

ДИНАМІКА ВМІСТУ В ЛЕГЕНЕВІЙ ТКАНИНІ ГІПОКСІЯІНДУЦИБЕЛЬНОГО ФАКТОРУ- α (HIF-1 α) ТА ФАКТОРУ РОСТУ СУДИН (VEGF) ПРИ РОЗВИТКУ ГЕМОРАГІЧНОЇ ПНЕВМОНІЇ З ФІБРОЗОМ

Зяблицев Д.С. <https://orcid.org/0000-0002-2671-2343>

Михайловська В.В. <https://orcid.org/0009-0000-7218-4222>

Курченко А.І. <https://orcid.org/0000-0001-6858-2025>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

denis898@ukr.net

Актуальність. Геморагічна пневмонія з фіброзом характеризується прогресуючим ушкодженням легеневої паренхіми з розвитком критичної гіпоксії та патологічного ремоделювання судинного русла, що зумовлює високу летальність, а також – інвалідизацію пацієнтів. Ключовими регуляторами адаптивної відповіді на гіпоксію та процесів репаративного ангіогенезу є гіпоксія-індуцибельний фактор-1 α (HIF-1 α) та судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), дисбаланс яких може визначати перехід від компенсаторних механізмів до патологічного фіброгенезу. Вивчення темпоральної динаміки HIF-1 α та VEGF у легеневій тканині при розвитку геморагічної пневмонії дозволить ідентифікувати критичні точки патогенезу й обґрунтувати нові мішені для патогенетично орієнтованої терапії.

Ціль: визначити динаміку вмісту HIF-1 α та VEGF у легеневій тканині при експериментальній геморагічній пневмонії з фіброзом і встановити їх роль у патофізіологічних механізмах ушкодження та репарації.

Матеріали та методи. У щурів-самців лінії Wistar масою 190-220 г (n=60) моделювали геморагічну пневмонію з фіброзом шляхом інтратрахеального введення капронової нитки (довжина 2,5 см, товщина 0,2 мм), тварин виводили з експерименту на 1, 3, 5, 7, 14 і 21 добу (по 5 особин), проводили гістологічне дослідження легеневої тканини та визначення вмісту HIF-1 α і VEGF методом імуноблотингу з використанням моноклональних антитіл (Invitrogen, Sigma Aldrich, США) із денситометричним аналізом у програмі TotalLab.

Результати. У щурів з експериментальною геморагічною пневмонією з фіброзом виявлено прогресування морфологічних змін легенів від вираженого набряку, мікротромбозу та серозно-геморагічного ексудату (3–5-та доба) до продуктивного запалення з формуванням фіброзу (14–21-ша доба). За даними імуноблотингу, вміст HIF-1 α зростав, досягаючи максимуму на 5-ту добу (у 1,9 раза; $p<0,05$) та залишався підвищеним на 7-му й 14-ту добу, з подальшим зниженням у фазі фіброзу. Динаміка VEGF загалом відповідала змінам HIF-1 α , проте була більш вираженою, з піком на 7-му добу (у 3,4 раза; $p<0,05$) та збереженням підвищення до 21-ї доби. Зафіксоване зростання мономерної форми VEGF з 5-ї доби (у 2,3–3,5 раза) свідчить про активацію його клітинного синтезу в період інтенсивного ангіогенезу.

Висновок. Розвиток геморагічної пневмонії з фіброзом супроводжується координованою активацією HIF-1 α та VEGF у легеневій тканині з максимумом у фазі ексудативно-геморагічного запалення, що свідчить про ключову роль гіпоксичних механізмів адаптації. При переході до фіброзування HIF-1 α нормалізується, тоді як VEGF залишається підвищеним, підтверджуючи його провідне значення в процесах неоангіогенезу та тканинного ремоделювання. Виявлені закономірності розкривають патофізіологічні механізми HIF-1 α /VEGF системи при легеновому фіброзі та обґрунтовують перспективність розробки таргетних терапевтичних підходів.

Ключові слова (MeSH): гіпоксія-індуцибельний фактор-1 α , судинний ендотеліальний фактор росту, геморагічна пневмонія, легеневий фіброз.

Актуальність. Геморагічна пневмонія є важким ураженням легеневої тканини, що супроводжується проникненням крові в альвеоли, розвитком запалення та формуванням фіброзу [1]. Дифузний альвеолярний крововилив супроводжується кашлем, кровохарканням, гіпоксемією та прогресуючим порушенням вентиляційно-перфузійних співвідношень [2]. Повторні епізоди крововиливу зумовлюють наростаюче фіброзування легеневої тканини, що призводить до незворотної перебудови архітекτονіки легень [3].

Ключовою ланкою патогенезу є тканинна гіпоксія, яка активує гіпоксіяіндуцибельний фактор-1 α (HIF-1 α) — транскрипційний фактор, що регулює експресію генів, відповідальних за кисневий гомеостаз, ангіогенез та ремоделювання тканин [4]. Одним із головних мішенів HIF-1 α є фактор росту судин (VEGF), який стимулює неоангіогенез і підтримує цілісність ендотелію, однак за надмірної експресії підвищує судинну проникність, що може посилювати ушкодження [5].

Особливістю геморагічної пневмонії є накопичення гемосидерину та продуктів деградації гемоглобіну, які індукують оксидативний стрес і модулюють стабільність HIF-1 α навіть за нормоксемії [6]. Це сприяє активації профібротичних каскадів через VEGF-залежні механізми. Попри значний прогрес у вивченні ролі HIF-1 α та VEGF у легеневій патології, динаміка їхньої експресії при геморагічній пневмонії з розвитком фіброзу залишається недостатньо дослідженою [7].

Вивчення молекулярних механізмів, що становлять основу взаємодії HIF-1 α /VEGF системи при геморагічній пневмонії, є критично важливим для розробки патогенетично обґрунтованих терапевтичних підходів та визначення прогностичних маркерів перебігу захворювання.

Ціль: визначити динаміку вмісту гіпоксіяіндуцибельного фактора- α (HIF-1 α) та судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) у легеневій тканині при експериментальній геморагічній пневмонії з фіброзом і встановити

їх роль у патофізіологічних механізмах ушкодження та репарації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС з захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами чинного законодавства України. Експериментальну геморагічну пневмонію моделювали шляхом введення стороннього тіла в трахею групі лабораторних щурів лінії Вістар масою 190-220 г (60 особин). За допомогою провідника (ін'єкційна голка) стерильну капронову нитку довжиною 2,5 см та товщиною 0,2 мм вводили на глибину 2,5 см у трахею. Для цього тварину наркотизували тіопенталом (5 мг/100 г маси тіла), зробили невеликий (до 1 см) розтин шкіри в проекції трахеї над грудиною по середній лінії, мобілізували трахею, проколювали її провідником та вводили капронову нитку, після чого операційну рану ушивали. У контрольній групі (5 тварин) виконували аналогічні маніпуляції без введення капронової нитки в трахею. Для загострення патологічного процесу додатково до введення капронової нитки за 1 та 2 доби до оперативного втручання внутрішньоочеревинно вводили розчин ліпополісахариду (пірогенал, «МЕДГАМАЛ») у дозі 250 мг/кг, а під час операції після введення у трахею нитки через інсуліновий шприц вводили 50 мкл розчину ліпополісахариду (12,5 мг/кг маси тіла). Тварин утримували на стандартному раціоні в умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

Протягом одного місяця після операції визначали загальний стан тварин, ректальну температуру, ступень ціанозу, наявність задишки, частоту дихальних рухів (ЧДР), аускультативні прояви. Тварин виводили з експерименту на 1, 3, 5, 7, 14 і 21 добу спостереження по 5 особин на кожний термін. Розтинали грудну порожнину, легені відсепаровували та фотографували. Серійні парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. 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 імуноблоттингу. Зразки тканини витримували в скрапленому азоті, подрібнювали та гомогенізували в 50 ммоль Tris-HCl буфері (pH 7,4) з додаванням інгібіторів фосфатаз та протеаз (Pierce Protease and Phosphatase inhibitor, «ThermoScientific», США). Електрофорез здійснювали у 8%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію в камері для вертикального гелелектрофорезу («BioRad», США). Протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за допомогою електроблоту. Мембрани інкубували з моноклональними антитілами до VEGF (no. MA5-12184, mouse, «Invitrogen», США) і HIF-1 α (no. HPA001275, rabbit, «Sigma Aldrich», США). Антитіла до актину (β -actin, no. MA5-15739, mouse, «Invitrogen», США) використовували для його детекції як контролю нанесення протеїну. Після первинної інкубації мембрани відмивали та обробляли антивидовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Invitrogen», США). Напівкількісний аналіз проводили денситометрично, застосовуючи 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 актину в кожному зразку.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Протягом 1-ї доби у щурів спостерігалися виражені порушення дихання у вигляді

утруднених вдихів та видихів з активним залученням діафрагми та м'язів грудної клітини, аускультативно прослуховувалися вологі хрипи. На 2-3-ю добу стан тварин погіршувався, дихання поверхневе, утруднене, часте (до 96-144 на хвилину); хрипи було чути на відстані; аускультативно прослуховувалася крепітація; спостерігалися виражений ціаноз, млявість та зниження орієнтовно-рухової активності. На 1-у добу на тлі гострої легеневої недостатності загинуло 13,7%, а на кінець 3-ї доби – 37,8% тварин. Після 5-ї доби спостереження стан тварин стабілізувався, інтенсивність хрипів та ціанозу знижувалася, але рівень летальності продовжував зростати – і на 14-у добу склав 44,8%. Протягом усього періоду спостереження була визначена гіпертермія (37,9-38,9 $^{\circ}$ C).

Мікроскопічно на 1-у добу визначено виражене повнокров'я та екстазія венул і судин мікроциркуляторного русла, розповсюджений мікротромбоз, фокальні діapedезні крововиливи (рис. 1а). У паренхімі легень велика кількість альвеол емфізематозно дилатовані, стінки стоншені та містами розірвані. На 3-ю та 5-у добу судинні прояви гострого запалення прогресували, виявлено розповсюджені екстазія венул та мікротромбоз (рис. 1б, в). Виразений набряк паренхіми з геморагічним випотом у просвіт альвеол, реактивна гіперплазія лімфоїдних фолікулів. На 5-у добу легень фактично просочені кров'ю, у просвіті альвеол серозно-геморагічний ексудат з домішками гною (рис. 1г). На 7-у добу зазначені прояви зникали, у паренхімі легень зафіксована активна проліферація фіброblastів, виявлення фібрилярної сітки, ділянок активної резорбції тканини. У подальшому в легенях прогресувало продуктивне запалення з активним фіброзуванням. Такі прояви свідчили про розвиток на 3-5-у добу гострої геморагічної пневмонії з подальшим фіброзуванням паренхіми легень.

За даними імуноблоттингу вміст HIF-1 α у тканині легень мав чітку тенденцію до збільшення (рис. 2). Максимум приросту прийшовся на 5-ту добу ($y_{1,9}$ раз; $p < 0,05$), тобто

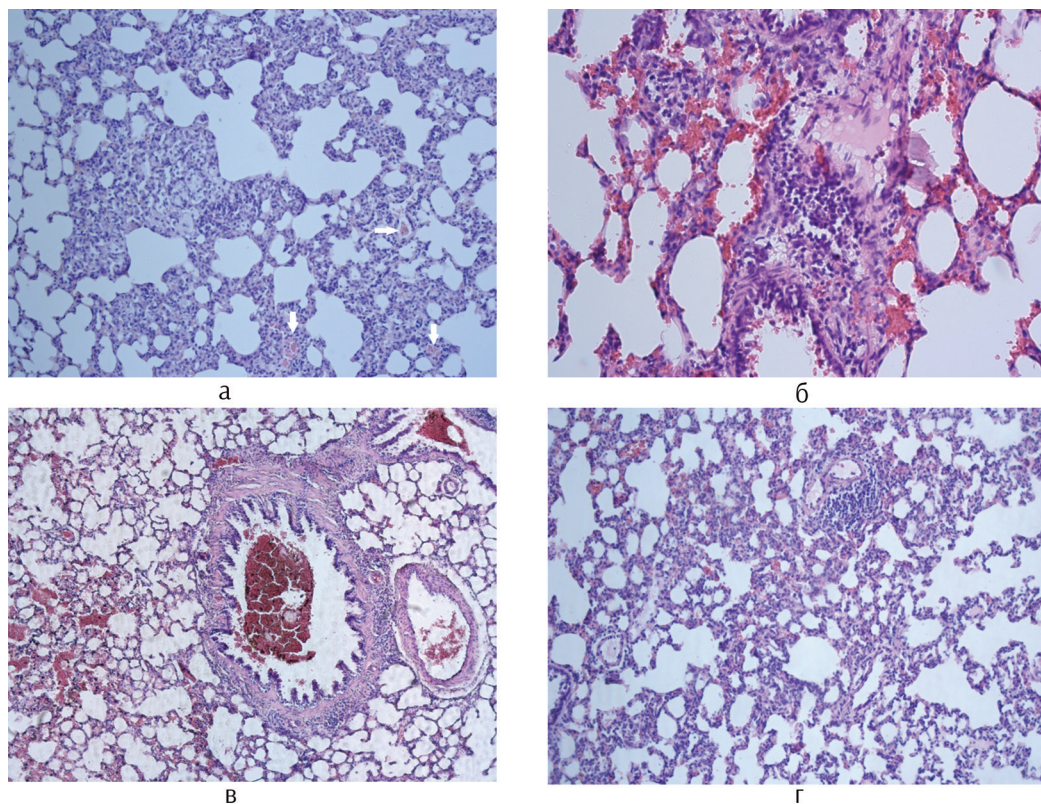
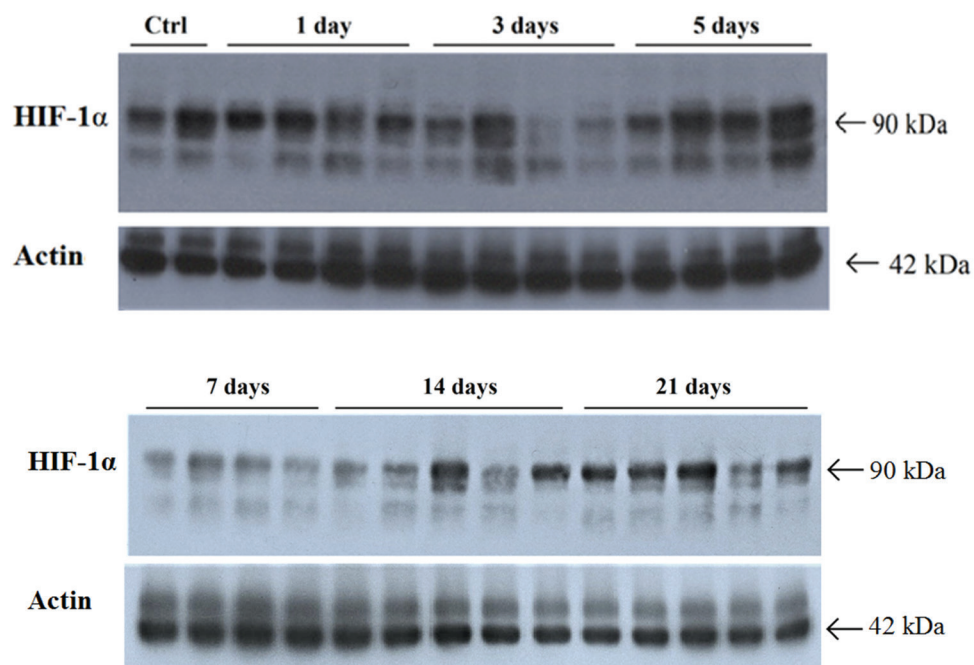
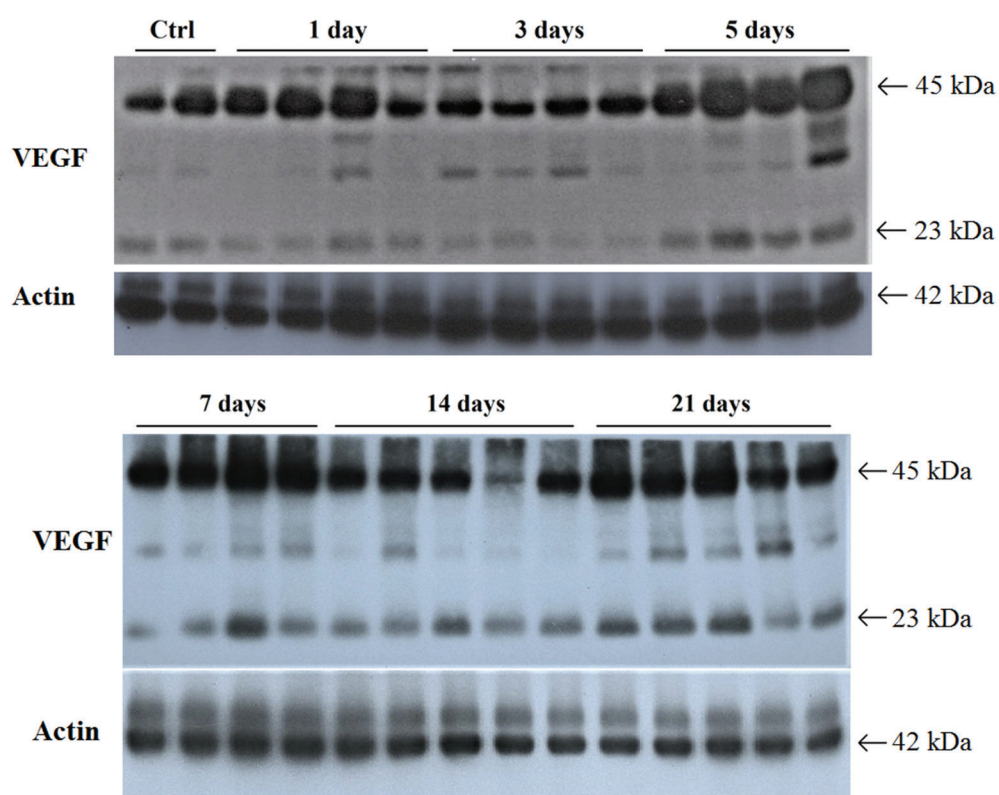


Рис. 1. Легені щура з геморагічною пневмонією . Гематоксилін-еозин.

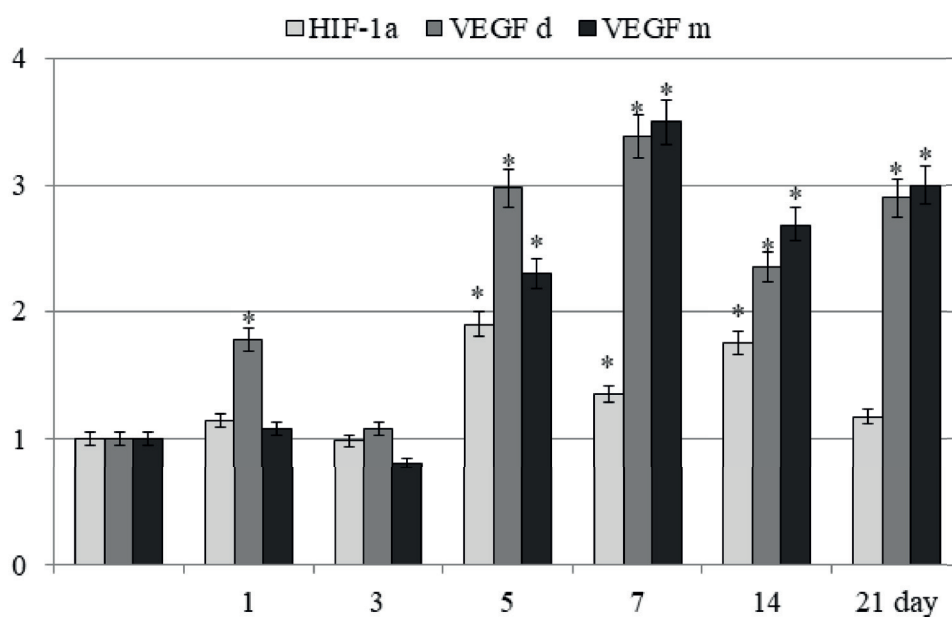
- а. 1-а доба; повнокров'я та ектазія судин із мікротромбозом (стрілки); альвеолярні ходи розширені, розриви міжальвеолярних перетинок; $\times 100$;
 б. 3-я доба; велика кількість судин ділятовані, розповсюджений тромбоз; набряк паренхіми з активною нейтрофільно-лімфоцитарною інфільтрацією; у просвіті альвеол серозно-геморагічний ексудат; $\times 200$;
 в. 5-а доба; паренхіма легень просочена кров'ю, серозно-геморагічний ексудат у альвеолах; $\times 100$;
 г. 7-а доба; активний розвиток фібрилярної сітки, дифузно – зони продуктивного запалення з формуванням резорбтивних гранульом; $\times 100$



а



6



B

Рис. 2. Вміст у легеневій тканині HIF-1α, димерної (VEGF d) та мономерної (VEGF m) форм VEGF у динаміці розвитку експериментальної бронхопневмонії;

а – приклади репрезентативних блотограм HIF-1α;

б – приклади репрезентативних блотограм VEGF;

в – результати денситометрії HIF-1α і VEGF (у відсотках по відношенню до контролю);

* – відмінність від контролю статистична значуща (P < 0,05)

на період розвитку серозно-геморагічного запалення. У подальшому вміст HIF-1 α суттєво перевищував початкові значення (у 1,4 раза на 7-му і у 1,75 раза на 14-ту добу; $p < 0,05$). На 21-у добу вміст HIF-1 α перевищував початковий у 1,2 раза, але це не було статистично значущим ($p > 0,05$). Отже, у міру регресування гострого запалення та переходу до фіброзу вміст HIF-1 α зменшувався.

Вміст у легеневій тканині VEGF в цілому відповідав динаміці вмісту HIF-1 α , але кількісно був більш вираженим. Уже на 1-шу добу він перевищував контрольний у 1,8 раза, на 5-ту добу – у 3,0 раза, на 7-му добу – у 3,4 раза і на 14-ту і 21-шу добу – у 2,4 і 2,9 раз відповідно ($p < 0,05$ для всіх випадків). Максимум приросту вмісту HIF-1 α приходився на 5-ту добу, а VEGF – на 7-му, що могло підкреслювати регулюючий характер впливу HIF-1 α на експресію VEGF. Деяке співдружне стухання експресії обох факторів було відмічено на 3-тю добу, коли їх вміст майже не відрізнявся від контрольного. Це могло відображати напруження компенсаторних механізмів пристосування до гіпоксії на цей термін з подальшим їх виснаженням.

У всіх пробах були виявлені смужки масою 23 кДа (див. рис. 26), які відповідали мономерній формі VEGF та відображали активність його клітинного синтезу. Відмічено наростання вмісту мономерній формі VEGF з 5-ї доби (у 2,3-3,5 раза), з максимумом на 7-му добу ($p < 0,05$).

ОБГОВОРЕННЯ

Патофізіологічні аспекти та клінічна значимість дослідження HIF-1 α та VEGF при геморагічній пневмонії з фіброзом

Геморагічна пневмонія з розвитком фіброзу легень є важким патофізіологічним процесом, що характеризується дифузним альвеолярним крововиливом, гіпоксією та прогресуючою фібротичною перебудовою паренхіми. Смертність при масивних крововиливах досягає 70%, а 5-річна виживаність при фіброзі становить лише 19-30% [8]. Ключовими медіаторами патогенезу є гіпоксія-

індуцибельний фактор-1 α (HIF-1 α) та фактор росту судин (VEGF).

HIF-1 α функціонує як основний киснечозалежний транскрипційний фактор, що активується при гіпоксії внаслідок пригнічення пролілгідроксилаз та стабілізації α -субодиниці [9]. При геморагічній пневмонії HIF-1 α демонструє дуалістичну роль: забезпечує адаптацію до гіпоксії через активацію гліколізу, але водночас посилює запальну відповідь через NF- κ B та прозапальні цитокіни, що може призводити до фіброгенезу [10].

VEGF, регульований HIF-1 α , критично важливий для підтримання цілісності альвеолярно-капілярної мембрани та регуляції судинної проникності. При геморагічній пневмонії VEGF експресується альвеолярним епітелієм типу II, макрофагами та ендотеліальними клітинами у відповідь на гіпоксію [11]. VEGF виявляє протективні ефекти через підтримання епітеліального бар'єру та стимуляцію репарації, проте може підвищувати судинну проникність та активувати міофібробласти [12].

Динаміка експресії цих факторів змінюється залежно від стадії процесу. На ранніх стадіях геморагічної пневмонії підвищення HIF-1 α та VEGF має адаптивний характер, стимулюючи ангиогенез та репарацію. При прогресуванні до фіброзу рівень VEGF знижується, що корелює з руйнуванням судинної мережі та накопиченням позаклітинного матриксу [13]. HIF-1 α може сприяти фіброгенезу через активацію епітеліально-мезенхімального переходу та стимуляцію продукції колагену [14].

Клінічна значимість дослідження HIF-1 α та VEGF полягає в їх потенціалі як біомаркерів прогресування захворювання та терапевтичних мішеней. Модуляція активності цих факторів може стати основою для персоналізованих терапевтичних підходів: селективне інгібування HIF-1 α на ранніх стадіях для зменшення запалення та підтримання рівня VEGF при фіброзі для збереження судинної мережі та уповільнення прогресування захворювання.

Інтерпретація динаміки HIF-1 α

Отримані результати свідчать про фазову динаміку експресії HIF-1 α при розвитку геморагічної пневмонії з подальшим фіброзом. Визначено, що експресія фактора починала зростати вже з 1-ї доби після моделювання патології, досягаючи максимуму на 5-ту добу. Це відповідало фазі виражених мікроциркуляторних порушень — венулярної ектазії, тромбозів, геморагій та серозно-геморагічного ексудату. Підвищення HIF-1 α на цьому етапі можна розглядати як реакцію сенсора гіпоксії на гостре кисневе голодування: в умовах дефіциту кисню HIF-1 α уникає деградації, транслокується в ядро та індукує транскрипцію генів, що забезпечують адаптацію клітин, зокрема VEGF, еритропоєтину та ферментів гліколізу [7, 15].

Після 7-ї доби рівень HIF-1 α поступово знижувався, що відображало перехід процесу від гострої фази до ремоделювання тканини та формування фіброзу. Зменшення експресії могло бути зумовлене редукцією гіпоксичного стимулу через часткову стабілізацію мікроциркуляції та утворення зон відносної нормоксії, де HIF-1 α швидко руйнується [16]. Одночасно хронічне запальне середовище, насичене цитокінами, додатково пригнічує транскрипційну активність HIF-1 α .

Водночас HIF-1 α має подвійну роль у патогенезі: на ранніх стадіях він виконує цитопротекторну функцію, тоді як його тривала активація сприяє розвитку фіброзу через стимуляцію епітеліально-мезенхімального переходу та активацію профіброгенних факторів, зокрема TGF- β 1 та CTGF [17]. Наші результати підтверджують цей дуалізм: пікове підвищення HIF-1 α у фазі масивного ушкодження тканини змінюється його зниженням у період домінування фіброзних перебудов.

Отже, фазова динаміка HIF-1 α відображає еволюцію патологічного процесу від адаптивної відповіді на гостру гіпоксію до хронічного фіброзного ремоделювання, що має не лише патофізіологічне, але й терапевтичне значення. Оптимальне «вікно» для таргетної корекції HIF-1 α може припадати саме на період максимальної

його експресії (5–7 доба), коли профіброгенні механізми ще не домінують [18, 19].

Аналіз VEGF: компенсаторна відповідь

VEGF, як ключова транскрипційна мішень HIF-1 α , відіграє центральну роль у репаративному ангіогенезі, стимулюючи проліферацію ендотеліальних клітин та формування нових капілярів для відновлення кисневої доставки до ушкодженої тканини [20]. У нашій моделі геморагічної пневмонії максимальний рівень VEGF зафіксовано на 7-му добу (у 3,4 раза вище контролю), що відстає від пікового зростання HIF-1 α на 5-ту добу. Такий часовий зсув відображає послідовність "сенсор-ефектор": активація HIF-1 α як первинного детектора гіпоксії передуює накопиченню його транскрипційних продуктів, зокрема VEGF [8].

Критично важливо, що пік VEGF на 7-му добу збігається з морфологічним переходом від серозно-геморагічного запалення до формування грануляційної тканини. На цьому етапі VEGF-опосередковане підвищення судинної проникності має подвійні наслідки: забезпечує доставку кисню та репаративних факторів, проте одночасно сприяє ексудації білків і створенню профіброзної матриці [21]. Подібну темпоральну динаміку з піком VEGF у перехідну фазу від запалення до ремоделювання описано в інших моделях гострого легеневого ушкодження [22].

Новоутворені під впливом VEGF судини при геморагічній пневмонії часто функціонально неповноцінні через супутні мікротромбози, створюючи парадокс активного ангіогенезу при збереженій гіпоксії. Це створює порочне коло: VEGF-стимулюється проникність посилює набряк і компресію капілярів, погіршуючи перфузію та підтримуючи гіпоксичний сигнал [23].

Клінічно значущим є те, що період максимальної експресії VEGF (7-ма доба) представляє критичне терапевтичне вікно. На цьому етапі можлива диференційована модуляція VEGF-сигналіngu: збереження його ангіогенних властивостей при одночасному обмеженні надмірної проникності та профіброзних ефектів. Така стратегія потребує

тонкого балансу між репаративними та патологічними функціями VEGF у контексті легеневого ремоделювання [23].

Взаємозв'язок HIF-1 α і VEGF

Результати дослідження підтвердили тісний функціональний зв'язок між HIF-1 α та VEGF у патогенезі геморагічної пневмонії з наступним фіброзом. Виявлена позитивна кореляція їх експресії узгоджується з каскадом гіпоксичної відповіді, де HIF-1 α є ключовим регулятором транскрипції VEGF [24].

Характерною особливістю динаміки було відставання піку VEGF від HIF-1 α (5-та і 7-ма доба відповідно), що відображає послідовність активації гіпоксичного сигналіngu та ангіогенних механізмів [24, 25]. Морфологічні зміни в легенях (набряк, геморагії, мікротромбози) узгоджувалися з цими даними, підкреслюючи роль гіпоксії як тригера ангіогенезу та репарації.

У подальші терміни (14–21 доба) відзначалася асинхронність: зниження HIF-1 α поєднувалося зі збережено високим рівнем VEGF, що свідчить про його тривалу дію навіть після зменшення гіпоксичного стимулу [26]. Це мало подвійні наслідки: підтримку регенерації ендотелію та одночасне сприяння патологічному фіброзу. Подібні патерни описані і в інших формах легеневої патології, зокрема при сполучнотканинно-асоційованій легеневій гіпертензії та експериментальному фіброзі [25, 27].

Таким чином, взаємодія HIF-1 α і VEGF виступає ключовим патофізіологічним вузлом, що визначає перехід від гострої гіпоксичної відповіді до фібротичного ремоделювання легеневої тканини. Це підкреслює їх потенціал як біомаркерів та мішеней для терапевтичних втручань.

Патологоморфологічний зв'язок з біохімічними змінами

Отримані результати демонстрували чіткий молекулярно-морфологічний паралелізм між динамікою експресії HIF-1 α і VEGF та еволюцією гістопатологічних змін при експериментальній геморагічній пневмонії

з фіброзом. Така кореляція підтвердила патогенетичну значущість досліджуваних факторів у механізмах тканинного ремоделювання легеневої паренхіми.

На ранніх стадіях патологічного процесу (1-5 доба) підвищення експресії HIF-1 α збігалось з розвитком характерних морфологічних проявів гіпоксичного ураження. Гістологічна картина цього періоду характеризувалася масивною геморагією в альвеолярні простори, формуванням мікротромбів у легневих капілярах, розвитком інтерстиціального набряку та ішемічного некрозу альвеолярного епітелію. Відомо, що активація HIF-1 α у відповідь на тканинну гіпоксію спрямована на адаптацію клітин до дефіциту кисню через індукцію гліколітичних ферментів та факторів виживання [28]. Морфологічно це проявлялося збереженням життєздатності частини клітин у перифокальних зонах навколо некротичних вогнищ.

Пік експресії HIF-1 α на 5-ту добу відповідав фазі максимального мікротромбозу та повнокров'я, коли гістологічно визначалися розширені судини, множинні фібринові тромби у просвітах капілярів, а також виражена вазодилатація з підвищеною проникністю ендотелію. Ці морфологічні зміни могли бути прямим наслідком гіпоксично-індукованої активації HIF-1 α , який стимулював експресію ендотеліальної NO-синтази та факторів проникності судин, призводячи до розладів мікроциркуляції та формування серозно-геморагічного ексудату [29].

Відстрочений пік експресії VEGF на 7-му добу морфологічно корелював з початком активного репаративного процесу та формуванням фіброзних змін. У цей період гістологічна картина характеризувалася появою фібринової сітки в альвеолярних просторах, проліферацією фібробластів в інтерстиції та початком відкладення колагену. Відомо, що VEGF стимулює утворення надлишкового позаклітинного матриксу та судинне ремоделювання, що морфологічно проявляється розростанням грануляційної тканини з активною проліферацією міофібробластів [21, 30].

Особливо важливим є морфологічний паралелізм між динамікою VEGF та процесами неоангіогенезу. На 7-му добу, коли VEGF досягає максимального рівня, мікроскопічно визначалося інтенсивне новоутворення капілярів із збільшенням щільності мікросудинної мережі в зонах фіброзного ремоделювання. Водночас новоутворені судини часто мали порушену архітектуру з підвищеною проникністю, що сприяло екстравазації плазматичних білків та формуванню сприятливої матриці для подальшого розростання сполучної тканини [21].

Поступове зниження рівня HIF-1 α після 5-ї доби до контрольних значень на 21-шу добу збігалось з морфологічною стабілізацією процесу. Натомість, стійко підвищений рівень VEGF корелював з гістологічними ознаками тривалого ремоделювання: формуванням зрілих фіброзних прошарків з щільним колагеновим матриксом та стабілізацією судинної мережі. Ці зміни відображали перехід від активного фіброгенезу до фази консолідації рубцевої тканини [20].

Важливою особливістю можна вважати просторову гетерогенність експресії досліджуваних факторів, що корелює з морфологічними особливостями різних зон ураження. У центральних зонах некрозу експресія як HIF-1 α , так і VEGF залишалася мінімальною через загибель клітин, тоді як у перифокальних зонах спостерігалася максимальна активація цих факторів із відповідними морфологічними проявами репаративних процесів.

Таким чином, виявлена темпоральна та просторова динаміка експресії HIF-1 α та VEGF мала чіткі морфологічні кореляти, що підтвердило їх ключову роль у патогенезі геморагічної пневмонії з фіброзом. Молекулярно-морфологічний паралелізм демонстрував еволюцію патологічного процесу від гострої гіпоксично-запальної відповіді через активне тканинне ремоделювання до формування зрілого фіброзу, що має важливе значення для розуміння патогенезу та розробки патогенетично обґрунтованих терапевтичних підходів.

ВИСНОВКИ

1. У процесі розвитку геморагічної пневмонії та фіброзу легень відмічено співдружне наростання вмісту у легеневій тканині як HIF-1 α , так і VEGF, що мало максимальне вираження у фазі розвитку ексудативно-геморагічного запалення (перевищував контроль у 1,9 та 3,4 рази, відповідно; $p < 0,05$).
2. При переході до фіброзування відмічено зменшення вмісту обох факторів, але якщо вміст HIF-1 α на 21-шу добу відновлювався до контрольного, то вміст VEGF лишався достатньо високим і перевищував контроль у 3,0 рази ($p < 0,05$).
3. Експресія HIF-1 α на ранніх стадіях геморагічної пневмонії (пік на 5-ту добу) визначає розвиток гіпоксично-індукованих морфологічних змін із подальшою активацією VEGF-опосередкованого ангіогенезу та формуванням патологічного фіброзу легеневої паренхіми. Виявлені молекулярно-морфологічні кореляти створюють патогенетичне підґрунтя для розробки таргетної HIF-1 α /VEGF-спрямованої терапії з метою попередження фіброзних ускладнень при геморагічній пневмонії.

Відмова від відповідальності. Автори заявляють, що висловлені у поданій статті думки є їх власними, а не офіційними позиціями установи.

Конфлікт інтересів: Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES

1. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17074. doi:10.1038/nrdp.2017.74
2. Bain GA, Flores RM. Diffuse pulmonary hemorrhage. Curr Opin Pulm Med. 2019;25(3):316-23. doi:10.1097/MCP.0000000000000576
3. Jezler S, Santiago S, Buckinghamshire A, Tselios K. Treatment of diffuse alveolar hemor-

- rhage: controlling inflammation and obtaining rapid and effective hemostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):793. doi:10.3390/ijms22020793
4. Cowburn AS, Crosby A, Macias D, Branco C, Colaco RD, Southwood M, et al. HIF2 α -arginase axis is essential for the development of pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(31):8801-6. doi:10.1073/pnas.1602978113
5. Barratt SL, Flower VA, Pauling JD, Millar AB. VEGF (vascular endothelial growth factor) and fibrotic lung disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1269. doi:10.3390/ijms19051269
6. Chintagari NR, Jana S, Alayash AI. Oxidized hemoglobin triggers mitochondrial dysfunction in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(2):288-98. doi:10.1165/rcmb.2015-0397OC
7. Evans CE. Hypoxia-Inducible Factor Signaling in Inflammatory Lung Injury and Repair. *Cells.* 2022 Jan 6;11(2):183. doi: 10.3390/cells11020183.
8. Li X, Wang Y, Zhang Q, et al. Inhibition of HIF-1 α ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing M2 macrophage polarization through PRMT1/STAT6 signals. *Front Immunol.* 2025;16:1520387. doi: 10.3389/fimmu.2025.1520387
9. Zhang Y, Jiang M, Nouraie M, et al. Targeting hypoxia inducible factors-1 α as a novel therapy in fibrosis. *Front Pharmacol.* 2017;8:326. doi: 10.3389/fphar.2017.00326
10. Moon SW, Koh YY, Kim JM, et al. Endothelial HIF signaling regulates pulmonary fibrosis-associated pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;310(7):L616-L628. doi: 10.1152/ajplung.00258.2015
11. Barratt S, Medford AR, Millar AB. Vascular endothelial growth factor in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Respiration.* 2014;87(4):329-342. doi: 10.1159/000365629
12. Jin K, Li T, Sanchez-Duffhues G, et al. Vascular permeability in the fibrotic lung. *Eur Respir J.* 2020;56(1):1900100. doi: 10.1183/13993003.00100-2019
13. Yang L, Liu Q, Zhang X, et al. GLUT1 regulates the release of VEGF-A in the alveolar epithelium of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Int J Mol Med.* 2024;53(2):20. doi: 10.3892/ijmm.2024.5345
14. Li X, Zhang Y, Wang Q, et al. The role of HIF-1 α -VEGF pathway in bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Cardiothorac Surg.* 2019;14(1):26. doi: 10.1186/s13019-019-0832-z
15. Tzouvelekis A, Harokopos V, Papadaki T, et al. 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
16. Chen X, Chen W, Liu C, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α : a key mediator and potential therapeutic target in pulmonary fibrosis. *Front Pharmacol.* 2023;14:1198451. doi:10.3389/fphar.2023.1198451
17. Kumar A, Vishvakarma NK, Singh T, et al. Hypoxia enhances IPF mesenchymal progenitor cell fibrogenicity via the lactate/GPR81/HIF1 α pathway. *JCI Insight.* 2023;8(2):e163820. doi:10.1172/jci.insight.163820
18. McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, et al. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem.* 2006;281(35):24171-81. doi:10.1074/jbc.M604507200
19. Pulmonary fibrosis: from mechanisms to therapies. *J Transl Med.* 2025;23:27. doi:10.1186/s12967-025-06514-2.
20. Amano H, Matsui Y, Hatanaka K, Hosono K, Ito Y. VEGFR1-tyrosine kinase signaling in pulmonary fibrosis. *Inflamm Regen.* 2021;41:16. doi:10.1186/s41232-021-00166-7
21. Tomita K, Saito Y, Suzuki T, Imbaby S, Hattori K, Matsuda N, et al. VEGF contributes to lung vascular hyperpermeability in sepsis-associated acute lung injury. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2020;393(12):2365-74. doi:10.1007/s00210-020-01947-6
22. Lin C-K, Huang T-H, Yang C-T, Shi C-S. Roles of lung-recruited monocytes and pulmonary VEGF in resolving ventilator-induced lung injury. *PLoS One.* 2021;16(3):e0248959. doi:10.1371/journal.pone.0248959
23. Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, et al. Hyper-respon-

- siveness of IPF lung fibroblasts to TGF- β 1 is mediated by autocrine VEGF-A signaling. *JCI Insight*. 2017;2(5):e92192. doi:10.1172/jci.insight.92192.
24. Shah R, Raghavendran K. Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Its Role in Lung Injury: Adaptive or Maladaptive? *Inflammation*. 2023;46(2):491–508. doi:10.1007/s10753-022-01769-z
 25. Shi X, Ma X, Wang H, He X, Fan H, Mao Y. Elevated serum levels of HIF-1 α and VEGF as potential biomarkers in connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep*. 2025;15:5410. doi:10.1038/s41598-025-89130-w
 26. Dual Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Acute Lung Injury and Tissue Repair. *Cells*. 2025;14(14):1089. doi:10.3390/cells14141089
 27. Systematic and comprehensive insights into HIF-1 stabilization under normoxia. *Cell Mol Biol Lett*. 2024;29:29. doi:10.1186/s11658-024-00682-7.
 28. Liu J, Wang W, Wang L, Chen S, Tian B, Huang K, et al. IL-33 initiates vascular remodelling in hypoxic pulmonary hypertension by up-regulating HIF-1 α and VEGF expression in vascular endothelial cells. *EBioMedicine*. 2018;33:196–210. doi:10.1016/j.ebiom.2018.06.003
 29. Wan JJ, Yi J, Wang FY, Zhang C, Dai AG. Expression and regulation of HIF-1 α in hypoxic pulmonary hypertension: Focus on pathological mechanism and pharmacological treatment. *Int J Med Sci*. 2024;21(1):45–60. doi:10.7150/ijms.88216
 30. Effects of hypoxia and hyperoxia on the differential expression of VEGF-A isoforms and receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2018;373(1):55–67. doi:10.1007/s00441-018-2882-0

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

Ziablitsev D.S., Mykhailovska V.V., Kurchenko A.I.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Background. Hemorrhagic pneumonia with fibrosis is characterized by progressive damage to the lung parenchyma with the development of critical hypoxia and pathological vascular remodeling, which causes high mortality and disability of patients. The key regulators of the adaptive response to hypoxia and the processes of reparative angiogenesis are hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF), the imbalance of which can determine the transition from compensatory mechanisms to pathological fibrogenesis. The study of the temporal dynamics of HIF-1 α and VEGF in lung tissue during the development of hemorrhagic pneumonia will allow identifying critical points of pathogenesis and justifying new targets for pathogenetically oriented therapy.

Aim: to determine the dynamics of HIF-1 α and VEGF content in lung tissue in experimental hemorrhagic pneumonia with fibrosis and to establish their role in the pathophysiological mechanisms of damage and repair.

Materials and methods. In male Wistar rats weighing 190-220 g (n=60), hemorrhagic pneumonia with fibrosis was simulated by intratracheal injection of a nylon thread (length 2.5 cm, thickness 0.2 mm), animals were withdrawn from the experiment on days 1, 3, 5, 7, 14 and 21 (5 animals each), a histological study of lung tissue was performed and the content of HIF-1 α and VEGF was determined by immunoblotting using monoclonal antibodies (Invitrogen, Sigma Aldrich, USA) with densitometric analysis in the TotalLab program.

Results. In rats with experimental hemorrhagic pneumonia with fibrosis, a progression of morphological changes in the lungs was observed from pronounced edema, microthrombosis, and serous-hemorrhagic exudate (days 3–5) to productive inflammation with fibrosis formation (days 14–21). According to immunoblotting, the content of HIF-1 α increased, reaching a maximum on day 5 (1.9-fold; $p < 0.05$) and remained elevated on days 7 and 14, with a further decrease in the fibrosis phase. The dynamics of VEGF generally corresponded to the changes in HIF-1 α , but was more pronounced, with a peak on day 7 (3.4-fold; $p < 0.05$) and the increase persisting until day 21. The recorded increase in the monomeric form of VEGF from the 5th day (by 2.3–3.5 times) indicates the activation of its cellular synthesis during the period of intensive angiogenesis.

Conclusion. The development of hemorrhagic pneumonia with fibrosis is accompanied by coordinated activation of HIF-1 α and VEGF in the lung tissue with a maximum in the phase of exudative-hemorrhagic inflammation, which indicates the key role of hypoxic adaptation mechanisms. During the transition to fibrosis, HIF-1 α normalizes, while VEGF remains elevated, confirming its leading role in the processes of neoangiogenesis and tissue remodeling. The revealed patterns reveal the pathophysiological mechanisms of the HIF-1 α /VEGF system in pulmonary fibrosis and substantiate the prospects for the development of targeted therapeutic approaches.

Key words (MeSH): hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, hemorrhagic pneumonia, pulmonary fibrosis.