

Вплив експериментальної терапії на легеневий вміст гіпоксіїндуцибельного фактора-1 α та фактора росту судин при гострому легеновому запаленні у щурів

Д.С. Зяблицев¹, В.О. Костенко², В.В. Ліходієвський¹, В.В. Михайловська¹, А.І. Курченко¹

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;

²Полтавський державний медичний університет; e-mail: denis898@gmail.com

Гостре легеневе запалення характеризується критичною гіпоксією тканин, масивним запальним каскадом та мікросудинним тромбозом, що зумовлює високу летальність та легеневий фіброз, особливо при тяжких вірусних інфекціях, зокрема COVID-19. Ключовими регуляторами клітинної відповіді на гіпоксію є гіпоксіїндуцибельний фактор 1 α (HIF-1 α) та васкулоендотеліальний фактор росту (VEGF), надмірна активація яких призводить до патологічного ангіогенезу, підвищення проникності судин та формування легеневого фіброзу. Проведена оцінка ефективності експериментальної терапії, спрямованої на блокаду рецепторів до ангіотензинперетворювального ферменту-2 (ACE2), пригнічення запальної відповіді глюкокортикоїдами та попередження мікротромбозів гепариновим антикоагулянтом за їх впливом на вміст HIF-1 α та VEGF у легеневій тканині. Гостре легеневе запалення моделювали у щурів-самців лінії Вістар масою 190–220 г (n = 45) введенням у трахею капронової нитки та розчину ліпополісахариду (0,125 мкг/кг у 50 мкл фізіологічного розчину) на тлі розвитку системної запальної відповіді. З 5-го по 21-й день щурам інгаляційно вводили речовини, після чого проводили гістологічне дослідження легеневої тканини та визначення вмісту HIF-1 α і VEGF методом імуноблотингу. Встановлено, що застосування блокатора ACE2 камостату мезилату, метилпреднізолону та еноксапарину натрію суттєво знижувало вміст HIF-1 α у легенях порівняно з плацебо-контролем. Динаміка мономерної форми VEGF відповідала змінам HIF-1 α , проте знижувалася менш виражено. Морфологічно пригнічення HIF-1 α і VEGF відповідало зменшенню фіброзу. Застосовані препарати демонстрували різні ефекти: максимальне зниження вмісту HIF-1 α – камостат мезилат, VEGF-мономеру – еноксапарин натрію, фіброзу – метилпреднізолон. Виявлена відповідність зниження тканинного вмісту HIF-1 α /VEGF та зменшення запального пошкодження і фіброзу обґрунтовувала доцільність подальшої розробки таких терапевтичних підходів для попередження легневих запальних ускладнень.

Ключові слова: гостре легеневе запалення; легеневий фіброз; гіпоксіїндуцибельний фактор 1 α ; васкулоендотеліальний фактор росту; блокатор ACE2; метил преднізолон; еноксапарин натрію.

ВСТУП

Гостре легеневе запалення залишається провідною причиною летальності, особливо під час пандемії COVID-19, коли основним патофізіологічним механізмом виступає дифузне альвеолярне ушкодження з мікросудинним тромбозом [1]. Ключову роль у пристосуванні до гіпоксії та регуляції

запалення відіграє гіпоксіїндуцибельний фактор 1 α (HIF-1 α), який активує експресію васкулоендотеліального фактора росту (VEGF), посилюючи проникність судин та фіброз легень.

Сучасний підхід до терапії може передбачати вплив на кілька ланок патогенезу запалення легень. По-перше, блокада рецеп-

торів до ангіотензинперетворювального ферменту-2 (ACE2), який є вхідними воротами для вірусу SARS-CoV-2, може запобігти його інвазії та подальшому ушкодженню; дослідження доводять ефективність інженерних розчинних форм ACE2 для нейтралізації вірусу [2]. По-друге, глюкокортикоїди (наприклад, дексаметазон) пригнічують цитокіновий каскад, що підтверджено британським дослідженням RECOVERY Clinical Trials, де лікування знизило смертність у тяжких хворих з COVID-19 [1]. По-третє, антикоагулянтна терапія (низькомолекулярний гепарин) не лише зменшує ризик тромбоемболій, але й має протизапальні властивості, що підтверджується даними багатоцентрового рандомізованого клінічного дослідження HEP-COVID щодо зниження смертності серед пацієнтів з COVID-19 та дуже підвищеним вмістом D-димеру [3]. Отже, обґрунтування терапії, спрямованої на пригнічення сигнального шляху HIF-1 α /VEGF, є актуальним завданням для зниження летальності та профілактики фіброзу при гострому легеновому запаленні.

Метою дослідження було визначення впливу експериментальної терапії (застосування блокатора ACE2-рецепторів, метилпреднізолону і еноксапарину натрію) на стан гострого легенового запалення й вміст HIF-1 α та VEGF.

МЕТОДИКА

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами чинного законодавства України. Тварин утримували на стандартному раціоні в умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. На проведення дослідження було отримано дозвіл комісії з біоетики та академічної доброчесності Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 200 від 24.11.2025 р.).

Гостре легеневе запалення моделювали за раніше описаною методикою введенням у трахею капронової нитки (аспіраційна бронхопневмонія) на тлі розвитку системної запальної відповіді [4, 5]. Останнє виконували для загострення патологічного процесу в легенях за допомогою попереднього системного введення ліпополісахариду (ЛПС; “Sigma-Aldrich”, США; за 1 та 2 доби до оперативного втручання внутрішньоочередово у дозі 2,5 мкг/кг), а також – ендотрахеальної ін’єкції під час операції, після введення в трахею капронової нитки, у дозі 0,125 мкг/кг у 50 мкл фізіологічного розчину.

Для дослідження використано 45 щурів-самців лінії Вістар, масою 190–220 г, яких випадковим чином поділяли на дві групи: 1-ша – псевдооперовані, яким виконували всі хірургічні маніпуляції, крім введення у трахею капронової нитки та розчину ЛПС (контрольна; n = 5) та 2-га – з моделюванням гострого легеневого запалення (дослідна; n = 40). До 5-ї доби на тлі розвитку гострого легеневого запалення 11 тварин дослідної групи (27,5%) загинуло. На 5-ту добу тварин, що вижили (n = 29) випадковим чином розподілили на 4 підгрупи, яким надалі вводили розчини досліджених речовин за допомогою інгаляції: у підгрупі 1 – фізіологічним розчином (плацебо-контроль; n = 8); у підгрупі 2 – розчином блокатора ACE2-рецепорів камостату мезилату (ACE2 Inhibitor MLN-4760 CAS 305335-31-3; “EMD Millipore Corporation”; США; n = 7), у підгрупі 3 – розчином метилпреднізолону (фармпрепарат «Солу-Медрол»; “Pfizer”; США; n = 7) і у підгрупі 4 – розчином еноксапарину натрію (фармпрепарат «Клексан»; “SANOFI”; Франція; n = 7).

Розчини препаратів вводили інгаляційно на оригінальному приладі, у якому в маску, що щільно фіксувалася на голові тварини, подавали зволожене повітря, яке попередньо проходило через ємність із підігрітим фізіологічним розчином, що містив певний

препарат. Проведені розрахунки показали, що за 15 хв при атмосферному тиску 750–755 мм рт. ст., вологості повітря 55–60%, температурі розчину 37°C в маску у вигляді аерозолу подавали 0,04 г розчину, що у перерахунок на концентрацію препаратів у розчині становило для камостату мезилату 4 мкг, для метилпреднізолону – 5 мкг і для еноксапарину натрію – 4 мкг. Перерахунок на масу тіла дав змогу розрахувати дози препаратів, що отримувала кожна тварина під час однієї інгаляції тривалістю 15 хв, яка становила для камостату мезилату і еноксапарину натрію 20 мкг/кг, для метилпреднізолону – 25 мкг/кг. Дози препаратів були підібрані, виходячи з інструкцій для відповідних фармакологічних препаратів.

Інгаляції проводили щоденно, починаючи з 5-ї доби після операції. Протягом 3 тиж після операції визначали загальний стан тварин, ректальну температуру, ступень ціанозу, наявність задишки, частоту дихальних рухів, аускультативні прояви. Тварин виводили з експерименту на 21-шу добу спостереження під глибоким тіопенталовим знеболюванням. Розтинали грудну порожнину, легені відсепаровували та поміщали в 10%-й розчин нейтрального формаліну. Серійні парафінові зрізи забарвлювали гематоксином та еозином, а також для виявлення сполученої тканини – за Ван Гізоном та азанотрихром (за Гейденгайном). Світлову мікроскопію проводили на світлооптичному мікроскопі «Olimpus BX 40» додатково обладнаному цифровою камерою «Olimpus C3030-ADU» та програмним забезпеченням «Olimpus DP-Soft».

Вміст VEGF і HIF-1 α у лізатах тканини визначали методом імуноблотингу. Зразки тканини витримували в скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували в 50 ммоль тріс-НСl-буфері (рН 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз («ThermoScientific», США). Електрофорез здійснювали у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію в камері для вертикального гель-електрофорезу («Bio-

Rad», США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до VEGF («Invitrogen», США, cat. no. MA5-12184, розведення 1:3000) і HIF-1 α («Sigma Aldrich», США, cat. no. HPA001275, розведення 1:2500). Антитіла до β -актину («Invitrogen», США, cat. no. MA5-15739, розведення 1:5000) використовували для його детекції як контролю нанесення протеїну. Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Invitrogen», США). Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, «Nonlinear Inc», США). Результати імуноблот-аналізу виражали в умовних одиницях від контрольного значення оптичної густини відповідної поліпептидної зони на блотограмі, нормованої за вмістом β -актину в кожному зразку.

Для статистичного аналізу застосовували програмне забезпечення Statistica 10 («StatSoft, Inc.», США). Розраховували середні та їх стандартні похибки. Вибіркові середні порівнювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA), вірогідними вважали значення при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Уже з перших годин післяопераційного періоду у тварин спостерігали змішану задишку із залученням дихальних м'язів і діафрагми. При аускультатії прослуховувалися вологі хрипи. Надалі стан тварин погіршувався, з 2-3-ї доби дихання ставало поверхневим, утрудненим, частим (до 102–150 хв⁻¹); з'являлися дистантні хрипи, аускультативно вислуховувалася крепітація; розвивався виражений ціаноз, млявість та зниження орієнтовно-рухової активності, була відмічена гіпертермія (37,9–38,9°C).

У лікованих тварин післяопераційний період проходив з меншою вираженістю клінічних симптомів, ніж у підгрупі плацебо-контролю, хоча також були наявні гіпертермія, ціаноз, задишка і вологі хрипи; крепітації не було. Меншою мірою ці явища проявлялися у тварин з введенням метилпреднізолону і еноксапарину натрію.

Як було встановлено нами раніше, при відтворенні такої моделі гострого запалення легень та відсутності лікування на 1-шу добу на тлі гострої легеневої недостатності загинуло 13,7% тварин, на кінець 3-ї доби – 37,8%, а до 14-ї доби рівень летальності становив 44,8% [5]. У цьому дослідженні зафіксовано загибель 11 тварин (27,5%) у термін до 5-ї доби післяопераційного періоду. Після початку інгаляційного лікування летальності у тварин всіх підгруп зафіксовано не було.

Динаміку морфологічних змін при розвитку гострого легеневого запалення описано нами в попередніх публікаціях [6]. Ендотрахеальне введення ЛПС швидко ініціювало в легенях гостре ексудативно-альтеративне запалення. На тлі системної запальної відповіді, яка була викликана попередньою внутрішньоочеревинною ін'єкцією ЛПС, ендотрахеальне його введення ініціювало активну місцеву гістіоваскулярну реакцію з підвищенням проникності судин та інтерстиціальним і внутрішньоальвеолярним набряком. Патологічний процес розвивався у напрямку гострого ексудативно-геморагічного запалення, що мало ознаки гіперімунної реакції з пошкодженням судин мікроциркуляторного русла та міжальвеолярних перетинок. На 14–21-шу добу наростали прояви продуктивного запалення, виявлявся дифузний фіброз паренхіми [6].

Морфологічна картина в підгрупі плацебо-контролю на 21-шу добу спостереження в цілому відповідала описаним проявам (рис. 1, I, а). Відзначалося повнокров'я судин мікроциркуляторного русла міжальвеолярних перетинок із тромбозом, місцями екстазія

венул. Стінка судинних структур середнього та дрібного калібру потовщена через набряк та осередки накопичення еозинофільних щільних мас, що відповідало формуванню фіброзу та, вірогідно, – відкладанню судинного гіаліну. Паренхіма легень із явищами дистелектазів – ателектатично змінені ділянки (з повним перекриттям альвеолярних просвітів) чергувалися з емфізематозно дилатованими альвеолами із стоншенням та розривами перетинок. Переважна більшість останніх мала ознаки фібробластичної активності з появою фібрилярної сітки в міжальвеолярних перетинках, що свідчило про їх фіброзування.

У вогнищах емфіземи деякі просвіти альвеол містили геморагічний ексудат, відмічено гіперплазію епітеліоцитів II типу. Просвіти бронхів мали вогнищеві ознаки транзиторної бронхоекстазії. Стінка бронхів інфільтрована нейтрофільними лейкоцитами, з домішкою мононуклеарів. Слизова оболонка бронхів та бронхіол з ознаками паренхіматозної дистрофії та гіперсекреторної активності (через гіперплазію респіраторного війкового епітелію та келихоподібних клітин), з осередками десквамації. У просвіті бронхів та бронхіол велика кількість змішаного ексудату, який був сформований слизом, еритроцитами, нейтрофілами, лімфоплазмодитарними клітинами і поодинокими макрофагами. Перибронхіально виражений інтерстиційний набряк та реактивна гіперплазія лімфоїдних фолікулів змішаного характеру. Подекуди в паренхімі легень наявні ділянки хронічного продуктивного запального процесу із формуванням резорбтивних гранульом. Вказані зміни свідчили про розвиток гострої бронхопневмонії з організацією у вигляді фіброзу паренхіми та осередками гіалінозу судин.

Дія блокатора ACE2-рецепторів камостату мезилату в цілому відповідала морфологічній картині гострої бронхопневмонії (див. рис. 1, I, б). Натомість, відмічено меншу ступінь фіброзування порівняно з підгрупою плацебо-контролю, альвеоли чисті від слизу

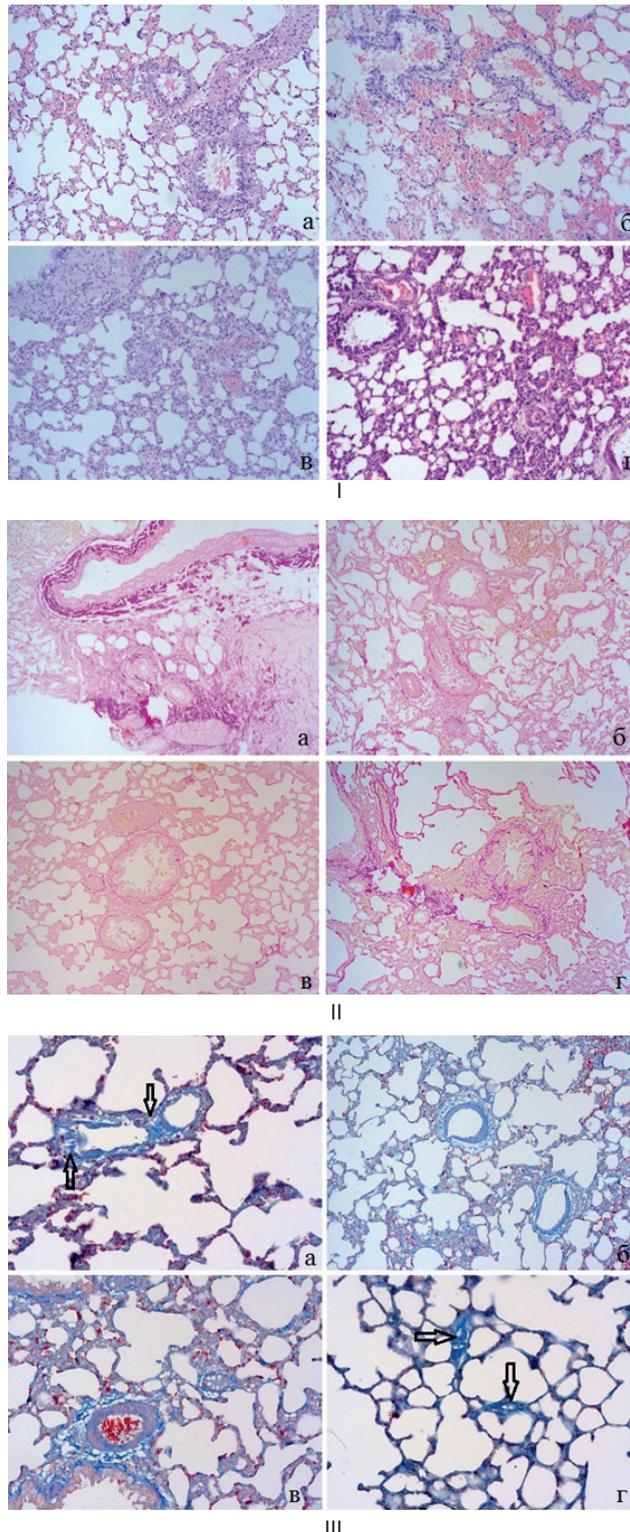


Рис. 1. Мікропрепарати легені щура з гострим запаленням, 21-ша доба. Забарвлення – гематоксилін-еозином (I, $\times 100$), за Ван-Гізеном (II, $\times 100$) і азантрихромом (III, $\times 200$): а – інгаляційне введення фізіологічного розчину (плацебо-контроль); б – камостату мезитату; в – метилпреднізолону; г – еноксапарину натрію

і клітинного дедриту, переважно емфізематозно дилатовані. Наявні ознаки реактивних змін альвеолоцитів завдяки епітеліоцитам I і II типів, що проявлялося клітинною гіперплазією. Також визначено активну гіперплазію респіраторного війкового епітелію та келихоподібних клітин слизової бронхів. Особливістю цієї підгрупи була виражена ектазія венул та їх повнокров'я. На наш погляд, наявна картина відповідала стадії активної тканинної регенерації після гострого легеневого запалення.

Інгаляції метилпреднізолону супроводжувалися більшою збереженістю морфологічної картини легень на термін 21-го дня (див. рис. 1, I, в). Такі патологічні прояви, як повнокров'я судин, тромбоз і ектазія венул, виражені дислектази паренхіми, дистрофія та десквамація епітелію бронхів та бронхіол були відсутні. Натомість спостерігалися реактивно-регенеративні зсуви – дифузне утворення мікрогранульом, перибронхіальних фолікулів, активна гіперплазія бронхіального епітелію. Це могло свідчити про домінування проліферативної стадії запалення з активною регенерацією паренхіми.

Інгаляція еноксапарину натрію також супроводжувалася меншими патологічними змінами (див. рис. 1, I, г). Натомість зберігалися помірні явища дилатації венул з мікротромбозом, гіаліноз судин, ділянки емфіземи з розривами альвеолярних перетинок. У паренхімі визначалася активна лімфоцитарна і макрофагальна інфільтрації, фібротичні зміни. Це могло свідчити про розвиток проліферативного запалення з фіброзом. Для уточнення впливу запропонованої терапії було застосовано забарвлення легень за Ван Гізоном (див. рис. 1, II). Як і очікувалося, найбільше фіброзування було визначено в підгрупі плацебо-контролю. Грубі товсті колагенові волокна, які мали різне спрямування та неупорядковану структуру, формували муфти навколо судин і бронхів, активно проростали в легенеvu паренхіму.

Серед лікованих тварин інтенсивність

забарвлення колагенових волокон була меншою, ніж у контролі, особливо при введенні метилпреднізолону і еноксапарину натрію (див. рис. 1, II). При цьому у підгрупі з інгаляцією метилпреднізолону колагенові волокна виявлялися в зовнішніх шарах судин і бронхів, більш тонкі еластинові волокна – у складі слизової бронхів і бронхіол. У разі введення еноксапарину натрію виявлено фіброзування стінок судин та бронхів, дифузне розростання колагенових волокон скрізь перибронхіальні фолікули, подекуди – фіброзування стінок альвеол та легеневої паренхіми. При інгаляції камостату мезилату (див. рис. 1, II, б) розподіл колагенових волокон був аналогічним іншим підгрупам, але загальна інтенсивність фіброзування була дещо більшою.

Оскільки спеціальне забарвлення азанотрихромом крім колагенових волокон дає змогу виявляти й більш тонкі ретикулінові, нами був застосований і цей метод (див. рис. 1, III). Результати в цілому відповідали таким при забарвленні за Ван Гізоном, але більше розділення дало можливість ідентифікувати утворення тонких волокон у міжальвеолярних перетинках і у альвеолах, там де їх зазвичай не існує. Наочно це можна було бачити в препаратах тварин підгруп плацебо-контролю (див. рис. 1, III, а) та при інгаляції еноксапарину натрію (рис. 1, III, г – білі стрілочки).

Таким чином, можна вважати, що зі зниженням інтенсивності патологічних проявів гострого легеневого запалення та інтенсивності фіброзу препарати розподілилися так: метилпреднізолон > блокатор ACE2-рецепторів камостат мезилат > еноксапарин натрію.

Оскільки глюкокортикоїди та гепарини активно застосовуються при лікуванні гострої пневмонії [1, 3], отримані результати обґрунтовували їхню дію та висвітлювали гістологічні механізми. Крім того, була показана перспективність подальшого дослідження блокади рецепторів ACE2.

В умовах коронавірусної хвороби вони є вхідними воротами вірусу [2], відповідно, їх блокада здається цілком обґрунтованою. Результати нашого дослідження показали, що інгаляції блокатора ACE2-рецепторів камостату мезилату також мали лікувальний ефект за умов гострого експериментального легеневого запалення. Це обґрунтовувало застосування цього підходу як додаткового ефективного заходу, що може, з одного боку, заблокувати інфікування клітин коронавірусом, а з іншого – має позитивні вплив при гострому легеневому запаленні.

Для оцінки можливих молекулярних механізмів лікувального ефекту запропонованої терапії було досліджено вміст у тканині легень протеїнів HIF-1 α і VEGF методом імуноблотингу. Раніше нами було показано, що при застосованій моделі гострого легеневого запалення у тканині легень суттєво зростає їх вміст [7]. Збільшення вмісту HIF-1 α на ранніх стадіях було відмічено вже з 1-ї та мало пік на 5-ту добу, що супроводжувалося розвитком гіпоксичноіндукованих морфологічних змін із подальшою активацією VEGF-опосередкованого ангіогенезу та формуванням патологічного фіброзу легеневої паренхіми.

У цьому дослідженні вміст HIF-1 α було оцінено в групах тварин на 21-шу добу. У тканині легень контрольної групи він не визначався (рис. 2). У підгрупі плацебо-контролю на 21-шу добу він був значно збільшеним порівняно з іншими підгрупами ($P < 0,001$). За умов лікування вміст HIF-1 α суттєво знижувався щодо значень плацебо-контролю (у 3,5–16,2 раза; $P < 0,05$). Найвищих значень він сягав при дії метилпреднізолону і еноксапарину натрію, найменших – камостату мезилату. Отже, всі препарати знижували у легенях вміст HIF-1 α , з максимальним ефектом при блокаді ACE2-рецепторів.

Вміст активної димерної форми VEGF не мав таких виражених коливань, як HIF-1 α (див. рис. 2). У підгрупі плацебо-контролю

він навіть дещо знижувався порівняно з контролем (у 1,3 раза; $P < 0,05$). Серед підгруп із лікуванням вміст VEGF-димеру найменшим був при дії метилпреднізолону, вищим – при впливі камостату мезилату ($P < 0,05$).

Вміст мономерної форми VEGF, яка характеризує його синтез, як і HIF-1 α , у контрольній групі майже не визначався (див. рис. 2). У групі плацебо-контролю він, подібно до HIF-1 α , багаторазово збільшувався ($P < 0,001$). Застосоване лікування суттєво зменшувало вміст VEGF-мономера (у 1,15–1,4 раза; $P < 0,05$ порівняно з плацебо-контролем). Найменшим він був у підгрупі з інгаляцією камостату мезилату та приблизно однаковим у інших двох підгрупах.

Отже, гостре запалення легень за умов відсутності лікування на 21-шу добу характеризувалося значним збільшенням утворення HIF-1 α та мономерної форми VEGF. Усі застосовані препарати суттєво зменшували їх вміст. При цьому на HIF-1 α більший вплив мав блокатор ACE2-рецепторів камостат мезилат, тоді як на мономерну форму VEGF – еноксапарин натрію.

Слід зазначити, що невелика кількість спостережень у цьому дослідженні не дала змогу отримати достатній рівень доказовості для кількісного порівняння ефекту різних препаратів. Експеримент мав характер попереднього пілотного проекту, який дав можливість виявити гальмування надмірної активності сигнального шляху HIF-1 α /VEGF при гострому легеневому запаленні через інгаляційне введення застосованих препаратів.

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати продемонстрували, що розвиток гострого запалення легень супроводжувався високим вмістом HIF-1 α та VEGF у легеневій тканині на 21-шу добу спостереження, що могло бути наслідком активації гіпоксичних механізмів пошкодження. Інгаляційне введення досліджуваних

препаратів достовірно знижувало їхній вміст порівняно з плацебо-контролем. Найбільший ефект спостерігався при застосуванні метилпреднізолону (зниження вмісту HIF-1 α у 16,2 раза), помірний – при використанні камостату мезилату (у 7,8 раза), найменш виражений – у підгрупі з еноксапарином натрію (у

3,5 раза). Аналогічна динаміка відзначалася для мономерної форми VEGF. Морфологічні дослідження підтвердили, що пригнічення шляху HIF-1 α /VEGF відповідало зменшенню інтерстиційного фіброзу та збереженню альвеолярної архітектоніки [5]. Ці результати узгоджувалися з попередніми даними, які по-

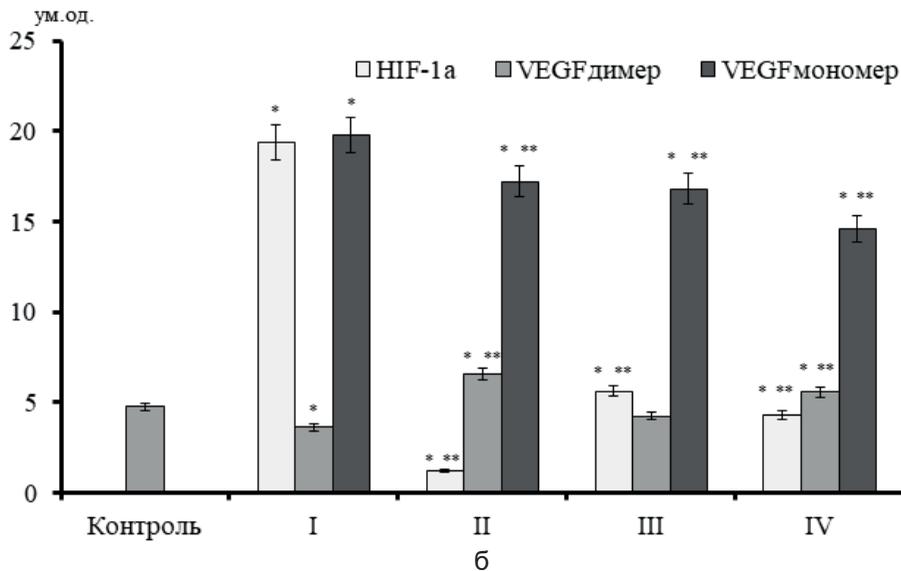
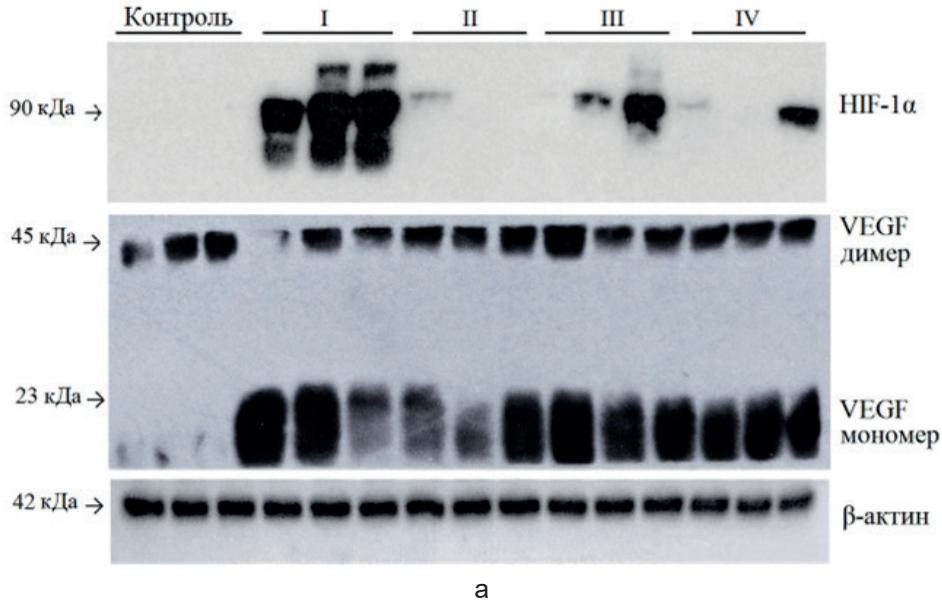


Рис. 2. Вміст у легеневій тканині гіпоксііндуцибельного фактора 1 α (HIF-1 α), димерної і мономерної форм васкулоендотеліального фактора росту у контролі та при інгаляції фізіологічного розчину (I), камостату мезилату (II), метилпреднізолону (III) і еноксапарину натрію (IV) на 21-шу добу; а – приклади репрезентативних блотограм β -актину, HIF-1 α , VEGF-димера і мономера; б – результати денситометрії зображень HIF-1 α і VEGF-димера і мономера (нормовані за β -актином; ум.од.); *P < 0,05 щодо контролю; **P < 0,05 щодо значень плацебо-контролю

казали, що пік експресії HIF-1 α на 5-ту добу ініціює VEGF-опосередкований патологічний ангиогенез і формування фіброзу [7].

Можливі механізми підвищення HIF-1 α при гострому запаленні. Підвищення вмісту HIF-1 α у легеневій тканині тварин відображає активацію універсального механізму клітинної адаптації до гіпоксії. При гострому легеновому запаленні це є наслідком локальної ішемії, спричиненої мікротромбозом капілярів, венулярною ектазією та геморагічним набряком паренхіми [7, 8]. У нашій експериментальній моделі саме ці мікроциркуляторні порушення могли створювати критичний дефіцит кисню, що ініціював каскад гіпоксичнозапальної відповіді. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що пік експресії HIF-1 α на 5-ту добу при цій моделі гострого легенового запалення збігався з фазою масивного повнокров'я, фібринових мікротромбозів і появою серозно-геморагічного ексудату в альвеолах, що підтверджувало прямий причинно-наслідковий зв'язок між ішемічними ураженнями та активацією HIF-1 α [7, 9, 10]. При цьому важливо, що він опосередковано активує NF- κ B-залежну експресію прозапальних цитокінів (інтерлейкіну-1 β , фактора некрозу пухлин α), стимулює хемотаксис нейтрофілів і пролонгує запальну реакцію, формуючи «зачароване коло», у якому запалення призводить до гіпоксії, а остання — до подальшої активації HIF-1 α і посилення запалення [8].

Згідно з нашими результатами лікування камостатом мезилатом, метилпреднізолоном і еноксапарином натрію знижувало вміст у легеневій тканині HIF-1 α у 3,5–16,2 рази, що морфологічно проявлялося зменшенням набряку, мікротромбозів і зон ішемічного некрозу. Таким чином, застосовані речовини здатні впливати на ключову ланку патогенезу – гіпоксичне ушкодження тканин, знижуючи як ступінь судинних порушень, так і вираженість вторинної запальної відповіді.

Збільшення експресії VEGF і його можливий зв'язок із фіброзом. У попередньому

дослідженні показано, що максимальне підвищення вмісту VEGF на 7-му добу гострого легенового запалення може бути наслідком активації шляху HIF-1 α [7]. Морфологічно цей критичний період відповідав переходу від ексудативно-геморагічного запалення до продуктивної фази з утворенням фібринової сітки, проліферацією фібробластів і початком колагеноутворення.

VEGF є одним із головних ефекторних генів HIF-1 α [11]. Він зв'язується з тирозинкіназними рецепторами VEGFR1 (Flt-1) і VEGFR2 (KDR), регулюючи проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, судинну проникність і секрецію сигнальних молекул [12]. Ці механізми забезпечують ангиогенез, стимулюють альвеолярні клітини II типу і продукцію сурфактанта, а також репарацію гіпоксично ушкодженої легеневої тканини.

Разом із покращенням мікроциркуляції та оксигенації VEGF підвищує судинну проникність, що спричиняє плазморагію, інтерстиціальний набряк і накопичення білкових компонентів позаклітинного матриксу [13]. Це створює сприятливе мікрооточення для активації фібробластів та ініціації фіброзу [11].

Ключова роль шляху HIF-1 α /VEGF у легеновому фіброгенезі підтверджена експериментально. У легневих фібробластах при ідіопатичному фіброзі легень виявлено надекспресію HIF-1 α та його мішеневих генів (VEGFA, SERPINE1, TIMP1), що супроводжувалося формуванням профібротичного фенотипу [14]. У блеоміциніндукованих моделях підвищення вмісту VEGF-A та CD31 у фіброзних ділянках корелювало зі зростанням VEGFR1; при цьому інгібування VEGFR1-тирозинкіназної сигналізації зменшувало тяжкість фіброзу й експресію фактора некрозу пухлин α , трансформуючого фактора росту- β , протеїну S100A4 і колагену I типу [15].

У гіпоксичних умовах VEGF також індукує ендотеліально-мезенхімний перехід – важливе джерело міофібробластів під час ремоделювання тканин [16]. Процес супро-

воджується активацією трансформуючого фактора росту β , фактора росту фібробластів, тромбоцитарного фактора росту і посиленням синтезом колагену. Показово, що в тканинах із мінімальними фіброзними змінами зберігається висока концентрація VEGF і щільна капілярна мережа, тоді як у зонах сформованого фіброзу він майже відсутній. Це підтверджує роль VEGF як маркера ранньої активної фази запалення з наступним переходом у фіброз [16].

Отримані нами морфологічні результати узгоджувалися з цією концепцією. Інтенсивне червоне (колагенове) забарвлення на препаратах контрольної групи (див. рис. 2, а) відповідало найвищому вмісту VEGF. Натомість у підгрупах з камостатом мезилатом, метилпреднізолоном та еноксапарином натрію колагенові волокна були тоншими й переважно перибронхіально розташованими (див. рис. 2, б–г), що відповідало зниженню вмісту VEGF-мономера. Менш виражений фіброз за результатами забарвлення за Ван-Гізеном та азантрихромом свідчив на користь антифібротичного ефекту застосованої терапії через пригнічення VEGF-залежної фази продуктивного запалення.

Аналіз впливу досліджених речовин на сигнальний шлях HIF-1 α /VEGF. Отримані результати демонстрували, що всі досліджені препарати ефективно пригнічували активацію гіпоксично-ангіогенного шляху HIF-1 α /VEGF, проте через відмінні механізми дії спостерігався різний ступінь морфофункціонального відновлення легеневої тканини. Камостат мезилат продемонстрував найпотужніший ефект щодо зниження вмісту HIF-1 α (в 16,2 раза порівняно з плацебо-контролем). Ця дія реалізувалася через блокаду ACE2-рецепторів і відповідну модуляцію ренін-ангіотензинової системи, що могло призвести до пригнічення NF- κ B-залежної експресії HIF-1 α [17]. Морфологічно це проявлялося ознаками активної регенерації без грубих структурних дефектів, що могло свідчити про ефективне блокування гіпоксичного каскаду.

Метилпреднізолон у цьому дослідженні показав суттєвий тканинний протизапальний та антифібротичний ефект. Відомо, що його вплив реалізується через пригнічення транскрипційної активності NF- κ B [18], що у нашому дослідженні, ймовірно, забезпечувало зниження вмісту як HIF-1 α , так і VEGF-мономера у цій підгрупі. Морфологічно було зафіксовано найкращу збереженість альвеолярної архітектоники, мінімальні ознаки інтерстиціального фіброзу та відсутність деструкції судин, що підтверджувало ефективність інгаляції метилпреднізолону для профілактики фіброзного ремоделювання.

Еноксапарин натрію реалізував опосередкований цитопротекторний ефект через покращення мікроциркуляції. Попередження мікротромбозів зменшувало тканинну гіпоксію, що могло обмежувати HIF-1 α -залежну експресію VEGF [19]. Найвираженіший ефект препарат мав на вміст мономерної форми VEGF, що морфологічно супроводжувалося помірними залишковими фіброзними змінами без істотного порушення альвеолярної структури.

Ефективність досліджуваних препаратів щодо зменшення фіброзу легеневої тканини зростала в такому порядку: підгрупа плацебо-контролю демонструвала суттєві фіброзні зміни, за нею слідувала підгрупа з еноксапарином натрію, потім – камостатом мезилату, тоді як найменша інтенсивність фіброзування спостерігалася в підгрупі з метилпреднізолоном.

На нашу думку, кожна речовина мала свою специфічну точку прикладання: камостат мезилат – блокада сенсорної ланки гіпоксичного каскаду, метилпреднізолон – пригнічення запальногіпоксичної ланки, еноксапарин натрію – корекція мікроциркуляторних порушень. Найвища загальна ефективність метилпреднізолону вказувала на провідну роль контролю запалення в гальмуванні активації шляху HIF-1 α /VEGF і профілактиці фіброзного ремоделювання при гострому легеневому запаленні.

Аналіз зв'язку морфологічних змін з активністю шляху HIF-1 α /VEGF. Як було показано, комплексна оцінка гістологічних препаратів виявила певну відповідність між вмістом у легеневій тканині HIF-1 α і VEGF та структурними змінами легеневої паренхіми. У наших попередніх дослідженнях динаміки вмісту HIF-1 α і VEGF при відсутності лікування гострого легеневого запалення показано, що пік експресії HIF-1 α на 3–5-ту добу супроводжувався вираженим повнокров'ям мікроциркуляторного русла, мікротромбозами та інтерстиціальним набряком [7]. Це формувало патогенетичне коло: ішемія та гіпоксія активували гіпоксичнозалежні механізми клітинного стресу, поглиблюючи кисневий дефіцит [20, 21]. Також за нашими даними за відсутності лікування гостре легеневе запалення на 7-му добу переходило у продуктивну фазу з активною проліферацією фібробластів, формуванням фібринозних сіток та ознаками неангіогенезу в перифокальних ділянках [7]. Наші результати збіглися з літературними даними та показували, що просторовий розподіл фіброзу може бути неоднорідним – мінімальним у центрах некрозу та максимальним у метаболічно активних перифокальних зонах [22].

У підгрупі плацебо-контролю на 21-шу добу спостерігався виражений пневмофіброз із формуванням грубих колагенових волокон, тоді як у всіх лікованих підгрупах відзначалося зменшення фіброзних відкладень і збереження альвеолярної архітектоніки. Позитивні зміни були максимально виражені в підгрупі з метилпреднізолоном, де колагенові волокна були тоншими та переважно перибронхіальної локалізації. Морфологічно на пізніх термінах спостерігалися тонкі фіброзні прошарки без ознак прогресуючого фіброзу. Такі зміни могли свідчити про активне структурне відновлення тканини [23].

Отже, зниження активності шляху HIF-1 α /VEGF відповідало зменшенню патоморфологічних змін. На наш погляд, при гострому легеневому запаленні HIF-1 α може слугувати

маркером гіпоксичного ушкодження, а мономерна форма VEGF відображає активність репаративних процесів та ризик патологічного фіброзоутворення.

ВИСНОВКИ

1. Інгаляційна терапія блокатором рецепторів ACE2 камостатом мезилатом, метилпреднізолоном та еноксапарином натрію суттєво знижувала вміст HIF-1 α у легенях на 21-шу добу порівняно з плацебо-контролем, з максимальним ефектом при застосуванні камостату мезилату.

2. Лікування зменшувало вміст мономерної форми VEGF, особливо при застосуванні еноксапарину натрію. Пригнічення шляху HIF-1 α /VEGF відповідало зменшенню фіброзу, що було більш виражено в підгрупі з метилпреднізолоном.

3. Результати вказують на перспективність терапії, що спрямована на зниження активності шляху HIF-1 α /VEGF при гострому легеневому запаленні. Різні механізми дії досліджених препаратів створюють основу для розробки нових підходів для зниження запального пошкодження та попередження фіброзних ускладнень.

Дослідження виконано за ініціативою кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

D.S. Ziablitsev¹, V.O. Kostenko², V.V. Mykhaylovska¹, V.V. Likhodievsky¹, A.I. Kurchenko¹

EFFECT OF EXPERIMENTAL THERAPY ON PULMONARY CONTENT OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1A AND VASCULAR GROWTH FACTOR IN ACUTE LUNG INFLAMMATION IN RATS

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv;

²Poltava State Medical University, Poltava;

e-mail: zsv1965@gmail.com

Acute lung inflammation is characterized by critical tissue hypoxia, a massive inflammatory cascade, and microvascular thrombosis, which leads to high mortality and pulmonary fibrosis, especially in severe viral infections, including COVID-19. Key regulators of the cellular response to hypoxia are hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF), excessive activation of which leads to pathological angiogenesis, increased vascular permeability, and the formation of pulmonary fibrosis. The effectiveness of experimental therapies aimed at blocking angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptors, suppressing the inflammatory response with glucocorticoids, and preventing microthrombosis with the anticoagulant heparin was evaluated based on their effect on HIF-1 α and VEGF content in lung tissue. Acute lung inflammation was modeled in male Wistar rats weighing 190-220 g (n = 45). From days 5 to 21, the rats were administered drugs by inhalation. After this, a histological examination of the lung tissue was performed, along with an immunoblotting analysis to determine the content of HIF-1 α and VEGF. It was found that the use of the ACE2 blocker camostat mesylate, methylprednisolone, and enoxaparin sodium reduced the content of HIF-1 α in the lungs compared to placebo. The dynamics of the monomeric form of VEGF corresponded to changes in HIF-1 α but decreased less pronouncedly. Morphologically, the HIF-1 α /VEGF inhibition corresponded to the fibrosis reduction. The drugs used demonstrated different effects: the maximum effect on HIF-1 α was observed with camostat mesylate, on the VEGF monomer was enoxaparin sodium, and on fibrosis was methylprednisolone. The revealed correlation between the reduction in tissue HIF-1 α /VEGF content and the reduction in inflammatory damage and fibrosis substantiated the feasibility of further developing these therapeutic approaches to prevent pulmonary inflammatory complications.

Key words: acute lung inflammation; pulmonary fibrosis; hypoxia-inducible factor-1 α ; vasculoendothelial growth factor; ACE2 blocker; methylprednisolone; enoxaparin sodium.

REFERENCES

1. Recovery Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Brightling C, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Green C, Felton T, Chadwick D, Rege K, Fegan C, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Montgomery A, Rowan

K, Juszczak E, Baillie JK, Haynes R, Landray MJ. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021 Feb 25;384(8):693-704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.

- Zhang L, Dutta S, Xiong S, Chan M, Chan KK, Fan TM, Bailey KL, Lindeblad M, Cooper LM, Rong L, Gugliuzza AF, Shukla D, Procko E, Rehman J, Malik AB. Engineered ACE2 decoy mitigates lung injury and death induced by SARS-CoV-2 variants. *Nat Chem Biol.* 2022 Mar;18(3):342-51. doi: 10.1038/s41589-021-00965-6.
- Spyropoulos AC, Goldin M, Giannis D, Diab W, Wang J, Khanijo S, Mignatti A, Gianos E, Cohen M, Sharifova G, Lund JM, Tafur A, Lewis PA, Cohoon KP, Rahman H, Sison CP, Lesser ML, Ochani K, Agrawal N, Hsia J, Anderson VE, Bonaca M, Halperin JL, Weitz JI. HEP-COVID Investigators. Efficacy and safety of therapeutic-dose heparin vs standard prophylactic or intermediate-dose heparins for thromboprophylaxis in high-risk hospitalized patients with COVID-19: The HEP-COVID Randomized Clinical Trial. *JAMA Int Med.* 2021 Dec 1;181(12):1612-20. doi: 10.1001/jamainternmed.2021.6203.
- Zyablitsev SV, Pensky PYu, Litvinets ML, Kovalova AV, Salamaha AA. Dynamics of morphological manifestations of the experimental acute aspiration bronchopneumonia development. *Morphologia.* 2021;15(1):48-59. [Ukrainian]. doi:10.26641/1997-9665.2021.1.48-59.
- Ziablitsev DS. Morphogenesis of pulmonary damage in lipopolysaccharide-induced acute aspiration bronchopneumonia. *Morphologia.* 2021;15(4):48-55. [Ukrainian]. doi:10.26641/1997-9665.2021.4.48-55.
- Ziablitsev DS, Dyadik OO, Tikhomirov AO, Tsvetkova MM, Ziablitsev SV. Changes in the content and features of localization of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) in acute experimental bronchopneumonia. *Fiziol Zh.* 2022;68(3):24-34. [Ukrainian]. doi:10.15407/fz68.03.024.
- Ziablitsev DS, Mykhailovska VV, Kurchenko AI. Dynamics of the content of hypoxia-inducible factor- α (HIF-1 α) and vascular growth factor (VEGF) in the pulmonary tissue during the development of hemorrhagic pneumonia with fibrosis. *Med Sci Ukr.* 2025;3(21):94-105. [Ukrainian]. doi:10.32345/2664-4738.3.2025.10.
- Lotsios NS, Keskinidou C, Karagiannis SP, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG, Kotanidou A, Dimopoulou I, Orfanos SE, Vassiliou AG. Expression and regulation of hypoxia-inducible factor signalling in acute lung inflammation. *Cells.* 2024 Dec 30;14(1):29. doi: 10.3390/cells14010029.
- Del Vecchio L, Locatelli F. Hypoxia response and acute lung and kidney injury: possible implications for therapy of COVID-19. *Clin Kidney J.* 2020 Sep 2;13(4):494-9. doi: 10.1093/ckj/sfaa149.
- Ruan H, Zhang Q, Zhang YP, Li SS, Ran X. Unraveling the role of HIF-1 α in sepsis: from pathophysiology to potential therapeutics - a narrative review. *Crit Care.* 2024

- Mar 27;28(1):100. doi: 10.1186/s13054-024-04885-4.
11. Evans CE. Hypoxia-inducible factor signaling in inflammatory lung injury and repair. *Cells*. 2022 Jan 6;11(2):183. doi:10.3390/cells11020183
 12. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1248-64. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
 13. Jászai J, Schmidt MHH. Trends and challenges in tumor anti-angiogenic therapies. *Cells*. 2019 Sep 3;8(9):1102. doi: 10.3390/cells8091102.
 14. Epstein Shochet G, Bardenstein-Wald B, McElroy M, Kukuy A, Surber M, Edelstein E, Pertzov B, Kramer MR, Shitrit D. Hypoxia inducible factor 1a supports a pro-fibrotic phenotype loop in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3331. doi:10.3390/ijms22073331.
 15. Amano H, Matsui Y, Hatanaka K, Hosono K, Ito Y. VEGFR1-tyrosine kinase signaling in pulmonary fibrosis. *Inflamm Regen*. 2021;41(1):16. doi:10.1186/s41232-021-00166-7.
 16. May J, Mitchell JA, Jenkins RG. Beyond epithelial damage: vascular and endothelial contributions to idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2023;133(18):e172058. doi:10.1172/JCI172058.
 17. Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp Mol Med*. 2019;51(6):1-13.
 18. Annese T, Ruggieri S, De Giorgis M, Ribatti D, Tamma R, Nico B. α -Methyl-prednisolone normalizes the PKC mediated brain angiogenesis in dystrophic mdx mice. *Brain Res Bull*. 2019;147:69-77.
 19. Liu Y, Xiang D, Zhang H, Yao H, Wang Y. Hypoxia-Inducible Factor-1: A potential target to treat acute lung injury. *Oxid Med Cell Long*. 2020;2020:8871476.
 20. Hanumegowda C, Mohan ME. Hypoxia inducible factor-1 α in pulmonary fibrosis: A promising therapeutic target. *Eur J Med Health Sci*. 2025 Mar;7(2):27-31. doi:10.24018/ejmed.2025.7.2.2256
 21. Xiang M, Jing H, Wang C, Novakovic VA, Shi J. Persistent lung injury and prothrombotic state in long COVID. *Front Immunol*. 2022 Apr 7;13:862522. doi:10.3389/fimmu.2022.862522
 22. Zhou J, Xia X, An X, Liu D, Zhao H, Sun Z, Li W, Huang Q. New perspectives on the progression of pulmonary fibrosis: the cascade from aberrant microvascular endothelial cell activation to fibrosis. *Front Med (Lausanne)*. 2025 Aug 21;12:1639043. doi:10.3389/fmed.2025.1639043
 23. da Silva FPG, Matte R, Wiedmer DB, da Silva APG, Menin RM, Barbosa FB, Meneguzzi TAM, Pereira SB, Fausto AT, Klug L, Melim BP, Beltrão CJ. HIF-1 α Pathway in COVID-19: A scoping review of its modulation and related treatments. *Int J Mol Sci*. 2025 Apr 28;26(9):4202. doi:10.3390/ijms26094202

*Матеріал надійшов
до редакції 13.11.2025*