current and Developing Strategies. *Front Med (Lausanne).* 2021 Dec 22; 8:788250. doi: 10.3389/fmed.2021.788250.
12. Rychter AM, Hryhorowicz S, Słomski R, Dobrowolska A, Krela-Kaźmierczak I. Antioxidant

- effects of vitamin E and risk of cardiovascular disease in women with obesity - A narrative review. Clin Nutr. 2022 Jul; 41(7):1557-1565. doi: 10.1016/j.clnu.2022.04.032
13. Tabrizi R, Akbari M, Lankarani KB, Heydari ST, Kollahdooz F, Asemi Z. The effects of vitamin D supplementation on endothelial activation among patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Nutr Metab (Lond). 2018 Nov 29; 15:85. doi: 10.1186/s12986-018-0320-9.
14. Daskaliuk B, Zaiats L, Yatsyshyn R. POS0483 The effect of vitamin D3 and α -tocopherol acetate in the pre-clinical model of systemic sclerosis. Annals of the Rheumatic Diseases 2022; 81:496. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.3061>

UDC 616-092+616.24+616-018.2+616-08+616-092.9
**THE COMPLEX EFFECT OF VITAMIN D AND
ALPHA TOCOPHEROL ACETATE ON THE
LUNG MICROCIRCULATION IN THE
EXPERIMENTAL INDUCTION OF SYSTEMIC
SCLEROSIS**

B.V. Daskaliuk, L.M. Zaiats

*Ivano-Frankivsk national medical university, Department of Pathophysiology, Ivano-Frankivsk, Ukraine,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1650-8928>;
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3265-1273>;
e-mail: daskaliuk_bo@ifnmu.edu.ua*

Abstract. The aim of the study was to investigate the effects of vitamin D3 (vitamin D) and alpha-tocopherol acetate (vitamin E) on the microcirculatory vessels of the lungs in an experimental model of systemic sclerosis (SSc).

Methods. We divided the experimental animals into four separate groups: an intact group (IG) consisting of 15 animals, a control group (CG) of 20 animals, experimental group 1 (EG1) and experimental group 2 (EG2) consisting of 25 animals each. Randomization of groups was carefully performed using the weight variance minimization method. To induce SSc in laboratory animals of EG1, subcutaneous injections of 0.5 ml of 5% sodium hypochlorite (NaClO) were administered 3 times a week for 6 weeks in a row. The CG of rats received an isotonic solution following the same scheme, while the IG was not subjected to any injections. In addition to NaClO, the EG2 received intramuscular injections of vit E (10 mg/100 g)

and vit D (1000 IU/100 g) for three weeks during the second half of the experiment.

After 8 weeks, the animals were euthanized, and lung tissue samples were obtained for histological and electron microscopic analysis. The histological preparations were examined using light microscopy and photographed using a Leica DME light microscope, a DCM 900 digital microscope camera, and a Nikon Coolpix P5100 camera. Meanwhile, the electron microscopy was performed to visualize the ultrastructural characteristics of the lung tissue by use of "PEM-125K" (Selmi, Ukraine) with subsequent photography at magnifications from 2000 to 20000 times.

All animal procedures were carried out in strict compliance with bioethical principles. The Ethics Commission of the IFNMU granted approval for the study under document number 117/20 on November 19, 2020.

Results. The histological analysis of the lung specimens of CG animals showed a normal morphological structure. In the EG1, the lungs exhibited abnormalities in the structure of the hemocapillaries, including narrowing of the vessel lumen due to thickening of the vascular wall, edema, and infiltration of polymorphonuclear cells. However, in the EG2, there was an improvement in the histological features, with a reduction in edematous processes and a decrease in the intensity of polymorphonuclear cell infiltration.

The electron microscopic examination of the lung samples from EG1 animals revealed the presence of platelet adhesion and aggregation, as well as aggregates of erythrocytes within the hemocapillary lumen. Swelling of endothelial cells and narrowing of the hemocapillary lumen were also observed, along with uneven thickening of the basement membrane. In contrast, the combination of vitamins D and E in EG2 animals resulted in improved rheological properties of blood and ultrastructural characteristics of the hemomicrocirculatory elements. The lumen of the hemocapillaries contained single erythrocytes and inactive platelets. The endothelial cells' membranes showed minimal alterations, with clear contours and no micropinocytotic vesicles or cytoplasmic growths. The nuclei of the endothelial cells had a fine-grained matrix with evenly distributed chromatin granules.

Conclusions. This study proves that the combined use of vitamins D and E has a positive effect on the state of the microcirculatory vessels in the lungs of experimentally induced systemic sclerosis.

Keywords: experimental study, lungs, systemic sclerosis, endothelial dysfunction, morphology.

Стаття надійшла в редакцію 16.06.2023 р.

Стаття прийнята до друку 29.06.2023 р.