КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2026 р.

ВМІСТ ФАКТОРІВ РОСТУ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ГНІЙНО-НЕКРОТИЧНОЮ РАНОЮ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ ЕНЗИМНОЇ КОМПОЗИЦІЇ

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Рибнікової Ольги Віталіївни
Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, ст. дослідник
Галенова Т.І.

Робота виконана на базі кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом доцента кафедри біохімії, канд. біол. наук, ст. дослідника Галенової Тетяни Іванівни

Оцінка захисту роботи

_____

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ФР – фактор росту;

BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофічний фактор мозку);

EGF – epidermal growth factor (епідермальний фактор росту);

EGFR – epidermal growth factor receptor (рецептор епідермального фактора росту);

FGF – fibroblast growth factor (фактор росту фібробластів);

IGF – insulin-like growth factor (інсуліноподібний фактор росту);

IL-1β – interleukin 1 beta (інтерлейкін 1 бета);

MAPK – mitogen-activated protein kinase (мітоген-активована протеїнкіназа);

MMP – matrix metalloproteinase (матриксна металопротеїназа);

NGF – nerve growth factor (нейротрофічний фактор росту);

NT-3 – neurotrophin 3 (нейротрофін 3);

PDGF – platelet-derived growth factor (тромбоцитарний фактор росту);

PI3K/AKT – phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B (фосфатидилінозитол-3-кіназа / протеїнкіназа В);

TGF – transforming growth factor (трансформуючий фактор росту);

VEGF – vascular endothelial growth factor (судинно-ендотеліальний фактор росту).

ЗМІСТ

ВСТУП 4

РОЗДІЛ 1. Біохімічні механізми загоєння гнійно-некротичних ран 6

1.1. Гнійно-некротичні рани: захворюваність, фактори ризику та летальність 6

1.2. Гнійно-некротичні рани: патогенез і фази загоєння 8

1.3. Фактори росту як ключові регулятори загоєння 12

1.3.1. Класифікація і джерела синтезу факторів росту 13

1.3.2. Механізми дії факторів росту на клітинному рівні 16

1.3.3. Взаємозв'язок між факторами росту та іншими медіаторами регенерації 18

1.3.4. Вплив факторів росту на проліферацію клітин, ангіогенез та ремоделювання тканин 20

1.3.5. Клінічне застосування факторів росту: перспективи регенеративної медицини 22

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень 25

2.1. Реактиви та матеріали 25

2.2. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин 26

2.3. Відтворення моделі гнійно-некротичної рани на щурах 26

та дизайн експерименту 26

2.4. Отримання сироватки крові щурів 27

2.5. Отримання гомогенату шкіри 28

2.6. Визначення рівня факторів росту методом імуноферментного аналізу ... 28

2.7. Визначення концентрації білка 29

2.8. Статистична обробка результатів 30

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення 31

ВИСНОВКИ 56

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 57

ВСТУП

Процес загоєння ран є складним багатоступеневим явищем, що включає запальний, клітинний, ангіогенетичний і ремоделювальний етапи. Його нормальний перебіг забезпечується взаємодією численних біологічних агентів, серед яких ключову роль відіграють фактори росту [1, 2]. Вони стимулюють ангіогенез, міграцію клітин, синтез колагену та формування грануляційної тканини. При гнійно-некротичних ураженнях, що супроводжуються інтенсивним запаленням і порушенням мікроциркуляції, регуляція продукції факторів росту набуває особливої клінічної важливості. Незважаючи на наявність численних досліджень, динаміка факторів росту за цих умов досі вивчена недостатньо, що ускладнює розробку ефективних терапевтичних стратегій [3, 4].

Некротичні рани характеризуються масовою загибеллю клітин, порушенням кровообігу і накопиченням токсичних продуктів обміну. Це затягує процес репарації і підвищує ризик ускладнень, зокрема сепсису [2]. Відомо, що підвищення фактора росту ендотелію судин (VEGF) стимулює ангіогенез, а інтенсивне запалення може обмежувати його ефективність [5]. Також тромбоцитарний фактор росту (PDGF), фібробластний фактор росту (FGF) та трансформуючий фактор росту бета (TGF-β) сприяють загоєнню, однак їх оптимальні концентрації для лікування гнійно-некротичних ран залишаються невизначеними [3, 6].

В Україні проблема ускладнених ран є особливо актуальною через поширення діабету, судинних патологій та післяопераційних ускладнень. Система охорони здоров'я стикається з обмеженими ресурсами та потребує впровадження новітніх технологій. Аналіз динаміки факторів росту в умовах гнійно-некротичних уражень може стати важливим кроком до покращення лікувальних підходів.

Фактори росту є центральними елементами репаративних процесів: VEGF стимулює неоангіогенез [1, 5], PDGF активує фібробласти і

колагеноутворення [4], FGF забезпечує міграцію клітин [3], а TGF-β регулює запалення та ремоделювання тканини [6]. Проте досі немає чітких стандартів застосування цих молекул для стимуляції загоєння складних ран [7].

Таким чином, незважаючи на значні успіхи у розумінні загальних механізмів репарації, питання регуляції факторів росту в умовах гнійно-некротичних уражень потребує подальших досліджень. Їх результати можуть сприяти розробці інноваційних терапевтичних стратегій для клінічної практики в Україні [8].

Метою роботи було оцінити перебіг ранового процесу у щурів з експериментальною гнійно-некротичною раною та визначити вміст факторів росту (PDGF A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α, TGF, VEGF, NGF) в сироватці крові та гомогенаті шкіри дослідних щурів на тлі місцевого застосування ензимної композиції.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Відтворити експериментальну модель гнійно-некротичної рани на щурах.
2. Оцінити площі ранової поверхні у динаміці ранозагоювального процесу у щурів з експериментальною гнійно-некротичною раною та на тлі місцевого застосування ензимної композиції.
3. Визначити вміст факторів росту у сироватці крові щурів з експериментальною гнійно-некротичною раною та на тлі місцевого застосування ензимної композиції
4. Визначити вміст факторів росту у гомогенаті шкіри щурів з експериментальною гнійно-некротичною раною та на тлі місцевого застосування ензимної композиції

РОЗДІЛ 1
БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ЗАГОЄННЯ ГНІЙНО-НЕКРОТИЧНИХ РАН

1.1. Гнійно-некротичні рани: захворюваність, фактори ризику та летальність

Гнійно-некротичні рани становлять складну клінічну проблему в сучасній хірургічній практиці. Вони є тяжким ускладненням інфекційних процесів, що вражають шкіру, підшкірну клітковину та глибші шари м'яких тканин, супроводжуючись вираженим запаленням, некрозом та високим ризиком розвитку сепсису. Такі ураження виникають унаслідок травм, операцій, порушень кровопостачання або як ускладнення хронічних захворювань, зокрема цукрового діабету. Зважаючи на агресивний перебіг і швидке прогресування, гнійно-некротичні рани потребують раннього виявлення та комплексного лікування [9].

Захворюваність. Поширення гнійно-некротичних процесів у сучасних умовах демонструє тенденцію до зростання, особливо серед осіб із супутніми метаболічними порушеннями. За даними епідеміологічного дослідження, проведеного в Нідерландах, у країнах Європи частота таких уражень становить 1,1-1,4 випадки на 100 000 населення на рік [10]. Найчастіше вони реєструються серед людей похилого віку, чоловіків, а також пацієнтів із цукровим діабетом, серцево-судинними захворюваннями та патологією печінки. В окремих групах підвищеного ризику, зокрема серед осіб з ожирінням або імунодефіцитними станами, частота розвитку гнійно-некротичних уражень може зростати в кілька разів [11].

У стаціонарній практиці гнійно-некротичні рани часто формуються як ускладнення післяопераційного перебігу, а також у пацієнтів із пролежнями. Ризик їх виникнення після хірургічних втручань зростає через поширення

антибіотикорезистентної мікрофлори. Найбільше значення серед таких збудників мають метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* [12]. У регіонах, де доступ до якісної медичної допомоги є обмеженим, хронічні гнійно-некротичні ураження особливо часто спостерігаються у пацієнтів із трофічними виразками та синдромом діабетичної стопи; за окремими даними, вони можуть виявлятися у 40 % таких хворих [9]. Водночас у країнах із більш розвиненою системою охорони здоров'я завдяки своєчасному хірургічному втручанню та застосуванню антибактеріальної терапії широкого спектра поширеність подібних ран залишається нижчою.

Фактори ризику. До основних чинників, що сприяють розвитку гнійно-некротичних процесів, належать як внутрішні, так і зовнішні причини. Серед ендогенних факторів провідне місце посідає цукровий діабет, оскільки понад 40–60 % випадків гнійно-некротичних уражень нижніх кінцівок реєструють саме у хворих цієї категорії [13]. Високий ризик зумовлений поєднанням порушень мікроциркуляції, тканинної гіпоксії, зниження імунного захисту та підвищеної схильності до інфекційних ускладнень. До факторів ризику також відносять серцево-судинну недостатність, цироз печінки, хронічні захворювання нирок, гіпоальбумінемію, а також вік понад 60 років [11, 14].

Серед екзогенних чинників важливе значення мають травматичні ушкодження шкіри й м'яких тканин, оперативні втручання, недостатня антисептична обробка, контамінація рани та пізній початок лікування [15].

За даними великого ретроспективного дослідження, несвоєчасне проведення хірургічної санації майже вдвічі підвищує ризик летального наслідку [16].

Летальність. Показники смертності при гнійно-некротичних ураженнях істотно варіюють залежно від поширеності патологічного процесу, наявності супутніх захворювань і своєчасності надання медичної допомоги. У

середньому летальність становить 20–35 %, однак у разі розвитку сепсису та поліорганної недостатності вона може перевищувати 50 % [9, 10].

Показниками, що незалежно впливають на погіршення клінічного перебігу найчастіше відносять артеріальну гіпотензію (менше 90 мм рт. ст.), тахікардію понад 130 уд./хв, підвищення рівнів креатиніну та лактату, а також анемію і лейкоцитоз [12].

Окреме значення має своєчасність першої хірургічної санації, оскільки її відтермінування істотно підвищує ризик летального наслідку [14]. Результати багатоцентрових досліджень свідчать, що раннє виявлення патології та своєчасне радикальне хірургічне втручання є визначальними умовами зниження смертності: виконання операції без зволікання дозволяє майже вдвічі зменшити ризик смерті [16].

Таким чином, гнійно-некротичні рани й надалі залишаються серйозною проблемою сучасної медицини, яка потребує комплексного підходу до профілактики, діагностики та лікування. Незважаючи на впровадження сучасних методів, зокрема вакуумної терапії, антибактеріальних пов’язок і засобів регенеративної медицини, ефективність лікування значною мірою визначається саме своєчасністю втручання. Зниження захворюваності та летальності можливе насамперед за рахунок ранньої діагностики, активної хірургічної тактики та корекції основних факторів ризику.

1.2. Гнійно-некротичні рани: патогенез і фази загоєння

Гнійно-некротичні рани являють собою тяжкий патологічний процес, що розвивається внаслідок ушкодження тканин і супроводжується їх некрозом та гнійним запаленням. Для таких уражень характерні значна втрата життєздатних тканин, інтенсивна запальна реакція та приєднання бактеріальної інфекції, що ускладнює перебіг репаративних процесів [17].

Формування некротичних уражень може бути зумовлене дією різних етіологічних чинників, серед яких травматичні пошкодження, термічні ураження, зокрема опіки й обмороження, порушення місцевого кровообігу ішемічного характеру, інфекційні агенти, радіаційний вплив і хімічні ушкодження [18]. Особливо важливе значення мають стани, що супроводжуються недостатнім кровопостачанням тканин, зокрема цукровий діабет і атеросклеротичні ураження судин. Під впливом зазначених факторів погіршується трофіка тканин, розвивається їх відмирання, а в зоні ушкодження створюються сприятливі умови для розмноження патогенних мікроорганізмів.

Однією з визначальних особливостей гнійно-некротичних ран є складний і тривалий перебіг загоєння. У фізіологічних умовах відновлення ушкоджених тканин забезпечується узгодженою дією природних механізмів регенерації. Проте за наявності некротичних мас, активного інфекційного процесу та хронічного запалення ці механізми суттєво порушуються. Унаслідок цього репарація сповільнюється, а в окремих випадках повноцінне загоєння стає неможливим без цілеспрямованого медичного втручання [19].

Патогенез гнійно-некротичних ран. Розвиток гнійно-некротичних ран зазвичай пов’язаний із проникненням інфекційного агента через ушкоджену шкіру або слизові оболонки. Джерелом інфекції можуть бути як зовнішні чинники, тобто контамінація з навколишнього середовища, так і внутрішні - наявні в організмі осередки хронічної інфекції.

У відповідь на проникнення мікроорганізмів в організмі запускається запальна реакція, яка проявляється набряком, гіперемією, болем і локальним підвищенням температури тканин. Одночасно активуються клітини імунної системи, що продукують прозапальні цитокіни та хемокіни, необхідні для обмеження та елімінації інфекції. Проте при гнійно-некротичних ураженнях перебіг цього процесу ускладнюється вираженим пошкодженням тканин і накопиченням некротичних мас. Останні не лише перешкоджають

нормальному очищенню рани, а й створюють сприятливі умови для подальшого розмноження бактерій, підтримуючи тривале запалення [20].

Важливу роль у прогресуванні патологічного процесу відіграє порушення кровопостачання в ураженій ділянці, яке може бути зумовлене тромбозом судин або токсичною дією бактеріальних агентів. Недостатня перфузія тканин сприяє розвитку некрозу та формуванню анаеробних умов, сприятливих для росту патогенних мікроорганізмів, зокрема анаеробних бактерій, таких як *Clostridium perfringens*, що асоціюються з розвитком газової гангрени. Наявність некротичних тканин істотно ускладнює перебіг репаративних процесів, перешкоджає нормальному загоєнню та підвищує ризик тяжких ускладнень, у тому числі сепсису.

Отже, патогенез гнійно-некротичних ран є багатокомпонентним і охоплює взаємопов’язані процеси інфікування, запальної відповіді, тканинного некрозу та порушення репарації [20].

Фази загоєння гнійно некротичних ран. Процес загоєння гнійно-некротичних ран є складним, багатоступеневим і спрямованим на відновлення структури та функцій ушкоджених тканин. Його перебіг охоплює кілька послідовних фаз, кожна з яких має власне біологічне значення та забезпечується специфічними клітинними і молекулярними механізмами [21]. Загалом у репарації ран виділяють три основні фази: запалення, проліферацію та ремоделювання.

Фаза запалення розпочинається відразу після ушкодження тканин і триває від кількох годин до кількох діб. Її головне призначення полягає у зупиненні кровотечі, локалізації ушкодження та підготовці ранової поверхні до подальшого відновлення. На початковому етапі відбувається гемостаз: спочатку судини звужуються для обмеження крововтрати, а згодом розширюються, що полегшує міграцію клітин запалення в осередок ушкодження. Активовані тромбоцити беруть участь у формуванні фібринового згустку, який виконує захисну бар’єрну функцію. Одночасно вивільняються фактори, зокрема PDGF і TNF-α, які сприяють залученню

нейтрофілів і макрофагів. Нейтрофіли з’являються в зоні рани вже впродовж перших 24 годин і забезпечують її очищення від мікроорганізмів та тканинного детриту. У подальшому провідну роль починають відігравати макрофаги, які не лише продовжують фагоцитоз, а й секретують фактори росту, зокрема VEGF і TGF-β, необхідні для переходу до наступного етапу репарації [21].

Фаза проліферації, як правило, починається на 3-4 добу після ушкодження і триває приблизно до двох тижнів. У цей період формується грануляційна тканина, яка є тимчасовою опорною структурою для відновлення рани. Фібробласти активно синтезують колаген III типу, фібронектин, глікозаміноглікани та інші компоненти міжклітинного матриксу. Одночасно посилюється ангіогенез - утворення нових кровоносних судин, необхідних для забезпечення тканин киснем і поживними речовинами. Ключову регуляторну роль у цьому процесі відіграє VEGF. Паралельно активуються проліферація та міграція кератиноцитів, завдяки чому відбувається поступова епітелізація ранової поверхні [22].

Фаза ремоделювання, або дозрівання, настає через 2-3 тижні після ушкодження та може тривати від кількох місяців до року залежно від площі, глибини й характеру рани. У цей період грануляційна тканина поступово трансформується в зрілішу сполучну тканину. Колаген III типу, який переважав на попередньому етапі, заміщується міцнішим колагеном I типу, що підвищує механічну стійкість новоутвореної тканини. Надлишкові клітини й судини, потреба в яких зникає, елімінуються шляхом апоптозу. Водночас відбувається перебудова позаклітинного матриксу, яка регулюється матриксними металопротеїназами. За сприятливого перебігу формується функціонально повноцінна рубцева тканина, хоча її міцність зазвичай становить лише 70-80 % від початкової міцності неушкодженої шкіри [21, 22].

Порушення на будь-якому з етапів загоєння можуть призводити до патологічної репарації. Так, надмірна активність фібробластів у поєднанні з недостатнім розщепленням колагену здатна зумовити утворення

гіпертрофічних рубців або келоїдів. Водночас недостатній ангіогенез, слабка клітинна проліферація чи дефіцит матриксного синтезу можуть сприяти формуванню хронічних ран, що тривалий час не загоюються. Саме тому поглиблене розуміння фазності та механізмів репаративного процесу має принципове значення для вдосконалення лікування і пошуку нових терапевтичних підходів [23].

1.3. Фактори росту як ключові регулятори загоєння

Фактори росту (ФР) - це білкові та глікопротеїнові молекули, які виконують функцію міжклітинних месенджерів, координуючи ключові процеси проліферації, диференціації, міграції, виживання та апоптозу клітин. Вони взаємодіють із специфічними рецепторами на поверхні клітин-мішеней і запускають каскади внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase), PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B) та регуляторні білки родини SMAD (учасники сигнального шляху TGF-β), що забезпечує адаптивну відповідь організму на фізіологічні та патологічні стимули.

У межах ембріонального розвитку фактори росту регулюють морфогенез органів, у дорослому організмі - підтримують гомеостаз тканин, а при ушкодженнях – ініціюють та координують репаративні процеси. Окрім того, дисбаланс у їхній експресії або рецепторній активності лежить в основі низки захворювань: від фіброзів і хронічних ран до онкологічних і нейродегенеративних станів [24].

1.3.1. Класифікація і джерела синтезу факторів росту

Класифікація факторів росту ґрунтується на їхній молекулярній структурі, типі рецепторів і механізмах дії.

Однією з найбільших груп є фібробластичні фактори росту (FGF), до якої належить понад 22 гомологічні білки масою 17-34 кДа. Ці ліганди зв'язуються з чотирма основними тирозинкіназними рецепторами FGFR1-4 (fibroblast growth factor receptors 1-4, рецептори фібробластного фактора росту 1-4), активуючи MAPK/ERK та PI3K/AKT шляхи. FGF продукують фібробласти, макрофаги, ендотеліальні клітини та мезенхімальні стовбурові клітини, і особливо важливим є FGF-2, який стимулює формування грануляційної тканини та неоангіогенез у зонах ушкодження. FGF також бере участь у метаболізмі, регуляції розвитку кісткової та нервової тканин, сприяючи їхній відновлювальній здатності. Підвищена активність FGF/FGFR асоціюється з патологічним ангіогенезом при пухлинах і фіброзом печінки, що робить цю систему перспективною мішенню для терапевтичних втручань у лікуванні пухлин, зокрема карцином [25].

До трансформуючих факторів росту (TGF) входять дві основні групи лігандів – TGF-α та TGF-β. TGF α належить до родини EGF-подібних білків і взаємодіє з рецептором EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор епідермального фактора росту), стимулюючи проліферацію епітелію. TGF-β ліганди (β1, β2, β3) активують рецептори серин/треонінкінази типу I та II, що призводить до фосфорилювання SMAD2/3, їхньої димеризації з SMAD4 і транслокації в ядро, де вони регулюють транскрипцію генів, відповідальних за апоптоз, імунорегуляцію та синтез позаклітинного матриксу.

TGF-β синтезують тромбоцити, макрофаги, фібробласти й епітеліальні клітини, але він секретується у латентній формі, що активується протеазами та механічним напруженням у рані. Саме TGF-β є ключовим індуктором фіброзу, оскільки стимулює синтез колагену I та III типів і гальмує надмірну

проліферацію клітин-мішеней, що є важливим для запальних процесів і процесів загоєння тканин. Через свою роль у фіброзі та імунній регуляції TGF-β має вирішальне значення у патологічних станах, таких як хронічні запальні захворювання та фіброзні порушення органів [26].

Епідермальний фактор росту (EGF) є низькомолекулярним білком (~6 кДа), що взаємодіє з EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор епідермального фактора росту), активуючи MAPK, PI3K та JAK/STAT шляхи. Його продукують макрофаги, слинні залози, епітеліальні клітини й тромбоцити. EGF прискорює міграцію кератиноцитів і синтез глікозаміногліканів і колагену, сприяючи епітелізації та ремоделюванню дерми при загоєнні ран. Оскільки EGF важливий для підтримки бар'єрної функції епітелію, він має вирішальне значення при відновленні шкіри після травм. У клініці EGFR-інгібітори застосовують при лікуванні карцином, де надмірна активація цього шляху сприяє пухлинному росту, особливо при раку легень, шлунка та шиї [27].

Інсуліноподібні фактори росту IGF-I та IGF-II структурно подібні до інсуліну й взаємодіють із тирозинкіназним рецептором IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor, рецептор інсуліноподібного фактора росту 1), а також можуть зв'язуватися з інсуліновим рецептором при високих концентраціях. Основним джерелом IGF є печінка, проте інші тканини також продукують ці білки. У циркуляції IGF зв'язуються з шістьма IGF-зв'язувальними білками (IGFBP1-6), які регулюють їхню біодоступність. Активація IGF-1R запускає PI3K/AKT та MAPK шляхи, що стимулює ріст і пригнічує апоптоз. IGF-I критично важливий для постнатального росту, IGF-II - для ембріогенезу, а дисрегуляція цієї системи пов'язана з кардіоміопатією та онкологією, зокрема з пухлинами печінки та шлунка. IGF також має важливу роль у відновленні тканин після травм, тому порушення в його синтезі і функціонуванні можуть призводити до погіршення загоєння ран та розвитку патологічних процесів в організмі [28].

Сімейство факторів росту ендотелію судин (VEGF) складається з VEGF -A, -B, -C, -D та плацентарний фактор росту (PlGF), які зв'язуються з рецепторами VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, рецептор судинного ендотеліального фактора росту 1), VEGFR-2 та VEGFR-3. Ці ліганди продукуються ендотеліоцитами, макрофагами, фібробластами та тромбоцитами у відповідь на гіпоксію, опосередковану HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, фактор, індукований гіпоксією 1 альфа). VEGF-A стимулює ангіогенез і судинну проникність, VEGF-C/D - лімфангіогенез. Існування різних ізоформ VEGF-A (121, 165, 189 амінокислот) зумовлює різну здатність зв'язуватися з гепаран сульфатом у матриксі, що визначає їхній просторовий розподіл і тривалість дії в тканинах. VEGF є важливим у загоєнні ран і репарації тканин, оскільки він стимулює проростання нових судин, забезпечуючи киснем і поживними речовинами ділянки пошкодження. У клініці анти-VEGF терапія (наприклад, бевацизумаб) застосовується для інгібування пухлинного ангіогенезу та лікування макулярного набряку [29].

Тромбоцитарний фактор росту (PDGF) представлений димерами PDGF AA, BB, AB, які зв'язуються з рецепторами PDGFR-α (platelet-derived growth factor receptor alpha, рецептор тромбоцитарного фактора росту α) та PDGFR-β, обидва - тирозинкіназні. PDGF продукують тромбоцити, макрофаги, ендотеліальні клітини та фібробласти. Він стимулює проліферацію клітин мезенхімального походження – фібробластів та гладеньком'язових клітин - і бере участь у васкулогенезі й рубцюванні. PDGF є важливим у регенерації судинної стінки після травм, а також у процесах загоєння ран, сприяючи формуванню рубцевої тканини. Контроль експресії PDGFR є важливим для запобігання патологічному фіброзу, оскільки його надмірна активація може призводити до розвитку фіброзу в різних органах, таких як легені та серце [30].

Нарешті, нейротрофічні фактори росту (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) зв'язуються з рецепторами TrkA (tropomyosin receptor kinase A,

тропоміозиновий рецептор кінази A), TrkB (тропоміозиновий рецептор кінази B), TrkC (тропоміозиновий рецептор кінази C) та p75(NTR) (p75 neurotrophin receptor, нейротропний рецептор p75). Їх продукують нейрони, шванівські та гліальні клітини, а також м'язові й ендотеліальні клітини. NGF критично важливий для виживання сенсорних і симпатичних нейронів, BDNF - для пластичності гіпокампу, NT-3 - для розвитку моторних нейронів. Нейротрофіни стимулюють аксональний ріст, синаптичну передачу й можуть бути перспективними терапевтичними агентами при нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона [31].

1.3.2. Механізми дії факторів росту на клітинному рівні

Фактори росту реалізують свої біологічні ефекти шляхом активації специфічних рецепторів на поверхні клітин або в цитоплазмі, ініціюючи складні внутрішньоклітинні сигнальні каскади, що призводять до змін у транскрипції, трансляції, проліферації, міграції або диференціації клітин. Основними сигнальними шляхами, задіяними в цих процесах, є MAPK/ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT, SMAD-залежні шляхи, а також внутрішньоклітинні адаптерні білки, які інтегрують зовнішні сигнали з відповіддю клітини.

Одним із ключових шляхів є MAPK/ERK-каскада, що активується багатьма факторами росту, зокрема FGF, EGF та PDGF. Зв'язування ліганду з рецептором тирозинкіназного типу призводить до автофосфорилювання рецептора та рекрутування адаптерних білків Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2, білок, зв'язаний з рецептором фактора росту 2) і SOS (білок Son of Sevenless), що активують сигнальні білки Ras (від «rat sarcoma»), далі Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma, швидкоплинна фібросаркома), MEK1/2 (MAPK/ERK kinase 1/2, кіназа 1/2 шляху MAPK/ERK), і зрештою ERK1/2 extracellular signal-regulated kinase 1/2, кіназа 1/2, регульована позаклітинними сигналами). Активовані ERK транслокуються в ядро, де фосфорилюють

транскрипційні фактори Elk-1 (ETS-like gene 1, ген, подібний до ETS 1), c-Fos (cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene, клітинний онкоген FBJ мишачої остеосаркоми), Ets (E26 transformation-specific, трансформаційно-специфічний E26), стимулюючи експресію генів, пов'язаних з проліферацією, ангіогенезом та міграцією клітин [32, 33].

Інший критичний шлях – PI3K/AKT, активується після активації рецепторів IGF, EGF, PDGF або VEGF. PI3K фосфорилює фосфатидилінозитоли, утворюючи фосфоліпід PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат), який рекрутує AKT (protein kinase B, протеїнкіназа B) до мембрани, де він активується PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1, 3-фосфогліцерид-дегідрогеназа 1). AKT регулює клітинну виживаність, інгібуючи апоптоз та стимулюючи ріст через активацію ферменту mTOR (mechanistic target of rapamycin, механістична мішень для рапаміцину), що контролює білковий синтез і метаболізм [34]. У тканинах, що регенерують, PI3K/AKT є центральним шляхом виживання клітин у гіпоксичних умовах [35].

JAK/STAT-шлях активується факторами росту, такими як EGF, G-CSF та інтерлейкіни. Активація рецептора призводить до фосфорилювання JAK (Janus-кінази), які, у свою чергу, фосфорилюють STAT-білки (signal transducer and activator of transcription, трансдуктори сигналу та активації транскрипції). Фосфорильовані STAT димеризуються та транслокуються в ядро, регулюючи транскрипцію генів, пов'язаних з проліферацією, диференціацією та імунною відповіддю [36]. Особливо важливою є участь STAT3 у регенерації шкіри та печінки [37].

Фактори з родини TGF-β діють через унікальний SMAD-залежний механізм. Після зв'язування TGF-β з рецепторами серин/треонінкіназного типу, активуються SMAD2/3, які формують комплекс з SMAD4 і транслокуються в ядро. Ці комплекси регулюють експресію генів, що кодують білки позаклітинного матриксу (наприклад, колагени), а також гальмують

проліферацію. SMAD-шлях тісно пов'язаний з процесами фіброзу та ремоделювання тканин після пошкодження [26, 38].

У відповідь на гіпоксію HIF-1α (гіпоксія-індукований фактор 1) активується та ініціює експресію генів, включно з VEGF. Таким чином, VEGF забезпечує ангіогенез і відновлення кровопостачання. HIF-1α стабілізується в умовах низької напруги кисню та відіграє ключову роль у загоєнні ран і формуванні грануляційної тканини [39].

Особливу увагу заслуговують нейротрофіни (NGF, BDNF, NT-3), які діють через рецептори TrkA/B/C і p75(NTR). Їх сигнальні шляхи включають як MAPK/ERK, так і PI3K/AKT, а також фосфоліпазу PLCγ (phospholipase C gamma, фосфоліпаза С гамма), що регулює внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз. Вони сприяють росту аксонів, виживанню нейронів, синаптогенезу, а також регуляції запалення в нервовій системі [31, 40].

Таким чином, фактори росту взаємодіють із клітинними рецепторами, активуючи кілька внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, що координують процеси росту, виживання, міграції та диференціації клітин. Ці механізми є універсальними для регенерації тканин, загоєння ран та патофізіологічних процесів, включно з фіброзом і пухлинним ростом. Дисбаланс у сигнальних шляхах може призводити до хронічного запалення, неефективного відновлення тканин або канцерогенезу, що визначає важливість подальшого вивчення цих механізмів з метою розробки ефективних терапевтичних стратегій.

1.3.3. Взаємозв'язок між факторами росту та іншими медіаторами регенерації

Регенерація тканин є складним багатофакторним процесом, у якому взаємодіють різноманітні сигнальні молекули, зокрема цитокіни, хемокіни, медіатори запалення та фактори росту. Фактори росту не функціонують

ізольовано - їх біологічний ефект пов’язаний із дією інших медіаторів, які регулюють локальне мікросередовище у зоні ушкодження. Така взаємодія є критичною для координації фаз запалення, проліферації та ремоделювання [24].

Одним із центральних механізмів взаємодії є синергічна активація сигнальних каскадів. Наприклад, трансформуючий фактор росту бета (TGF-β) активує SMAD-залежну транскрипцію, але також потенціює ефекти цитокіну інтерлейкіну-1β (IL-1β) через активацію p38 MAPK, що зумовлює посилення синтезу колагену фібробластами [41]. У свою чергу, TNF-α та цитокіни IL-6 (interleukin-6, інтерлейкін-6) модулюють експресію рецепторів до факторів росту, наприклад EGFR, змінюючи чутливість клітин до EGF і стимулюючи проліферацію [42].

Класичним прикладом взаємодії між запальними цитокінами та факторами росту є регуляція гіпоксією. Під впливом гіпоксії активується транскрипційний фактор HIF-1α, який стимулює експресію VEGF – ключового медіатора ангіогенезу. Але HIF-1α також індукує експресію хемокіну SDF-1 або CXCL12 (stromal-derived factor 1, фактор, що походить від строми 1), що залучає клітини-попередники ендотелію, і підвищує синтез глікопротеїнового гормону EPO (erythropoietin, еритропоетин), та таких факторів росту IGF і PDGF [43]. Така координація забезпечує ефективне формування судинної мережі в ушкоджених тканинах.

Багато факторів росту, зокрема FGF та IGF, мають потужні імуномодулювальні властивості. Наприклад, FGF-2 пригнічує продукцію прозапальних цитокінів, таких як IL-12, і водночас стимулює експресію IL-10, що зменшує хронічне запалення [25]. IGF-1 здатен гальмувати апоптоз нейтрофілів і макрофагів на ранніх стадіях загоєння, підтримуючи клітинний пул для очищення ушкодженої зони [34]. PDGF також стимулює хемотаксис макрофагів і посилює вивільнення TGF-β, формуючи позитивний зворотний зв’язок [30].

Важливу роль у регенерації відіграють матриксні металопротеїнази (ММР), які контролюють ремоделювання позаклітинного матриксу. Їхня експресія регулюється як запальними медіаторами (IL-1β, TNF-α), так і факторами росту (EGF, TGF-β). Наприклад, ММР-9 індукується TNF-α, але її активність стабілізується в присутності VEGF, що забезпечує контрольовану деградацію базальної мембрани під час ангіогенезу [32]. У той же час надмірна активація ММР без регуляції з боку TGF-β може призвести до патологічної деструкції тканин.

Нейротрофіни (NGF, BDNF) також діють у тісному зв'язку з імунними медіаторами. NGF стимулює продукцію простагландинів у макрофагах, активує мікроглію та впливає на вивільнення цитокінів центральною нервовою системою, що важливо при пошкодженнях спинного мозку [23]. Більше того, BDNF може бути індуктором IL-6 у нейронах, що свідчить про двонаправлену взаємодію між нейротрофічною підтримкою та запальними процесами [40].

Отже, фактори росту не є ізольованими активаторами регенерації – їхній ефект реалізується через складну сітку взаємодій з іншими медіаторами, які координують клітинні відповіді. Порушення цього балансу, наприклад, хронічне запалення з надмірною продукцією TNF-α чи IL-1β, може змінити функцію факторів росту з регенеративної на патологічну, спричиняючи фіброз або неоплазію. Отже, розуміння цих взаємозв'язків має ключове значення не лише для фундаментальної біології, але й для розробки цілеспрямованої терапії, яка враховує контекст тканинного мікрооточення.

1.3.4. Вплив факторів росту на проліферацію клітин, ангіогенез та ремоделювання тканин

Фактори росту виступають ключовими біологічними медіаторами, що координують складні процеси регенерації тканин. Вони беруть участь у

регуляції клітинної проліферації, утворенні нових кровоносних судин (ангіогенезі), а також у ремоделюванні позаклітинного матриксу, що є завершальним етапом загоєння. Зв'язуючись із специфічними рецепторами на поверхні клітин, ФР активують каскади внутрішньоклітинної сигналізації, що змінюють експресію генів і сприяють відновленню структур та функцій пошкоджених тканин [44].

У фазі проліферації основним завданням є відновлення клітинного складу пошкодженої зони. Епідермальний фактор росту (EGF) стимулює проліферацію кератиноцитів та епітеліальних клітин шляхом активації рецептора EGFR, що ініціює MAPK/ERK сигнальний шлях і призводить до транскрипційної активації генів, пов'язаних із клітинним циклом [27].

Подібну дію має фактор росту фібробластів 2 (FGF2), який, зв'язуючись із рецепторами FGFR1 та FGFR2, активує сигнальні шляхи Ras/MAPK і PI3K/AKT, що стимулюють проліферацію фібробластів, а також синтез колагену й інших структурних білків матриксу [45]. Тромбоцитарний фактор росту (PDGF-BB) стимулює поділ та хемотаксис фібробластів і перицитів, відіграючи ключову роль у формуванні грануляційної тканини [30].

Одночасно з проліферацією клітин у зоні ушкодження активується ангіогенез, необхідний для доставки кисню та метаболітів. Основним медіатором цього процесу є VEGF-A, який індукує проліферацію, міграцію та диференціацію ендотеліальних клітин через активацію VEGFR-2. VEGF підвищує судинну проникність і сприяє формуванню нових капілярів у гіпоксичних умовах [29]. Синергічну роль у процесі ангіогенезу відіграє FGF2, який через зв'язування з гепаран-сульфатом у позаклітинному матриксі забезпечує стимуляцію ендотеліоцитів і формування судинної сітки [25].

У свою чергу, білок ангіопоєтін-1 стабілізує нещодавно утворені судини, зменшуючи їхню надмірну проникність і підвищуючи структурну цілісність капілярів [46].

Завершальною фазою процесу регенерації є ремоделювання тканин. Цей етап передбачає деградацію тимчасового матриксу та його заміну на стабільну

структуру. Ключову роль у цьому процесі відіграє трансформуючий фактор росту бета (TGF-β1), який через SMAD2/3-залежну передачу сигналу стимулює експресію генів, відповідальних за синтез колагену I та III типів, а також індукує диференціацію фібробластів у контрактильні міофібробласти в тканинах [47]. Паралельно активуються матриксні металопротеїнази (MMP-2 та MMP-9), що деградують залишки пошкодженого матриксу та сприяють клітинній міграції. Надмірна активність MMP може спричинити патологічне ремоделювання, тому їх експресія ретельно регулюється цитокінами та протизапальними факторами, зокрема IL-10 [48].

Таким чином, фактори росту не лише ініціюють регенеративні процеси, а й координують усі їхні етапи — від активації проліферації клітин до відновлення васкуляризац й остаточного ремоделювання тканин. Розуміння молекулярної біології дії ФР має ключове значення для розвитку сучасної регенеративної медицини, біоінженерії та створення нових терапевтичних стратегій.

1.3.5. Клінічне застосування факторів росту: перспективи регенеративної медицини

ФР є ключовими сигнальними молекулами, що координують процеси відновлення пошкоджених тканин. При гнійно-некротичних ураженнях, особливо у разі хронічного або інфікованого перебігу, спостерігається зниження рівня ендогенних ФР у зоні ушкодження, що зумовлює порушення проліферації, ангіогенезу та ремоделювання. Саме тому впровадження терапії з використанням екзогенних ФР розглядається як перспективна стратегія для нормалізації репаративної відповіді [44].

Одним із найпоширеніших клінічних підходів є застосування тромбоцитарної аутоплазми (PRP, platelet-rich plasma), що містить концентровані рівні PDGF, TGF-β, VEGF, EGF та IGF-I. Введення PRP у зону

гнійно-некротичного ушкодження сприяє підвищенню локальної концентрації ФР, стимулює проліферацію клітин, посилює неоангіогенез і прискорює очищення та грануляцію рани. Дослідження свідчать про ефективність PRP у лікуванні хронічних трофічних виразок, у тому числі з некротичним та інфікованим компонентом [49].

Ще одним клінічно апробованим підходом є використання рекомбінантних ФР, створених методами генної інженерії. Зокрема, рекомбінантний епідермальний фактор росту (rhEGF) продемонстрував значне прискорення загоєння гнійно-некротичних ран у пацієнтів з діабетичною ангіопатією [50]. У свою чергу, рекомбінантний PDGF-BB у складі препарату «Becaplermin» дозволив скоротити терміни епітелізації в пацієнтів з глибокими ураженнями нижніх кінцівок [51]. Однак їх клінічне використання ускладнюється коротким періодом напіврозпаду та необхідністю контролю над локальною активністю.

З метою подолання цих обмежень активно досліджуються біоінженерні платформи доставки ФР, зокрема гідрогелі, наночастинки, полімерні матрикси. Ці технології забезпечують контрольоване вивільнення ФР у зоні гнійного дефекту, мінімізуючи ризик надмірної проліферації та фіброзу. Наприклад, іммобілізація FGF2 в гідрогелях на основі гіалуронової кислоти забезпечила пролонговану біоактивність і стимулювала відновлення м’яких тканин у тваринних моделях [52].

Іншим важливим напрямом є комбіноване використання ФР і клітинних технологій, зокрема трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Ці клітини продукують широкий спектр ендогенних факторів росту, водночас підвищуючи чутливість мікрооточення до екзогенних сигнальних білків. У моделі інфікованої рани застосування МСК разом з рекомбінантним людським фактором росту ендотелію судин (rhVEGF) підвищувало щільність капілярної мережі та сприяло швидшому очищенню від некрозу [53].

Незважаючи на значні досягнення, клінічне застосування ФР у лікуванні гнійно-некротичних ран потребує подальших досліджень. Залишається відкритим питання стандартизації дозування, тривалості експозиції, безпеки при тривалому використанні, а також ймовірності стимуляції пухлинного росту в осередках хронічного запалення [48]. Вирішення цих питань можливе за допомогою біомедичних платформ, які забезпечать адресність дії та біосумісність.

Таким чином, терапевтичне застосування факторів росту відкриває нові можливості у лікуванні гнійно-некротичних ран, дозволяючи модулювати клітинну активність, відновлювати ангіогенез та покращувати якість регенерації. Комплексне вивчення динаміки рівня ФР на тлі ранового процесу дає підґрунтя для розробки персоналізованих схем лікування в регенеративній медицині.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви та матеріали

Для створення ензимної композиції застосовували фракції протеаз, виділені з тканин морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus*. Їх одержували методом іонообмінної хроматографії з використанням носія Q-Sepharose (Sigma-Aldrich, США).

Високу протеолітичну активність отриманих фракцій підтверджували за допомогою ензим-електрофорезу, де як субстрати використовували колаген, желатин і фібриноген. У очищених зразках домінували металозалежні протеази та серинові протеїнази, причому їх співвідношення мало видові особливості: для *O. validus* – 67% і 30%, а для *S. neumayeri* – 34% і 44% відповідно. Основою композиції слугував 0,6% карбопол Carbopol 980, який забезпечував гелеву структуру препарату.

Під час виконання роботи використовували ряд реактивів, необхідних для проведення експериментальних етапів дослідження. Зокрема, для забезпечення анестезії застосовували ксилазину гідрохлорид (Ксила, Interchemie). Формування гелевої основи забезпечував Carbopol 980 (Lubrizol, Бельгія). Для виявлення та оцінки ростових факторів використовували первинні поліклональні антитіла до PDGF A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α, TGF, VEGF і NGF виробництва (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США). Імунодетекцію проводили із застосуванням вторинних антитіл, кон’югованих із пероксидазою хрону (Sigma-Aldrich, Louis St, MO). Для візуалізації реакції використовували хромоген о-фенілендіамін (ОФД) того ж виробника.

Додаткові хімічні реактиви, тобто солі, луги, спирти, кислоти, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче ч.д.а.

2.2. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин

Досліди на лабораторних щурах проводили у віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Організація та виконання експериментів відповідали міжнародним етичним стандартам біомедичних досліджень за участю тварин. У роботі дотримувалися вимог, викладених у документі «Загальні принципи роботи на тваринах», ухваленому I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), а також положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

2.3. Відтворення моделі гнійно-некротичної рани на щурах та дизайн експерименту

У дослідження було включено 50 білих нелінійних статевозрілих щурів-самців масою 200–250 г. Тварин поділили на дві групи – контрольну та дослідну - по 25 особин у кожній. На кожну часову точку спостереження (3, 6, 9, 14 доба та період повного загоєння) припадало по 5 тварин із кожної групи.

Щурів утримували в стандартних умовах віварію при температурі 22 ± 3 °C, відносній вологості 60 ± 5 % та світловому режимі 12/12 год, із вільним доступом до води та корму. Перед початком експерименту тварини проходили акліматизацію протягом 7 діб.

Усі маніпуляції, що супроводжувалися больовими відчуттями, проводили після попереднього знеболювання ксилазину гідрохлоридом («Ксила», Interchemie) у дозі 20 мг/кг маси тіла. Препарат вводили внутрішньочеревинно. Упродовж усього експерименту тварин утримували в індивідуальних клітках.

Модель гнійно-некротичної рани відтворювали шляхом підшкірного введення 10 % розчину $CaCl_2$ в об’ємі 0,1 мл [54]. При цьому контролювали,

щоб площа сформованих ран не перевищувала 400 мм². На 4–5 добу проводили некротомію уражених ділянок, після чого розпочинали місцеве лікування, яке тривало до повної епітелізації рани.

Було сформовано дві групи тварин: «Контроль» (n = 25) і «Лікування» (n = 25). Щурам дослідної групи один раз на добу наносили на ранову поверхню ензимну композицію, приготовлену на основі 0,6 % карбополу з додаванням очищених фракцій протеїназ, виділених із тканин *S. neumayeri* та *O. validus*. Концентрацію активних компонентів підбирали так, щоб сумарна протеолітична активність препарату становила 1 казеїнолітичну одиницю на 1 мл гелю. Тварини контрольної групи лікування не отримували.

Ранозагоювальний ефект оцінювали за зміною площі рани, яку визначали в мм² за допомогою прозорого трафарету на 0, 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 27 та 30 добу експерименту. Спостереження тривали до повного рубцювання рани.

Евтаназію тварин проводили у визначені часові точки - на 3, 6, 9, 14 добу, а також після повної епітелізації - методом дислокації шийного відділу хребта відповідно до етичних норм.

2.4. Отримання сироватки крові щурів

Після евтаназії тварин забір крові здійснювали шляхом пункції серця в стерильних умовах. Отримані зразки витримували при температурі +37 °C протягом 30 хв для природного згортання. Далі кров центрифугували при 2500 g упродовж 15 хв. Після центрифугування сироватку обережно відбирали у стерильні мікропробірки, уникаючи потрапляння формених елементів крові. Зразки зберігали при температурі –20 °C до подальшого використання.

2.5. Отримання гомогенату шкіри

Для локального визначення рівня факторів росту після евтаназії у тварин відбирали ділянку шкіри по краю рани у вигляді кільця завширшки приблизно 2–3 мм. Центральну некротизовану частину ранового дефекту до аналізу не включали. Відібрану тканину промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували та гомогенізували у співвідношенні 1:10 (маса тканини до об’єму буфера) у 0,05 М трис-HCl буфері з pH 7,4, що містив 0,13 М NaCl. Гомогенізацію проводили за допомогою автоматичного гомогенізатора FSH-2A (Vevor, Польща) при швидкості 13 000 об./хв упродовж 2 хв. Отриманий гомогенат центрифугували при 10 000 g протягом 15 хв за температури +4 °С. Після цього супернатант переносили у стерильні мікропробірки та зберігали при –20 °С до проведення подальшого аналізу. Усі етапи підготовки зразків виконували в охолоджених умовах.

2.6. Визначення рівня факторів росту методом імуноферментного аналізу

Вміст факторів росту (PDGF A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α, TGF, VEGF, NGF) визначали методом непрямого імуноферментного аналізу за стандартною схемою.

У лунки мікропланшета вносили по 100 мкл досліджуваних зразків: сироватку крові, попередньо розведену 1:100 у 0,05 М трис-HCl буфері з 130 мМ NaCl (pH 7,4), а також гомогенат шкіри, стандартизований у тому самому буфері до концентрації білка 20 мкг/мл. Після інкубації протягом 18 год при 4 °С лунки промивали буфером того ж складу (pH 7,4), що містив 0,05 % Твін-20; цей розчин надалі використовували як буфер для відмивання. Далі в кожну лунку додавали по 200 мкл 5 % розчину знежиреного молока та інкубували планшет 1 год при +37 °С. Після цього планшет тричі промивали буфером для відмивання і вносили по 100 мкл відповідних первинних

антитіл (Santa Cruz, США), розведених згідно з рекомендаціями виробника. Після інкубації упродовж 1 год при +37 °С лунки знову промивали та додавали по 100 мкл вторинних антитіл, кон'югованих із пероксидазою хрону (Sigma, США). Як субстрат пероксидазної реакції використовували розчин ОФД (Sigma, США), що містив H_2O_2.

Кольорову реакцію проводили протягом 7 хв у темряві за кімнатної температури, після чого зупиняли додаванням 1,5 М H_2SO_4.

Рівень факторів росту оцінювали за величиною зв'язування специфічних антитіл, яку визначали за показниками оптичної густини при довжині хвилі 492 нм. Отримані значення виражали в умовних одиницях (ум.од) на 1 мг білка.

2.7. Визначення концентрації білка

Концентрацію білка в досліджуваних зразках визначали методом Бредфорда, заснованим на взаємодії білків із кумасі діамантовим синім G-250 (КДС) [55]. До 10 мкл проби додавали 190 мкл комерційного реактиву Бредфорда (Bio-Rad, США). Через 2–5 хв інтенсивність забарвлення оцінювали спектрофотометрично при 595 нм порівняно з контрольною пробою, до якої замість біологічного матеріалу вносили 10 мкл води.

Вміст білка визначали за калібрувальним графіком, побудованим із використанням бичачого сироваткового альбуміну як стандартного зразка, і виражали в мг/мл.

2.8. Статистична обробка результатів

Аналіз отриманих результатів здійснювали із застосуванням методів варіаційної статистики в програмі GraphPad Prism версії 9.5.1 (GraphPad Software Inc., США). Оцінку відмінностей між групами проводили за допомогою двостороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Бонферроні для множинних порівнянь. Дані подавали як середнє значення ± стандартне відхилення (SD). Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для кількісної оцінки ефективності загоєння гнійно-некротичних ран було проаналізовано динаміку зміни площі ранової поверхні у контрольній та дослідній групах щурів (табл. 3.1). Отримані дані свідчать про поступове зменшення площі рани в обох групах, однак у тварин, яким застосовували ферментну композицію, цей процес відбувався значно швидше. Починаючи з 9-ї доби експерименту, у дослідній групі спостерігалося статистично значуще зменшення площі ранової поверхні порівняно з контролем ($p < 0,05$), що вказує на прискорення репаративних процесів та більш ефективне очищення і епітелізацію рани.

Таблиця 3.1

Динаміка зміни площі ранової поверхні у дослідних щурів у процесі загоєння гнійно-некротичної рани (мм^2, M ± SD)

Доба	Експериментальна група	
	Контроль	Лікування
0	136,4±5,3	130,2±16,2
3	108,0±6,4	114,4±9,3
6	106,0±7,2	87,0±16,0
9	102,0±6,4	60,4±19,7*
12	49,8±6,9	24,4±6,7*
18	26,6±8,9	5,8±0,2*
21	15,6±8,5	2,0±0,1*
24	3,2±0,1	0,4±0,1*
27	0,2±0,1	Повне загоєння
30	Повне загоєння	-

* – різниця статистично значуща порівняно з контрольною групою на відповідному часовому етапі при $p < 0,05$; $n = 5$. «Нульовою добою» (0 доба) вважали день видалення струпа, що припадав на 5-ту добу після підшкірного введення 10% розчину $CaCl_2$

Наочним підтвердженням отриманих кількісних даних щодо динаміки скорочення площі ранової поверхні є фотографії гнійно-некротичних ран у контрольній та дослідній групах, представлені на рисунку 3.1. Візуальна оцінка стану ран узгоджується з результатами планіметричних вимірювань і демонструє більш швидке очищення, формування грануляційної тканини та епітелізацію у тварин, яким застосовували ферментну композицію.

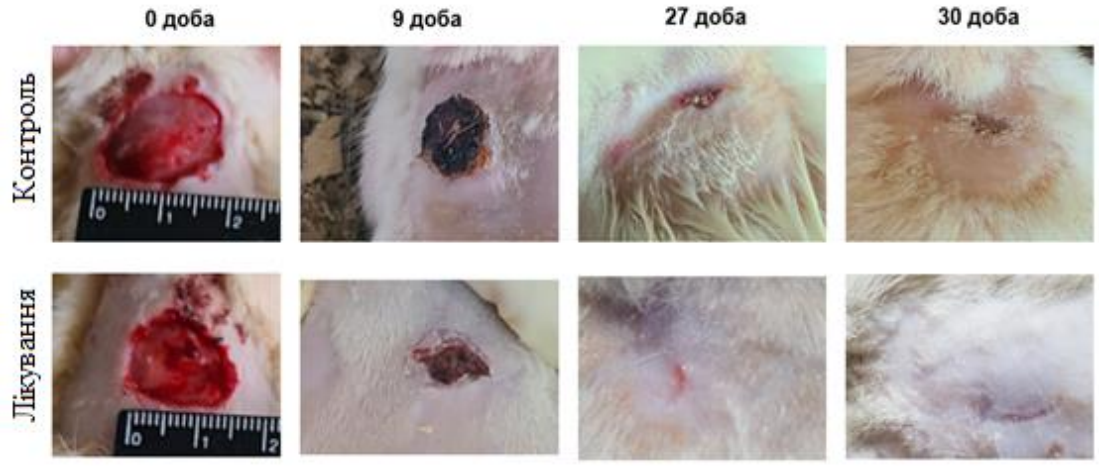

Рис. 3.1. Фотографії гнійно-некротичних ран у щурів контрольної групи (верхній ряд) та щурів, які отримували лікування (нижній ряд) у динаміці загоєння при місцевому застосуванні композиції на основі суміші протеолітичних ферментів, очищених з гідробіонтів Антарктичного регіону (0, 9, 27 та 30 доба експерименту)

Виявлені відмінності у швидкості скорочення площі рани стали підґрунтям для подальшого аналізу молекулярних механізмів регуляції процесів загоєння.

Ефективність репаративних процесів при загоєнні гнійно-некротичних ран значною мірою визначається рівнем специфічних факторів росту, які координують проліферацію, міграцію та диференціацію клітин. У цьому дослідженні було проведено аналіз динаміки концентрації основних факторів росту в гомогенаті шкіри та сироватці крові щурів за умови застосування місцевої протеолітичної композиції на основі біологічно активних речовин

морських гідробіонтів. Оцінка змін у рівнях PDGF-A, FGF, IGF, EGF, HIF-1α, TGF, VEGF та NGF дозволила встановити роль терапії у модулюванні основних фаз загоєння та ремоделювання ушкоджених тканин.

На рисунку 3.2 наведено результати, що відображають динаміку змін вмісту тромбоцитарного фактора росту (PDGF-A) у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами на різних етапах загоєння - на 3, 6, 9, 14 добу та при повному загоєнні.

Порівняння проводили між групами щурів: тварини групи «Контроль» не отримували місцевого лікування, тоді як у групі «Лікування» застосовували ензимну композицію, що містила суміш протеолітичних ферментів, виділених із морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus*. PDGF-A належить до факторів росту, що беруть участь у ранній відповіді тканин на ушкодження та подальших процесах відновлення [30].

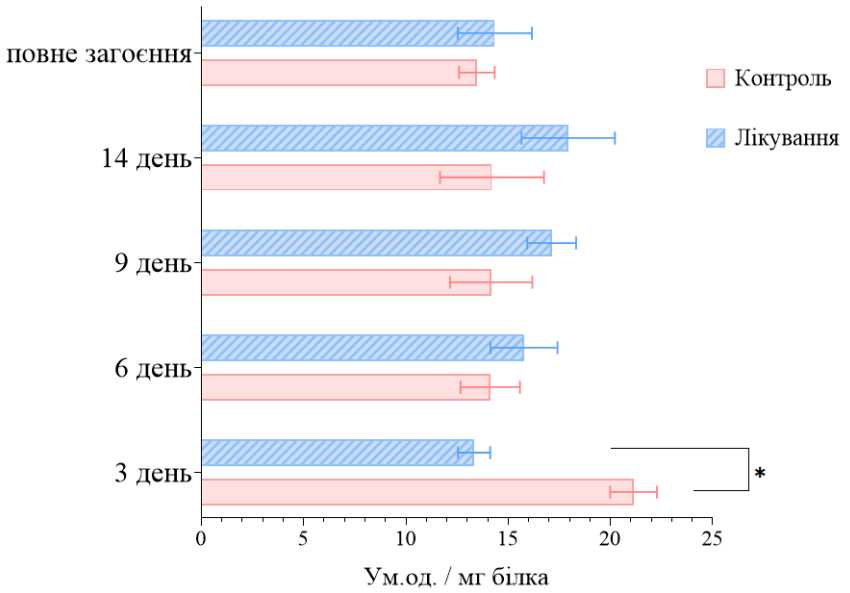

Рис. 3.2. Вміст тромбоцитарного фактора росту у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 3-тю добу після моделювання гнійно-некротичного ураження рівень PDGF-A у групі «Контроль» був достовірно вищим, ніж у групі «Лікування». Це, ймовірно, відображає більш виражену ранню запальну реакцію у тварин без лікування, оскільки PDGF-A бере участь у регуляції ранніх етапів репаративного процесу, зокрема у взаємодії між тромбоцитами, макрофагами та клітинами сполучної тканини.

На 6, 9 та 14 добу у групі «Лікування» відзначалася тенденція до вищого рівня PDGF-A порівняно з контролем, однак ці відмінності не були статистично значущими. Така динаміка може вказувати на активацію репаративних процесів, зокрема проліферації фібробластів, ангіогенезу та ремоделювання позаклітинного матриксу.

При повному загоєнні спостерігалося наближення показників, що може свідчити про завершення активної фази регенерації та поступову нормалізацію регуляції факторів росту.

На рисунку 3.3 наведено результати, що відображають динаміку змін вмісту інсуліноподібного фактора росту (IGF) у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами на різних етапах загоєння.

На 3-тю добу після моделювання гнійно-некротичного ураження рівень IGF у групі «Лікування» був достовірно нижчим порівняно з групою «Контроль». Це може вказувати на відмінність перебігу ранньої фази ранового процесу за умов застосування ензимної композиції. Зниження рівня IGF на цьому етапі, ймовірно, відображає особливості ранньої системної відповіді організму на ушкодження.

На 6-ту добу рівень IGF у групі «Лікування» достовірно перевищував відповідний показник у групі «Контроль». Підвищення вмісту IGF зберігалося і на 9-ту добу, що може вказувати на активізацію процесів проліферації, ангіогенезу та тканинної репарації, оскільки IGF відіграє важливу роль у стимуляції клітинного росту, виживанні клітин та відновленні ушкоджених тканин [28].

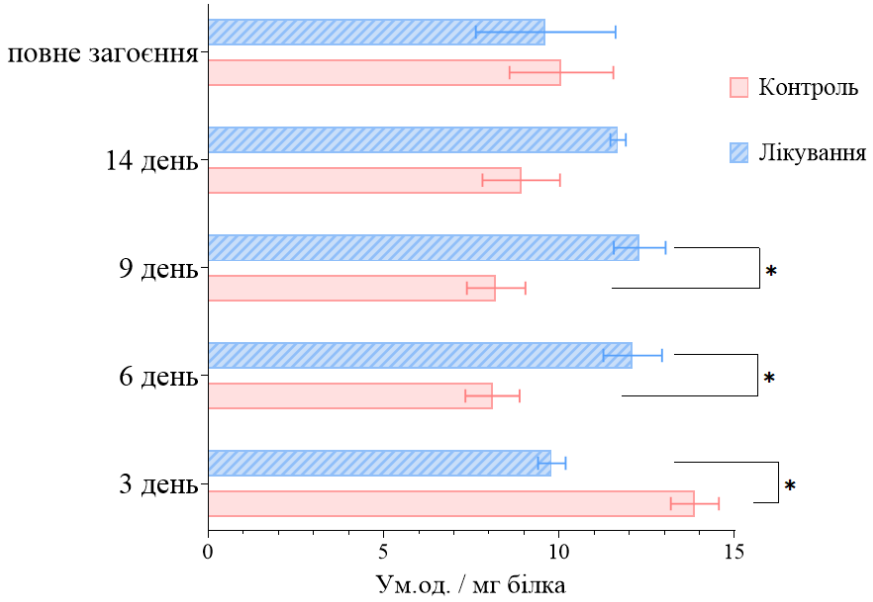

Рис. 3.3. Вміст інсуліноподібного фактора росту у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 14-ту добу в групі «Лікування» рівень IGF залишався вищим порівняно з групою «Контроль», однак статистично значущих відмінностей між групами не виявлено. При повному загоєнні відмінності між групами зменшувалися, що дає підстави припустити про поступове завершення активної фази репаративного процесу та нормалізацію регуляції факторів росту.

Таким чином, застосування ензимної композиції супроводжувалося змінами динаміки IGF у сироватці крові: зниженням на ранньому етапі та достовірним підвищенням на 6-ту і 9-ту добу, що може вказувати на вплив ензимної композиції на перебіг проліферативної фази загоєння.

На рисунку 3.4 наведено результати, що відображають динаміку змін вмісту фактора росту фібробластів (FGF) у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами.

Згідно з отриманими результатами, на 3-тю добу після моделювання гнійно-некротичного ураження рівень FGF у групі «Лікування» був достовірно нижчим порівняно з групою «Контроль». Враховуючи, що FGF є одним із ключових регуляторів проліферації фібробластів, синтезу компонентів позаклітинного матриксу та ангіогенезу [25], зниження його рівня на ранньому етапі може відображати особливості перебігу початкової фази ранового процесу за умов застосування ензимної композиції.

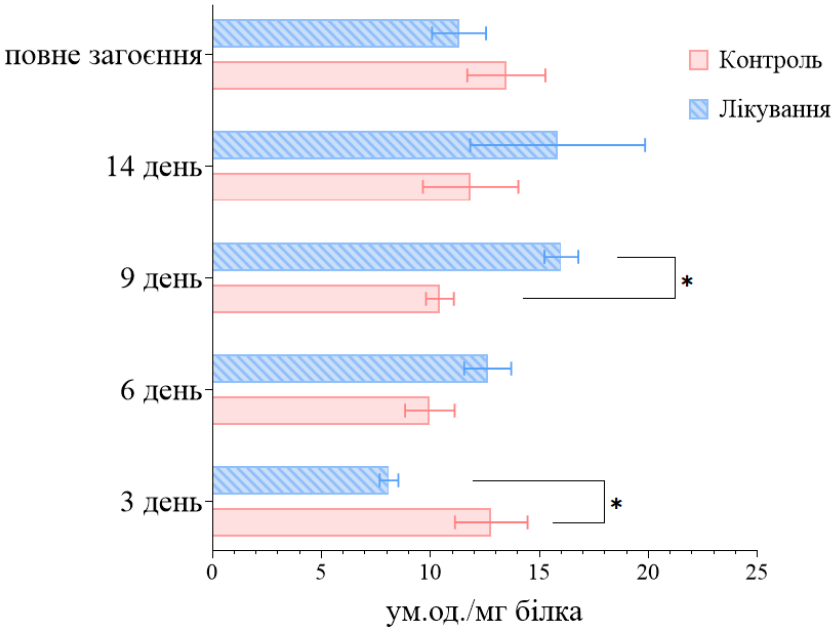

Рис. 3.4. Вміст фактора росту фібробластів у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 6-ту добу рівень FGF у групі «Лікування» зростав і перевищував відповідний показник у групі «Контроль», однак ця різниця не була статистично значущою. На 9-ту добу вміст FGF у групі «Лікування» досягав достовірно вищих значень порівняно з групою «Контроль», що може свідчити

про активацію проліферативної фази загоєння, посилення синтетичної активності фібробластів та стимуляцію ангіогенезу.

На 14-ту добу рівень FGF у групі «Лікування» залишався вищим порівняно з групою «Контроль», проте статистично значущих відмінностей між групами не виявлено. При повному загоєнні показники в обох групах зближувалися, що може свідчити про поступове завершення активних процесів тканинної репарації та ремоделювання.

Отже, застосування ензимної композиції супроводжувалося змінами динаміки FGF: його зниженням на ранньому етапі та подальшим підвищенням у період активної проліферації, що може вказувати на вплив лікування на перебіг репаративних процесів у рані.

Динаміка змін вмісту епідермального фактора росту (EGF) на різних етапах загоєння – 3, 6, 9, 14 добу та при повному загоєнні – наведена на рисунку 3.5. Аналіз отриманих даних показав, що на 3-тю добу після моделювання рани в групі «Лікування» рівень EGF був достовірно нижчим, ніж у групі «Контроль». Такий характер змін може відображати особливості активації механізмів ранньої епітелізації за умов застосування ензимної композиції.

Уже на 6-ту добу в групі «Лікування» вміст EGF перевищував відповідний показник у групі «Контроль», хоча статистично значущої різниці між групами не виявлено. На 9-ту добу рівень EGF у тварин групи «Лікування» був достовірно вищим порівняно з групою «Контроль», що може вказувати на більш виражену активацію процесів, пов’язаних з проліферацією та епітелізацією. Відомо, що EGF є одним із ключових регуляторів міграції та проліферації епітеліальних клітин, а також бере участь у координації відновлення ушкоджених тканин [27].

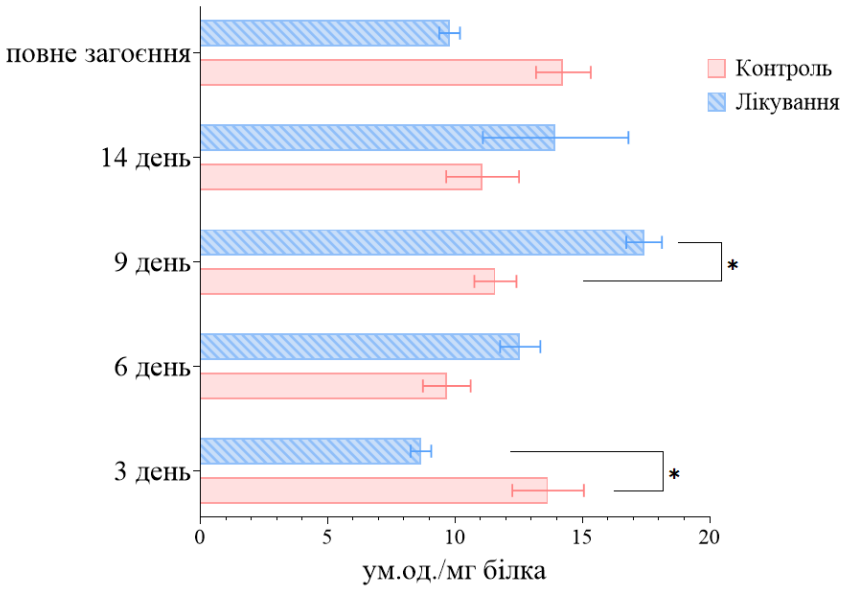

Рис. 3.5. Вміст епідермального фактора росту у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 14-ту добу в обох групах спостерігалося зниження рівня EGF порівняно з попередніми днями, однак у групі «Лікування» його значення залишалося вищим, ніж у групі «Контроль», без статистично значущої різниці. При повному загоєнні вміст EGF зменшувався в обох групах, причому в групі «Контроль» він залишався дещо вищим, ніж у групі «Лікування».

Таким чином, застосування ензимної композиції супроводжувалося зміною часової динаміки EGF: нижчим рівнем на ранньому етапі та його більш вираженим підвищенням у період активної проліферації, особливо на 9-ту добу. Це може свідчити про вплив лікування на регуляцію процесів епітелізації та тканинної репарації.

Згідно з представленою динамікою на рисунку 3.6 видно, що вміст фактора 1α, індукованого гіпоксією (HIF-1α) у сироватці крові щурів змінювався по-різному в групах «Контроль» і «Лікування» протягом усього ранового процесу. У тварин дослідної групи на ушкоджену ділянку наносили

ензимну композицію місцевої дії, тоді як у контролі такого лікування не проводили. На 3-тю добу рівень HIF-1α у групі «Контроль» був достовірно вищим порівняно з групою «Лікування». Така динаміка може вказувати на більш виражену системну відповідь на гіпоксичний стрес у тварин без лікування в ранню фазу ранового процесу. Відомо, що HIF-1α є ключовим регулятором клітинної відповіді на гіпоксію, активуючи експресію генів, пов'язаних з ангіогенезом, енергетичною адаптацією клітин та виживанням у стресових умовах, зокрема VEGF і ферментів гліколізу [39].

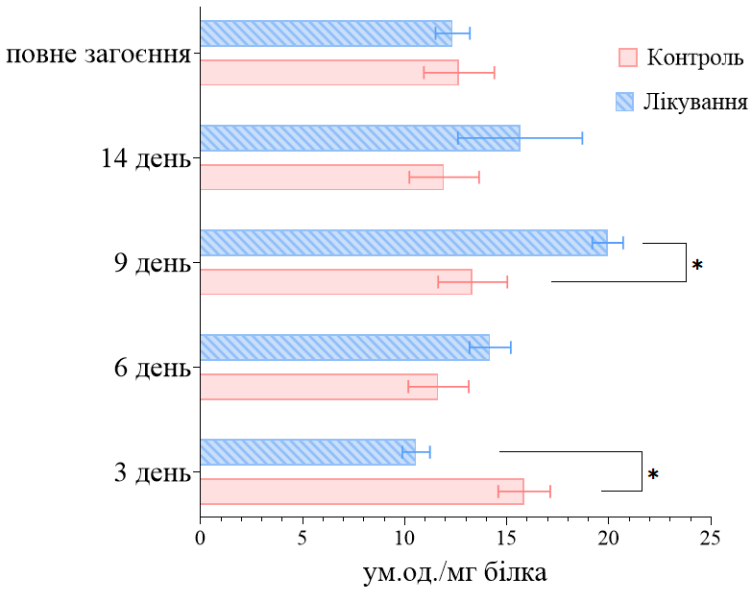

Рис. 3.6. Вміст фактора 1α, індукованого гіпоксією (HIF-1α) у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 6-ту добу в групі «Лікування» рівень HIF-1α підвищувався і дещо перевищував відповідний показник у групі «Контроль», однак статистично значущої різниці між групами не виявлено. На 9-ту добу вміст HIF-1α у групі «Лікування» був достовірно вищим, ніж у групі «Контроль», що дає підстави

припустити про активніше залучення механізмів адаптації до гіпоксії та регуляції репаративних процесів у цей період.

На 14-ту добу рівень HIF-1α у групі «Лікування» залишався вищим порівняно з групою «Контроль», проте без статистично значущої різниці. При повному загоєнні показники в обох групах знижувалися та зближувалися, що, ймовірно, відображає поступове завершення активної фази репарації.

Виходячи з отриманих даних , застосування ензимної композиції супроводжувалося нижчим рівнем HIF-1α на ранньому етапі та його більш вираженим підвищенням на 9-ту добу, що може вказувати на особливості регуляції гіпоксично-залежних механізмів у процесі загоєння рани.

На рисунку 3.7 відображено зміни вмісту трансформуючого фактора росту (TGF) у сироватці крові протягом основних етапів загоєння – на 3, 6, 9 та 14 добу, а також після повного відновлення. Встановлено, що на 3-тю добу рівень TGF у групі «Контроль» був достовірно вищим, ніж у групі «Лікування». Така різниця може відображати більш виражену ранню системну реакцію на ушкодження за відсутності терапії, оскільки TGF бере участь у регуляції клітинної міграції, синтезу позаклітинного матриксу та перебігу репаративних процесів [26].

Надалі співвідношення між групами змінювалося у протилежному напрямку. На 6-ту добу в групі «Лікування» рівень TGF перевищував відповідний показник у групі «Контроль», однак статистично значущої різниці між групами не виявлено. Подібна тенденція зберігалася і на 9-ту добу, що може вказувати на підтримку репаративних процесів у фазу активного відновлення тканин.

Найбільш виражені відмінності у пізніший період спостерігалися на 14-ту добу, коли вміст TGF у групі «Лікування» був достовірно вищим порівняно з групою «Контроль». Це може свідчити про більш тривале залучення TGF-залежних механізмів ремоделювання тканини за умов застосування ензимної композиції.

При повному загоєнні в обох групах спостерігалося наближення показників, хоча в групі «Лікування» рівень TGF залишався дещо вищим.

Наведені результати дають підстави вважати, що динаміка TGF за умов лікування була зміщена у пізні строки: нижчий рівень показника на ранньому етапі поєднувався з його більш вираженим підвищенням у подальші терміни, особливо на 14-ту добу. Такий характер змін може вказувати на особливості регуляції процесів тканинної репарації та ремоделювання.

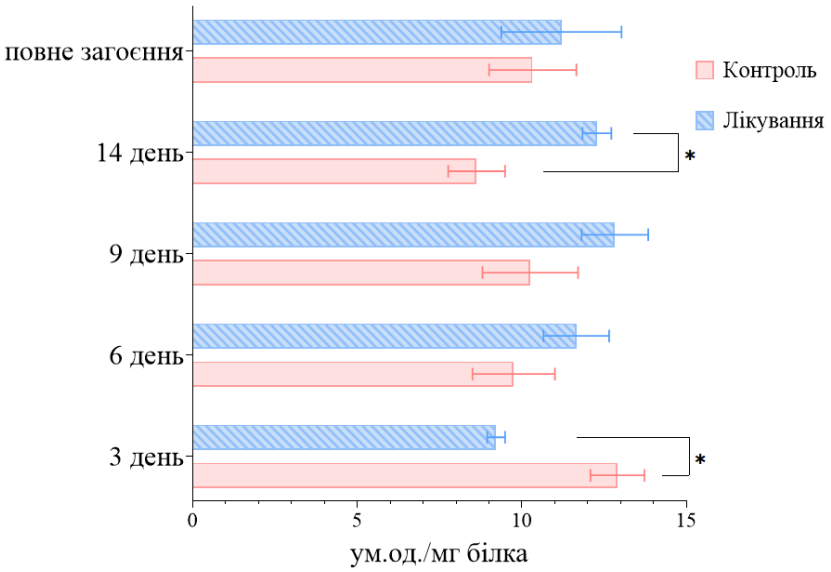

Рис. 3.7. Вміст трансформуючого фактора росту у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На рисунку 3.8 відображено зміни вмісту фактора росту ендотелію судин (VEGF) у сироватці крові щурів із гнійно-некротичними ранами залежно від умов лікування. Аналізували показники у групах «Контроль» і «Лікування». У тварин групи «Лікування» застосовували ензимну композицію. На 3-тю добу після моделювання гнійно-некротичної рани рівень VEGF у групі «Контроль» був достовірно вищим порівняно з групою «Лікування». Це

може відображати більш виражену ранню реакцію на тканинне ушкодження та гіпоксію за відсутності терапії. Відомо, що VEGF є одним із ключових регуляторів ангіогенезу, оскільки бере участь у стимуляції проліферації ендотеліальних клітин, підвищенні судинної проникності та формуванні нових судин [29].

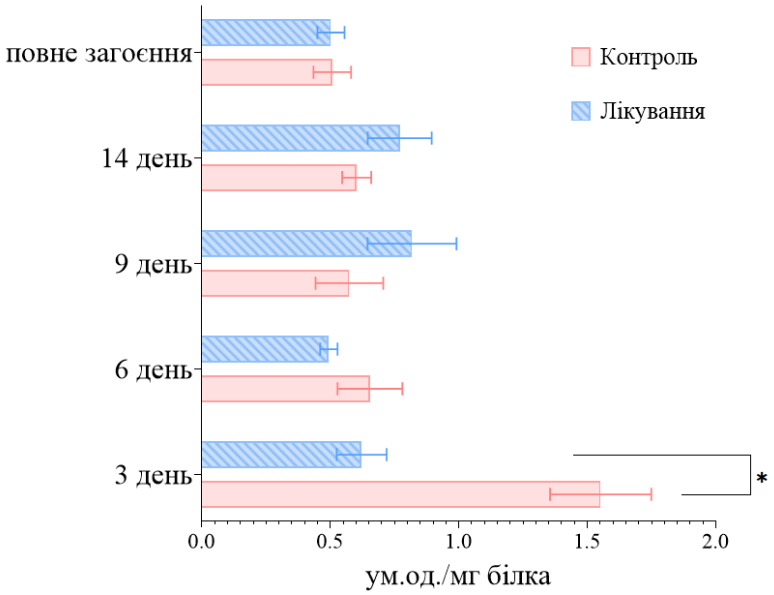

Рис. 3.8. Вміст фактора росту ендотелію судин у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

У подальші дні співвідношення між групами змінювалося. На 6-ту добу рівень VEGF у групі «Лікування» залишався близьким до контрольного, без статистично значущих відмінностей. На 9-ту та 14-ту добу в групі «Лікування» спостерігалася тенденція до вищого вмісту VEGF порівняно з групою «Контроль», що може означати активніше залучення VEGF-залежних механізмів у період тканинної репарації та ангіогенезу.

При повному загоєнні відмінності VEGF в обох групах зменшувалися, що може свідчити про поступове завершення активної фази судинної перебудови.

Виявлена динаміка дозволяє припустити, що за умов застосування ензимної композиції часовий профіль VEGF мав зміщений у пізні строки характер: нижчий рівень показника на ранньому етапі змінювався його відносним підвищенням у подальші терміни, що може вказувати на особливості регуляції ангіогенезу в процесі загоєння гнійно-некротичних ран.

Нервовий фактор росту (NGF) є важливим регулятором процесів регенерації нервової тканини та запальної відповіді [23]. Як видно з рисунка 3.9, вміст NGF у сироватці крові щурів змінювався залежно від терміну загоєння гнійно-некротичної рани та умов лікування.

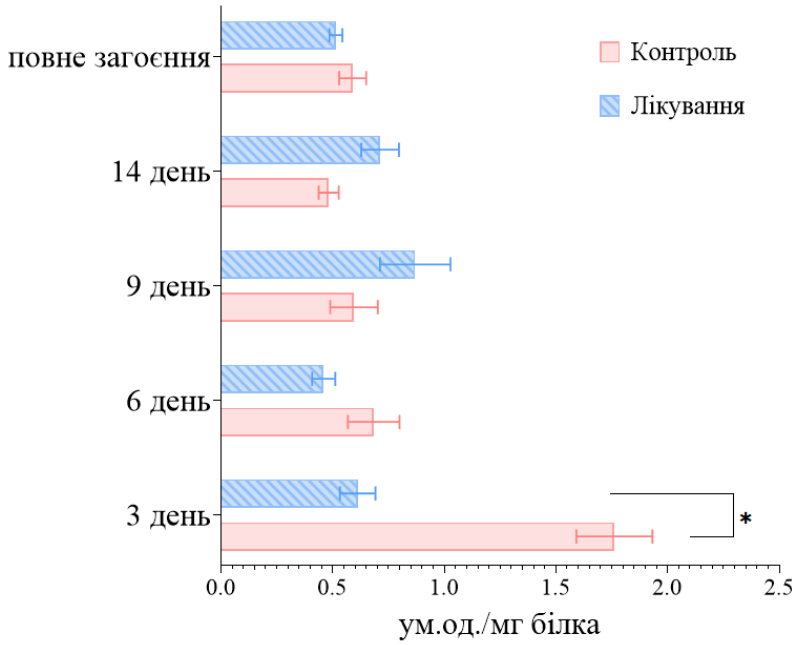

Рис. 3.9. Вміст нервового фактора росту у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 3-тю добу після моделювання ушкодження рівень NGF у групі «Лікування» був достовірно нижчим порівняно з групою «Контроль». Така різниця може відображати менш виражену ранню системну реакцію на

ушкодження за умов застосування ензимної композиції. Відомо, що NGF бере участь не лише у підтримці трофіки нервової тканини, а й у регуляції запальних та репаративних процесів [31].

На 6-ту добу суттєвих відмінностей між групами не виявлено, при цьому рівень NGF у групі «Лікування» залишався нижчим за контрольний. Надалі співвідношення між групами змінювалося: на 9-ту та 14-ту добу в групі «Лікування» спостерігалася тенденція до вищого вмісту NGF порівняно з групою «Контроль», хоча статистично значущої різниці не встановлено. Подібна динаміка може відображати залучення NGF-асоційованих механізмів у пізніші строки репарації.

При повному загоєнні показники в обох групах знижувалися та зближувалися. У цілому виявлені зміни NGF вказують на те, що застосування ензимної композиції супроводжувалося іншим профілем активації цього фактора впродовж ранового процесу: нижчий рівень на ранньому етапі поєднувався з тенденцією до його відносного підвищення у подальші строки.

Аналіз рівнів факторів росту в сироватці крові дозволив оцінити системну відповідь організму на гнійно-некротичне ушкодження та місцеве застосування ферментної композиції. Водночас процеси загоєння реалізуються безпосередньо в тканинах рани, де формується локальне мікросередовище запалення, проліферації та ремоделювання. У зв’язку з цим наступним етапом дослідження було вивчення динаміки факторів росту в гомогенаті шкіри.

На рисунку 3.10 наведено динаміку змін вмісту тромбоцитарного фактора росту (PDGF-A) у гомогенаті шкіри щурів груп «Контроль» і «Лікування» на 3, 6, 9, 14 добу та при повному загоєнні гнійно-некротичної рани.

Встановлено, що на 3-тю добу експерименту рівень PDGF-A у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль».

Оскільки PDGF-A належить до ключових медіаторів ранньої фази ранового процесу і бере участь у залученні клітин запалення, активації

тромбоцитів та ініціації проліферативної відповіді ,зниження його вмісту може відображати меншу інтенсивність початкової тканинної відповіді в зоні ушкодження за умов застосування ензимної композиції [30].

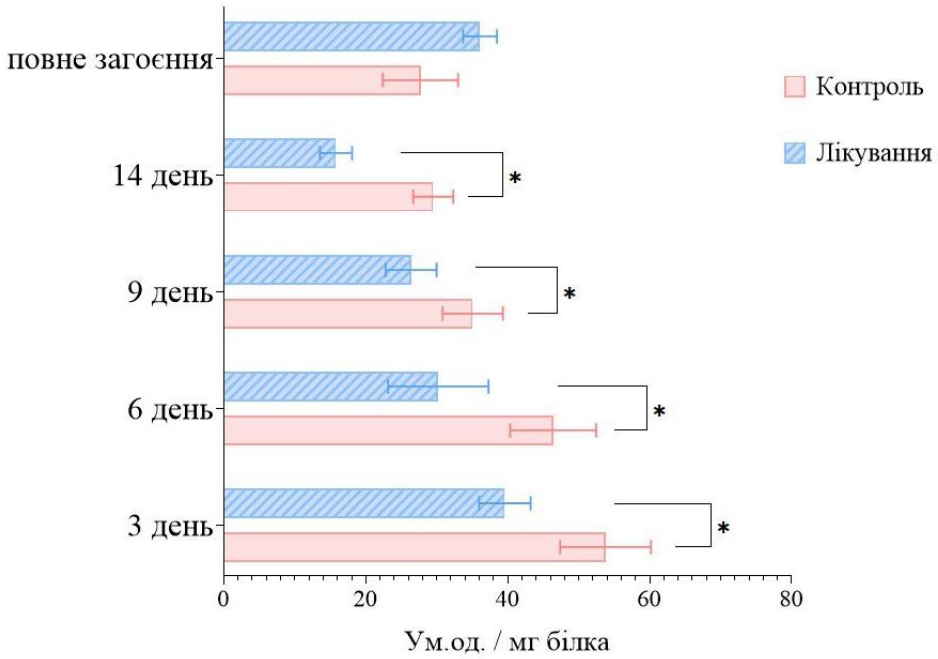

Рис. 3.10. Вміст тромбоцитарного фактора росту у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 6, 9 та 14 добу вміст PDGF-A у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Така динаміка може свідчити про інший характер локальної регуляції репаративних процесів за умов лікування та, ймовірно, відображає менш інтенсивну активацію PDGF-A-залежних механізмів у тканині рани.

На етапі повного загоєння статистично значущих відмінностей у рівні PDGF-A між групами не виявлено. Це може показувати зменшення

міжгрупових відмінностей після завершення основних етапів репарації та наближення локального вмісту цього фактора до стабільного рівня.

Отже, за умов застосування ензимної композиції вміст PDGF-A у гомогенаті шкіри був нижчим упродовж основних строків спостереження, що може вказувати на особливості локальної регуляції запально-репаративних процесів у зоні гнійно-некротичного ушкодження.

На рисунку 3.11 наведено результати визначення вмісту інсуліноподібного фактора росту (IGF) у гомогенаті шкіри щурів із гнійно-некротичними ранами на різних етапах загоєння. Встановлено, що на 3-тю добу рівень IGF у групі «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Подібна різниця зберігалася і на 6, 9 та 14 добу, коли вміст IGF у тканині шкіри тварин групи «Лікування» також залишався достовірно нижчим, ніж у контролі.

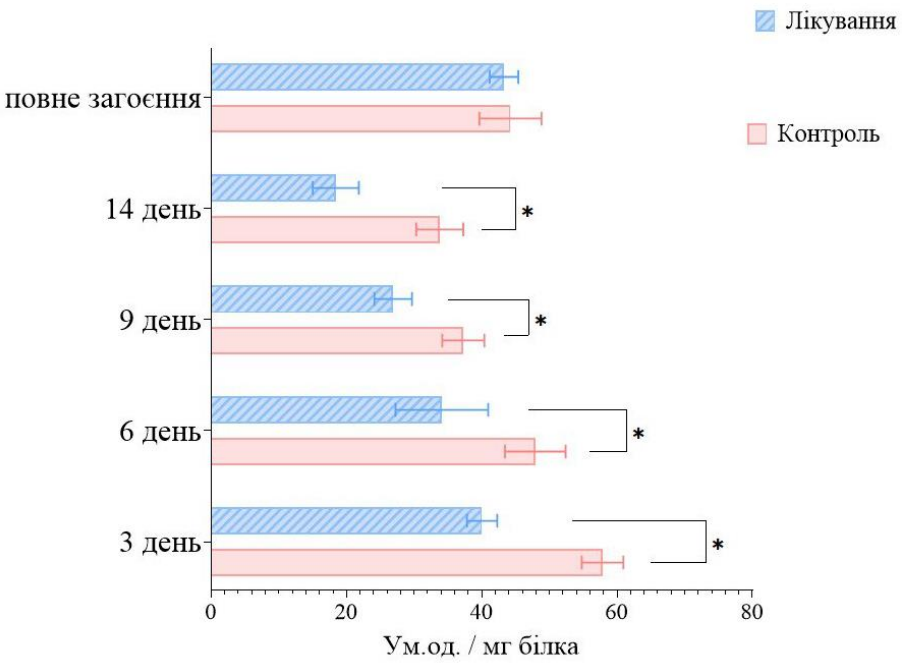

Рис. 3.11. Вміст інсуліноподібного фактора росту у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

Оскільки IGF відіграє важливу роль у підтриманні клітинного росту, виживанні клітин і метаболічному забезпеченні тканинної репарації, зменшення його локального вмісту на ранньому етапі може відображати нижчу інтенсивність IGF-залежної трофічної підтримки в зоні ушкодження за умов застосування ензимної композиції [28, 34].

На момент повного загоєння статистично значущих відмінностей між групами за рівнем IGF уже не виявляли. Це може відображати поступове зменшення міжгрупових розбіжностей після завершення активної фази ранового процесу.

На рисунку 3.12 наведено результати визначення вмісту фактора росту фібробластів (FGF) у гомогенаті шкіри щурів груп «Контроль» і «Лікування» на 3, 6, 9, 14 добу та при повному загоєнні гнійно-некротичної рани.

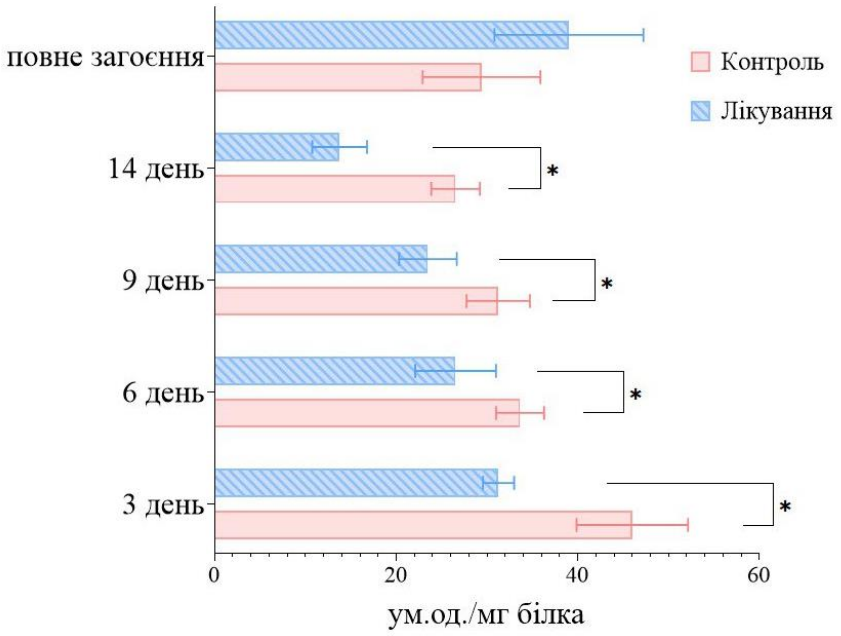

Рис. 3.12. Вміст фактора росту фібробластів у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 3-тю добу експерименту рівень FGF у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Оскільки FGF є одним із провідних локальних регуляторів проліферації фібробластів, формування грануляційної тканини та неоангіогенезу, зменшення його вмісту на ранньому етапі може відображати менш інтенсивну активацію тканинних механізмів, пов’язаних із розростанням клітинного та судинного компонентів у зоні ушкодження [25].

На 6-ту та 9-ту добу рівень FGF у групі «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль» . Така динаміка може вказувати, що за умов застосування ензимної композиції формування грануляційної тканини та FGF-залежна активація фібробластів відбувалися менш інтенсивно, ніж у тварин без місцевого лікування.

На 14-ту добу вміст FGF у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль», що може свідчити про збереження відмінностей у локальній регуляції проліферативно-ремоделювальних процесів у тканині рани. При повному загоєнні статистично значущих відмінностей між групами не виявлено.

На рисунку 3.13 показано, що вміст епідермального фактора росту (EGF) у гомогенаті шкіри щурів змінювався залежно від терміну загоєння гнійно-некротичної рани та умов лікування. На 3-тю добу експерименту рівень EGF у тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». З огляду на те, що EGF є одним із ключових локальних регуляторів проліферації та міграції кератиноцитів і бере участь у відновленні епітеліального покриву, зменшення його вмісту на ранньому етапі, ймовірно, відображає менш інтенсивну активацію EGF-залежних механізмів у зоні ушкодження [27].

На 6-ту, 9-ту та 14-ту добу вміст EGF у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Така динаміка дає підстави припустити, що за умов застосування ензимної композиції локальні процеси, пов’язані

з EGF-опосередкованою активацією кератиноцитів і формуванням епітеліального шару, перебігали менш інтенсивно, ніж у тварин без місцевого лікування.

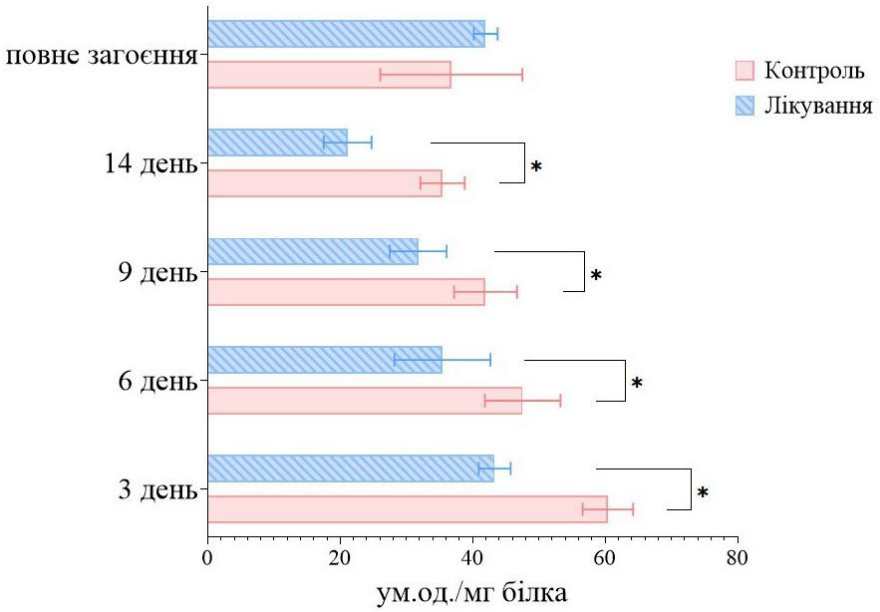

Рис. 3.13. Вміст епідермального фактора росту у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

При повному загоєнні статистично значущих відмінностей уже не виявлено, що узгоджується із завершенням основних етапів епітелізації та тканинної репарації.

Для тварин групи «Лікування» був характерний статистично значуще нижчий вміст EGF у гомогенаті шкіри на 3, 6, 9 та 14 добу порівняно з групою «Контроль», тоді як при повному загоєнні міжгрупові відмінності втрачали статистичну значущість.

На рисунку 3.14 показано, що вміст фактора 1α, індукованого гіпоксією (HIF-1α), у гомогенаті шкіри щурів відрізнявся між групами «Контроль» і

«Лікування» впродовж основних строків спостереження. На 3-тю добу експерименту рівень HIF-1α у тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». З огляду на роль HIF-1α як ключового регулятора клітинної адаптації до гіпоксії, таке зниження можна пов’язати з менш вираженим гіпоксичним навантаженням у тканинах зони ушкодження за умов застосування ензимної композиції [39].

На 6-ту, 9-ту та 14-ту добу вміст HIF-1α у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим, ніж у групі «Контроль». Подібна динаміка узгоджується з меншою інтенсивністю HIF-1α-залежної відповіді в тканині рани та може відображати швидше послаблення локального гіпоксичного стресу.

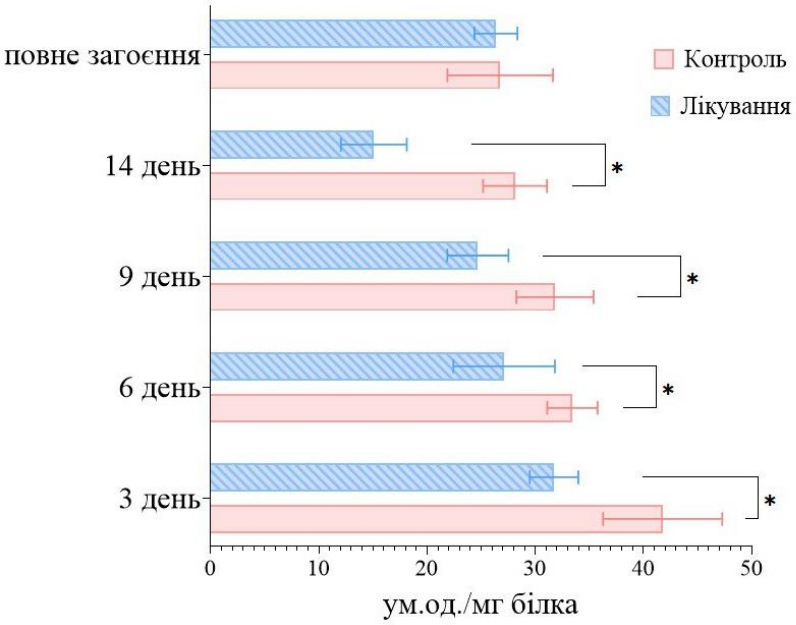

Рис. 3.14. Вміст фактора 1α, індукованого гіпоксією (HIF-1α) у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

При повному загоєнні статистично значущих відмінностей між групами не виявлено, що відповідає завершенню активної фази репарації та зменшенню тканинної потреби в HIF-1α-опосередкованій адаптації.

Для групи «Лікування» був характерний нижчий вміст HIF-1α у гомогенаті шкіри на 3, 6, 9 та 14 добу; після повного загоєння достовірних відмінностей між групами не виявлено.

На рисунку 3.15 відображено зміни вмісту трансформуючого фактора росту (TGF) у гомогенаті шкіри щурів із гнійно-некротичними ранами на різних етапах загоєння.

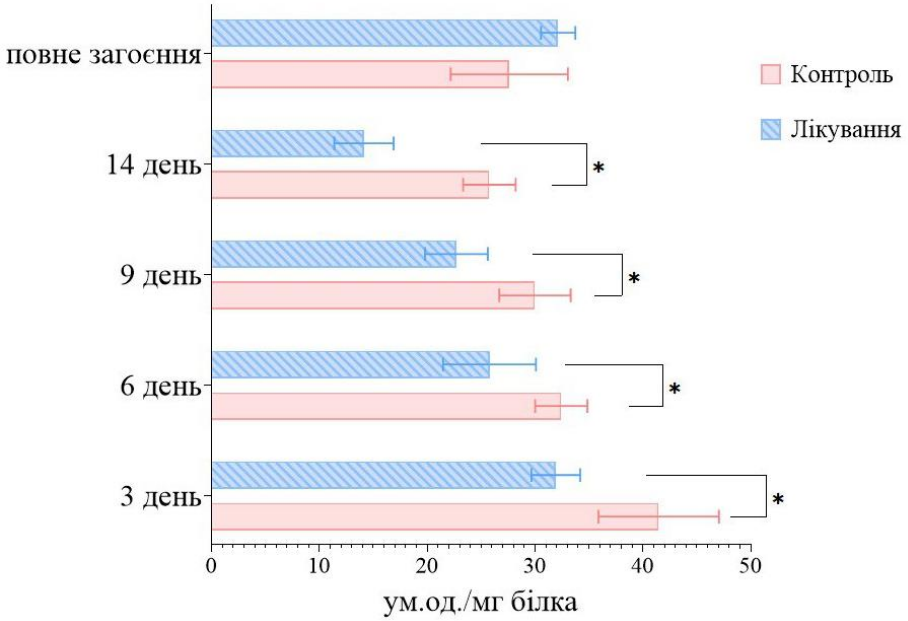

Рис. 3.15. Вміст трансформуючого фактора росту у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На 3-тю добу експерименту рівень TGF у тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Зважаючи на участь TGF у регуляції активності фібробластів, синтезі компонентів

позаклітинного матриксу та перебігу ремоделювання тканини [26], зниження його вмісту на ранньому етапі, ймовірно, відображає менш інтенсивну активацію TGF-залежних механізмів у зоні ушкодження.

На 6-ту, 9-ту та 14-ту добу вміст TGF у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Така динаміка узгоджується з менш вираженим залученням TGF-опосередкованих процесів, пов’язаних із матриксним ремоделюванням і функціональною активністю фібробластів у тканині рани.

При повному загоєнні статистично значущих відмінностей між групами не виявлено, що відповідає завершенню основних етапів тканинної репарації.

На рисунку 3.16 наведено зміни вмісту судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) у гомогенаті шкіри щурів контрольної та дослідної груп на різних етапах загоєння гнійно-некротичної рани. На 3-тю добу експерименту рівень VEGF у тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». З огляду на участь VEGF у стимуляції ангіогенезу, проліферації ендотеліальних клітин і регуляції судинної проникності [29], зниження його локального вмісту на ранньому етапі, ймовірно, відображає менш інтенсивну судинну реакцію в зоні ушкодження за умов застосування ензимної композиції.

На 6-ту добу вміст VEGF у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль», що узгоджується з менш вираженим VEGF-опосередкованим залученням механізмів раннього ангіогенезу. На 9-ту та 14-ту добу відмінності між групами вже не досягали статистичної значущості, що можна пов’язати з поступовим згасанням активної судинної відповіді та переходом до подальшого ремоделювання тканини.

При повному загоєнні статистично значущих відмінностей у рівні VEGF між групами не виявлено, що відповідає завершенню основних ангіогенних перебудов у тканині рани. Для групи «Лікування» був характерний нижчий

вміст VEGF у гомогенаті шкіри на 3-тю і 6-ту добу, тоді як у подальші строки вираженість відмінностей зменшувалася.

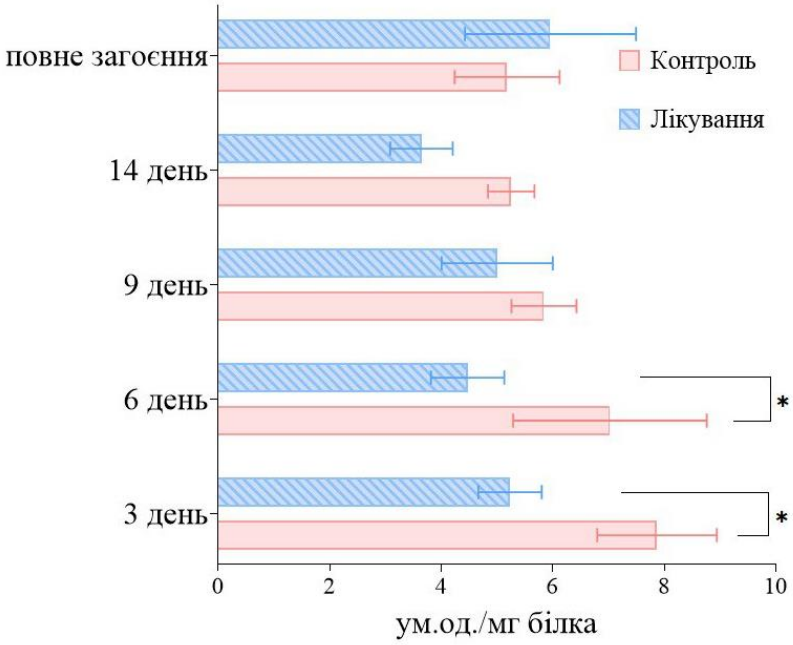

Рис. 3.16. Вміст фактора росту ендотелію судин у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

На рисунку 3.17 показано, що вміст нервового фактора росту (NGF) у гомогенаті шкіри щурів змінювався залежно від терміну загоєння гнійно-некротичної рани та умов лікування. На 3-тю добу експерименту рівень NGF у тварин групи «Лікування» був статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Враховуючи, що NGF бере участь у підтриманні нейротрофічного мікрооточення тканини та регуляції локальних запально-репаративних реакцій, зниження його вмісту на ранньому етапі може відображати менш інтенсивну активацію NGF-залежних механізмів у зоні ушкодження [23].

На 6-ту та 9-ту добу вміст NGF у гомогенаті шкіри тварин групи «Лікування» також залишався статистично значуще нижчим порівняно з групою «Контроль». Такий характер змін можна пов’язати з менш вираженим залученням локальних NGF-опосередкованих процесів упродовж основних строків тканинної репарації. На 14-ту добу відмінності між групами зменшувалися і вже не досягали статистичної значущості, що узгоджується з поступовим згасанням активної фази локальної відповіді в тканині рани [31].

При повному загоєнні статистично значущих відмінностей у рівні NGF між групами не виявлено.

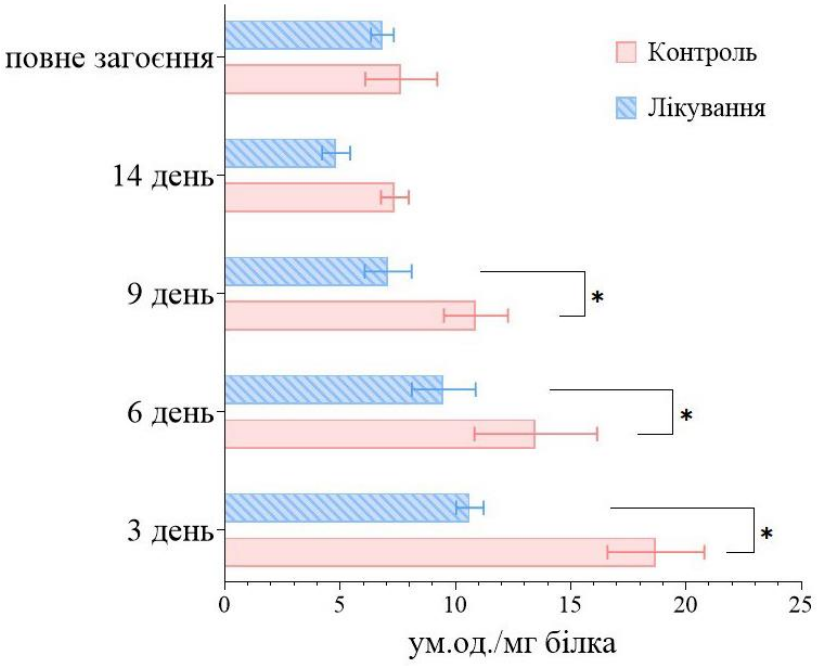

Рис. 3.17. Вміст нервового фактора росту у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами за використання ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів

* – різниця статистично значуща відносно значення у групі «Контроль» при $p < 0,05$ ($M \pm SD$, $n = 5$)

У ході експериментального дослідження було проаналізовано динаміку вмісту ключових факторів росту (PDGF-A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α, TGF, VEGF та NGF) у гомогенаті шкіри щурів з гнійно-некротичними ранами на різних

етапах загоєння за умов спонтанного перебігу ранового процесу та на тлі місцевого застосування ензимної композиції.

Одержані результати дозволили оцінити особливості локальної регуляції репаративних процесів у тканині рани. У тварин групи «Лікування» для більшості досліджених факторів росту був характерний нижчий локальний вміст упродовж основних строків спостереження порівняно з групою «Контроль». Зокрема, вміст PDGF-A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α і TGF у гомогенаті шкіри залишався статистично значуще нижчим на 3, 6, 9 та 14 добу, тоді як для VEGF така різниця виявлялася на 3-тю і 6-ту добу, а для NGF — на 3-тю, 6-ту та 9-ту добу. Такий характер змін узгоджується з менш інтенсивною локальною активацією механізмів, пов’язаних із запальною реакцією, гіпоксичним стресом, ангіогенезом, проліферацією клітин і матриксним ремоделюванням у зоні ушкодження.

При повному загоєнні статистично значущі відмінності між групами для всіх досліджених факторів росту вже не виявлялися, що відповідає завершенню основних етапів тканинної репарації.

Таким чином, місцеве застосування ензимної композиції супроводжувалося зміною локального профілю факторів росту в тканині рани, що можна розглядати як прояв більш стриманого перебігу основних регуляторних процесів загоєння на локальному рівні.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження встановлено, що місцеве застосування ензимної композиції на основі суміші протеолітичних ферментів сприяло більш ефективному перебігу загоєння гнійно-некротичних ран у щурів. Це підтверджувалося прискоренням морфологічного загоєння та змінами вмісту факторів росту у сироватці крові й гомогенаті шкіри.

1. Місцеве застосування ензимної композиції сприяло прискоренню загоєння гнійно-некротичних ран у щурів. У тварин групи «Лікування» площа ранової поверхні була статистично значуще меншою порівняно з групою «Контроль», починаючи з 9-ї доби експерименту. Повне загоєння ран у цій групі наставало на 27-му добу, тоді як у групі «Контроль» – на 30-ту добу.

2. У сироватці крові дослідних тварин виявлено поетапні зміни вмісту факторів росту. На 3-тю добу в групі «Лікування» рівні PDGF-A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α, TGF, VEGF та NGF були статистично значуще нижчими порівняно з групою «Контроль». На пізніших етапах ранозагоювального процесу відзначали тимчасове підвищення окремих показників: IGF – на 6-ту та 9-ту доби, FGF, EGF і HIF-1α – на 9-ту добу, TGF – на 14-ту добу. Водночас для PDGF-A, VEGF та NGF у подальші строки статистично значущих відмінностей від контрольної групи не встановлено. На етапі повного загоєння вміст усіх досліджуваних факторів росту в обох групах не відрізнявся.

3. У гомогенаті шкіри дослідних тварин встановлено зниження локального вмісту факторів росту на основних етапах ранозагоювального процесу за умов застосування ензимної композиції. Так, у групі «Лікування» рівні PDGF-A, IGF, FGF, EGF, HIF-1α і TGF були статистично значуще нижчими на 3-тю, 6-ту, 9-ту та 14-ту доби порівняно з групою «Контроль». Для VEGF достовірне зниження відзначали на 3-тю та 6-ту доби, а для NGF – на 3-тю, 6-ту та 9-ту доби. На етапі повного загоєння статистично значущих відмінностей між групами за вмістом жодного з досліджених факторів росту не виявлено.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Peña, O. and Martin, P. (2024). Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(8), pp. 599–616.

2. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. and Gurtner, G. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), pp. 665–706.

3. Sorg, H., Tilkorn, D., Hager, S., Hauser, J. and Mirastschijski, U. (2017). Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 58(1–2), pp. 81–94.

4. Jung, S., Kang, D. and Ko, E. (2025). Roles of PDGF/PDGFR signaling in various organs. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 29(2), pp. 139–155.

5. Beheshtizadeh, N., Gharibshahian, M., Bayati, M., Maleki, R., Strachan, H., Doughty, S. and Tayebi, L. (2023). Vascular endothelial growth factor (VEGF) delivery approaches in regenerative medicine. *Biomedical Pharmacotherapy*, [online] Volume 166, 115301. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37562236/ [Accessed 30 Apr. 2025].

6. Massagué, J. and Sheppard, D. (2023). TGF-β signaling in health and disease. *Cell*, 186(19), pp. 4007–4037.

7. Wang, C., Liu, Y. and He, D. (2019). Diverse effects of platelet-derived growth factor-BB on cell signaling pathways. *Cytokine*, 113, pp.13–20.

8. Nurkesh, A., Jaguparov, A., Jimi, S. and Saparov, A. (2020). Recent advances in the controlled release of growth factors and cytokines for improving cutaneous wound healing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [online] Volume 8, 638 Available at: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7371992/ [Accessed 30 Apr. 2025].

9. *Schulz, S.A. (no date). Necrotizing Soft-Tissue Infections – Overview. Medscape.* Available at: https://emedicine.medscape.com/article/2051157-overview (Accessed: 30 Apr. 2025).

10. Nawijn, F., de Gier, B., Brandwagt, D., Groenwold, R., Keizer, J. and Hietbrink, F. (2021). Incidence and mortality of necrotizing fasciitis in The Netherlands: the impact of group A Streptococcus. *BMC Infectious Diseases*, [online] Volume 21(1), 1217. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34872527/ [Accessed 30 Apr. 2025].

11. Suzuki, H., Muramatsu, K., Kubo, T., Kawasaki, M., Fujitani, T., Tsukamoto, M., Uchida, S., Fujino, Y., Matsuda, S. and Sakai, A. (2021). Factors associated with mortality among patients with necrotizing soft tissue infections: An analysis of 4597 cases using the Diagnosis Procedure Combination Database. *International Journal of Infectious Diseases*, 102, pp. 73–78.

12. Horn, D., Shen, J., Roberts, E., Wang, T., Li, K., O'Keefe, G., Cuschieri, J., Bulger, E. and Robinson, B. (2020). Predictors of mortality, limb loss, and discharge disposition at admission among patients with necrotizing skin and soft tissue infections. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 89(1), pp. 186–191.

13. Khamnuan, P., Chongruksut, W., Jearwattanakanok, K., Patumanond, J., Yodluangfun, S. and Tantraworasin, A. (2015). Necrotizing fasciitis: Risk factors of mortality. *Risk Management and Healthcare Policy*, 8, pp. 1–7.

14. Elliott, D., Kufera, J. and Myers, R. (1996). Necrotizing soft tissue infections. Risk factors for mortality and strategies for management. *Annals of Surgery*, 224(5), pp. 672–683.

15. Kumar, T., Kaushik, R. and Singh, S. (2020). Determinants of Mortality in Necrotizing Soft Tissue Infections. *Hellenic Journal of Surgery*, 92, pp. 159–164.

16. Nawijn, F., Smeeing, D. and Houwert, R. (2020). Time is of the essence when treating necrotizing soft tissue infections: A systematic review and meta-analysis. *World Journal of Emergency Surgery*, [online] Volume 15, 4. Available at: https://wjes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13017-019-0286-6 [Accessed 30 Apr. 2025].

17. *The Wound Pros (no date) Necrotic Wounds: Things You Should Know*. Available at: https://www.thewoundpros.com/post/necrotic-wounds-things-you-should-know (Accessed: 30 Apr. 2025).

18. Liu, Y., Ni, P., Huang, Y. and Xie, T. (2022). Therapeutic strategies for chronic wound infection. *Chinese Journal of Traumatology*, 25(1), pp. 11–16.

19. Falcone, M., De Angelis, B., Pea, F., Scalise, A., Stefani, S., Tasinato, R., Zanetti, O. and Dalla Paola, L. (2021). Challenges in the management of chronic wound infections. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 26, pp. 140–147.

20. Гольцев, К., Криворучко, І. та Чеверда, В. (2023). Особливості патогенезу гнійних ран нижніх кінцівок, що довго не гояться (огляд літератури). *Український журнал медицини, біології та спорту*, 8(3), сс. 79–86.

21. *Ozgok Kangal, M.K. and Regan, J.P. (2023) Wound Healing. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.* Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/#article-31402.s7 (Accessed: 30 Apr. 2025).

22. *Hoang, T., Ghori, M., Ousey, K. and Conway, B. (2022) Current and advanced therapies for chronic wound infection: An overview of chronic wounds, including their physiology, causes and management options*. *The Pharmaceutical Journal*. Available at: https://pharmaceutical-journal.com/article/ld/current-and-advanced-therapies-for-chronic-wound-infection (Accessed: 30 Apr. 2025).

23. Deng, X., Gould, M. and Ali, M. (2022). A review of current advancements for wound healing: Biomaterial applications and medical devices. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(11), pp. 2542–2573.

24. Stone, W.L., Leavitt, L. and Varacallo, M.A. (2023) *Physiology, Growth Factor*. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442024/ (Accessed: 30 Apr. 2025).

25. Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C. and Wang, X. (2018). FGF family: From drug development to clinical application. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 19(7), 1875. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29949887/ [Accessed 30 Apr. 2025].

26. Morikawa, M., Derynck, R. and Miyazono, K. (2016). TGF-β and the TGF-β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [online] Volume 8(5), a021873. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27141051/ [Accessed 30 Apr. 2025].

27. Shin, S., Koh, Y., Lee, W., Seok, J. and Park, K. (2023). The use of epidermal growth factor in dermatological practice. *International Wound Journal*, 20(6), pp. 2414–2423.

28. LeRoith, D., Holly, J. and Forbes, B. (2021). Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors. *Molecular Metabolism*, [online] Volume 52, 101245. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33962049/ [Accessed 30 Apr. 2025].

29. Melincovici, C., Boşca, A., Şuşman, S., Mărginean, M., Mihu, C., Istrate, M., Moldovan, I., Roman, A. and Mihu, C. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(2), pp. 455–467.

30. Andrae, J., Gallini, R. and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development*, 22(10), pp. 1276–1312.

31. Skaper, S.D. (2018). Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, 1727, pp. 1–17.

32. Sun, Y., Liu, W., Liu, T., Feng, X., Yang, N. and Zhou, H. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 35(6), pp. 600–604.

33. Deschênes-Simard, X., Malleshaiah, M. and Ferbeyre, G. (2024). Extracellular Signal-Regulated Kinases: One Pathway, Multiple Fates. *Cancers*,

[online] Volume 16(1), 95. Available at: https://www.mdpi.com/2072-6694/16/1/95 [Accessed 30 Apr. 2025].

34. He, Y., Sun, M. and Zhang, G. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, [online] Volume 6, 425. Available at: https://www.nature.com/articles/s41392-021-00828-5 [Accessed 30 Apr. 2025].

35. Phyu, S., Tseng, C. and Fleming, I. (2016). Probing the PI3K/Akt/mTor pathway using 31P-NMR spectroscopy: routes to glycogen synthase kinase 3. *Scientific Reports*, [online] Volume 6, 36544. Available at: https://www.nature.com/articles/srep36544#citeas [Accessed 30 Apr. 2025].

36. Awasthi, N., Liongue, C. and Ward, A. (2021). STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, [online] Volume 14, 198. Available at: https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01214-y#citeas [Accessed 30 Apr. 2025].

37. Tošić, I. and Frank, D. (2021). STAT3 as a mediator of oncogenic cellular metabolism: Pathogenic and therapeutic implications. *Neoplasia*, 23(12), pp. 1167–1178.

38. Deng, Z., Fan, T. and Xiao, C. (2024). TGF-β signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, [online] Volume 9, 61. Available at: https://www.nature.com/articles/s41392-024-01764-w [Accessed 30 Apr. 2025].

39. Zimna, A. and Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomedical Research International*, [online] Volume 2015, 549412. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26146622/ [Accessed 30 Apr. 2025].

40. Park, H. and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), pp. 7–23.

41. Baba, A., Rah, B., Bhat, G., Mushtaq, I., Parveen, S., Hassan, R., Hameed Zargar, M. and Afroze, D. (2022). Transforming Growth Factor-Beta (TGF-β)

Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Frontiers in Pharmacology*, [online] Volume 13, 791272. Available at: https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2022.791272/full [Accessed 30 Apr. 2025].

42. Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, 79, pp. 34–74.

43. Bogdanovski, D., DiFazio, L., Bogdanovski, A., Csóka, B., Jordan, G., Paul, E., Antonioli, L., Pilip, S. and Nemeth, Z. (2017). Hypoxia-inducible-factor-1 in trauma and critical care. *Journal of Critical Care*, 42, pp. 207–212.

44. Eming, S.A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, [online] Volume 6(265), 265sr6. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25473038/ [Accessed 30 Apr. 2025].

45. Ornitz, D. and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), pp. 215–266.

46. Thurston, G. (2002). Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *Journal of Anatomy*, 200(6), pp. 575–580.

47. Frangogiannis, N. (2020). Transforming growth factor-β in tissue fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, [online] Volume 217(3), e20190103. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32997468/ [Accessed 30 Apr. 2025].

48. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), pp. 585–601.

49. Qu, W., Wang, Z., Hunt, C., Morrow, A., Urtecho, M., Amin, M., Shah, S., Hasan, B., Abd-Rabu, R., Ashmore, Z., Kubrova, E., Prokop, L. and Murad, M. (2021). The effectiveness and safety of platelet-rich plasma for chronic wounds: A systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, 96(9), pp. 2407–2417.

50. Dumantepe, M., Fazliogullari, O., Seren, M., Uyar, I. and Basar, F. (2015). Efficacy of intralesional recombinant human epidermal growth factor in chronic diabetic foot ulcers. *Growth Factors*, 33(2), pp. 128–132.

51. Nagai, M. and Embil, J. (2002). Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2(2), pp. 211–218.

52. Xu, H., Tian, F., Xiao, J., Chen, P., Xu, J., Fan, Z., Yang, J., Lu, C. and Zhao, Y. (2018). Sustained-release of FGF-2 from a hybrid hydrogel of heparin-poloxamer and decellular matrix promotes the neuroprotective effects of proteins after spinal injury. *International Journal of Nanomedicine*, 13, pp. 681–694.

53. Mazini, L., Rochette, L., Admou, B., Amal, S. and Malka, G. (2020). Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 21(4), 1306. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32075181/ [Accessed 30 Apr. 2025].

54. Табурець, О., Верещака, В., Берегова, Т. та Остапченко, Л. (2017). Вплив меланіну на морфофункціональні показники шкіри за умов різаної рани та хімічного опіку у щурів. Фізіологічний журнал. 63(5), сс. 28-33.

55. Kielkopf, C., Bauer, W. and Urbatsch, I. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, [online] Volume 2020(4), 102269. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32238597/ [Accessed 30 Apr. 2025].